



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais  
Faculdade de Química  
Laboratório de Cromatografia Líquida

TÚLIO DA FONSECA SANTOS

**Estudo químico do resíduo de extração da espécie**  
*Varronia multispicata* (Cham) Borhidi (Boraginaceae).

**Belém – PA**

**2018**

TÚLIO DA FONSECA SANTOS

**Estudo químico do resíduo de extração da espécie**  
*Varronia multispicata* (Cham) Borhidi (Boraginaceae).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Química da Universidade Federal do  
Pará, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva.

Belém-PA

2018

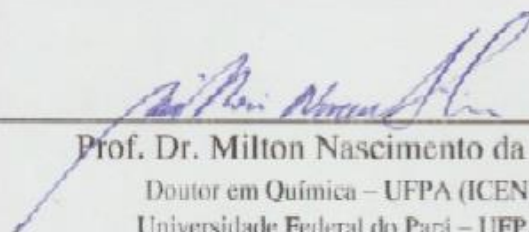
TÚLIO DA FONSECA SANTOS

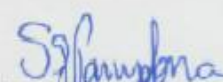
**Estudo químico do resíduo de extração da espécie**  
*Varronia multispicata* (Cham) Borhidi (Boraginaceae).

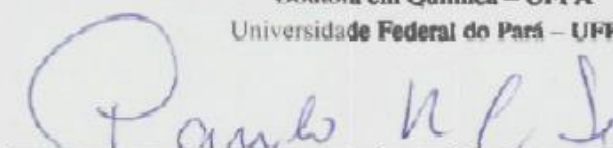
Data de aprovação: 18/12/2018.

Conceito: EXCELENTE

Banca examinadora:

  
- Orientador  
**Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva**  
Doutor em Química – UFPA (ICEN)  
Universidade Federal do Pará – UFPA

  
- Membro  
**Dr.ª Sônia das Graças Santa Rosa Pamplona**  
Doutora em Química – UFPA  
Universidade Federal do Pará – UFPA

  
- Membro  
**Prof. Msc. Paulo Roberto da Costa Sá**  
Mestre em Química - UFPA  
Instituto Federal do Pará – IFPA

Belém – PA  
2018

*Dedico à minha mãe, Tereza Fonseca,  
que sempre me apoiou e me incentivou  
a seguir o caminho da academia, ao  
meu pai, Zenóbio Santos, que me  
ajudou no que precisei.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu colega, amigo e professor, **Abraão de Jesus Barbosa Muribeca**, pelo incentivo e por me ajudar a não enlouquecer. Agradeço a **Sônia das Graças Santa Rosa Pamplona** por ser a figura ilustre de estabilidade e amparo, por me dar aconchego emocional e motivação profissional para seguir. A **Luziane da Silva Borges** por ser uma amiga fiel e empática. Ao **Johan Carlos Costa Santiago** por mostrar que a vida pode ser imprevisível e libertadora. Ao **Paulo Wender Portal Gomes** pela competência e força de vontade. Ao professor **Milton Nascimento** por me mostrar que amigo é coisa para se guardar e por ser este grande pai científico que foi, é e sempre será em minha vida acadêmica. A professora **Yumiko Yoshioka** pela paciência. A minha tia **Feliciano Maria** por ser minha mãe durante minha graduação, me fazendo sentir seu próprio filho. Ao **Paulo Sá** por ser solícito em responder minhas dúvidas em proposições mecânicas. À **Juliana Oliveira** por ser essa grande pessoa. Amiga e colega azulina, e por ser estrela guia no trabalho com esta espécie. Ao **Júlio César** e a todos do Labcrol.

*“O menino tinha fome. E o menino não  
comeu porque o povo não quis que ele se  
alimentasse”. Não sejais protagonistas de  
vossas próprias histórias, sejais  
coadjuvantes na história da humanidade.*

***Túlio F. Santos.***

## RESUMO

A espécie *Varronia multispicata* pertence à família Boraginaceae e ao gênero *Varronia* P. do qual também pertence a espécie, *Varronia curassavica*, de sucesso industrial no tocante a medicamento de origem vegetal. Este trabalho teve como objetivo estudar a composição do extrato aquoso via infusão da espécie *Varronia multispicata*, assim como, o resíduo botânico oriundo deste processo, utilizando técnicas como HPLC, UHPLC-MS/MS e Cromatografia por exclusão, com o fim de apontar a presença de metabólitos secundários de possível interesse econômico para dar subsídio a trabalhos que possam avaliar a viabilidade de exploração econômica deste rejeito. Houve o fracionamento do extrato aquoso por meio da técnica de cromatografia por via úmida com fase estacionária composta por dextrana, e foram analisadas por HPLC. As extrações da torta se deram com metanol e hexano, e no resíduo foi caracterizado o composto 7,2',4',5'-Tetrametoxi-6,6'-dihidroxi-flavona.

**Palavras-chave:** *Varronia multispicata*; 7,2',4',5'-Tetrametoxi-6,6'-dihidroxi-flavona; espectrometria de massas.

## ABSTRACT

The species *Varronia multispicata* belongs to the Boraginacea family and to the genus *Varronia* P. of which also belongs the species, *Varronia curassavica*, of industrial success in relation to the drug of vegetal origin. This work aimed to study the composition of the aqueous extract via the infusion of the *Varronia multispicata* species, as well as the botanical residue from this process, using techniques such as HPLC, UHPLC-MS / MS and Chromatography by exclusion. secondary metabolites of possible economic intersection to give subsidy to works that can evaluate the feasibility of economic exploitation of this waste. Fractionation of the aqueous extract was performed by stationary phase chromatography with dextran, and analyzed by HPLC. Extractions of the cake were given with methanol and hexane, and the residue was characterized as the compound 7,2', 4', 5'-Tetramethoxy-6,6'-dihydroxyflavone.

**Palavras-chave:** *Varronia multispicata*,; 7,2', 4', 5'-Tetramethoxy-6,6'-dihydroxyflavone; mass spectrometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1: Substâncias já isoladas.</i> .....	20
<i>Figura 2: Fluxograma ilustrando os processos e suas respectivas fontes.</i> .....	23
<i>Figura 3: Cromatogramas das frações do extrato aquoso.</i> .....	26
<i>Figura 4: Cromatogramas dos extratos metanólicos.</i> .....	27
<i>Figura 5: Cromatograma do extrato residual (gradiente e isocrático).</i> .....	28
<i>Figura 6: Perfis de absorção no ultravioleta.</i> .....	29
<i>Figura 7: Cromatogramas de íons totais do pool dos picos P2 e P3.</i> .....	29
<i>Figura 8: fragmentograma do pico P2.</i> .....	30
<i>Figura 9: Fragmentograma do pico P3.</i> .....	31
<i>Figura 10: Cromatogramas dos extratos hexânicos a frio.</i> .....	32
<i>Figura 11: Cromatograma em modo isocrático do extrato hexânicos.</i> .....	33
<i>Figura 12: Cromatograma de íons totais do extrato hexânico a frio da torta, ionizados em modo positivo, e detectado por análise de ToF.</i> .....	34
<i>Figura 13: Fragmentograma de uma massa detectada no extrato hexânico a frio.</i> .....	35
<i>Figura 14: Fragmentograma do padrão da substância previamente elucidada.</i> .....	36
<i>Figura 15: Comparação dos fragmentogramas.</i> .....	36
<i>Figura 16: Cromatogramas do extrato hexânico por Soxhlet (gradiente e isocrático).</i> 37	

---

Tabela 01. Marcadores quimiotaxionômicos de gênero <i>Varronia</i> P e <i>Cordia</i> L isoladas por KUROYANAGI, <i>et. al.</i> , 2003 .....	18
Tabela 02. Especificação da etapa de fracionamento do extrato aquoso de <i>Varroniamultispicata</i> (Cham) Borhidi (Boraginacea). .....	24

---

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu\text{L}$	microlitros
ACN	Acetonitrila
C	Celsius
DAD	Diode Array Detector
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	<i>Electrospray</i>
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
hs	horas
kV	Kilovolts
L/h	Litros por hora
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
MeOH	metanol
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
MoNA	<i>MassBank of North America</i>
nm	nanômetros
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV/Vis	Ultravioleta Visível
V	Volts
mAU	Unidade de absorbância

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1 Geral</b> .....	14
<b>2.2 Específicos</b> .....	14
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>3.1 Família Boraginaceae</b> .....	15
<b>3.2O Gênero <i>Varronia</i></b> .....	16
3.2.2 A espécie <i>Varronia multispicata</i> (CHAM) Borhidi.....	16
3.2.2.2 Os marcadores quimiotaxômicos .....	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
<b>4.1 Equipamentos</b> .....	21
<b>4.2 Reagentes e Material</b> .....	21
<b>4.3 Descrição da área de coleta e identificação do material botânico</b> .....	21
<b>4.4 Etapas de processamento do material botânico</b> .....	22
<b>4.5 Fracionamento do aquoso.</b> .....	23
<b>4.6 Desenvolvimento cromatográfico via HPLC</b> .....	24
<b>4.7 Caracterização via LC-MS/MS</b> .....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>4.1 Aspectos relevantes sobre a escolha dos extratos</b> .....	25
<b>4.2 Extratos metanólicos: do material botânico e da torta.</b> .....	27
<b>4.4 Extratos hexânicos.</b> .....	32
4.4.2 Extrato à frio do material botânico e da torta.....	32
4.4.3 Extrato por Soxhlet da torta. ....	37
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	38
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	39

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para tratamento de males tem registros datados na pré-história quando os humanos nem mesmo haviam dominado a escrita ou a fala. Com o passar dos tempos e o avanço das experiências humanas com a flora - e a relação com as patologias recorrentes em diferentes regiões do mundo - os povos descobriram, aprenderam e repassaram conhecimentos adquiridos sobre as plantas que compunham o ambiente natural aos quais pertenceram, e a esse acervo empírico foi chamado conhecimento etnobotânico (PEREIRA, CARDOSO, 2012).

O conhecimento etnobotânico serve de argumento para investigações fitoquímicas que tem como finalidade comprovar ou não a atividade relatada, atribuindo o efeito aos compostos químicos oriundos do metabolismo das plantas utilizadas. Mas, ainda há muito que aprender sobre os usos e atividades de plantas e metabólitos existentes, por isso outra forma de investigação fitoquímica é a estocástica ou randômica – na qual a motivação é puramente o acaso de se estudar o desconhecido. (ADIGA *et al*, 2018).

Uma justificativa plausível para estudar uma espécie vegetal é a “...da semelhança genética ou similaridade metabólica...”, na qual estudar uma espécie relativamente desconhecida pertencente à mesma família de uma outra já conhecida - com atividade biológica comprovada - proporciona grandes probabilidades de apresentarem rotas biossintéticas semelhantes; levando ao isolamento de metabólitos com atividades análogas. (GUPTA, 2011).

Nessa perspectiva, a espécie *Varronia multispicata* (sinonímia de *Cordia multispicata*) conhecida popularmente como “maria-preta” é uma angiosperma pertencente à família Boraginacea e ao gênero *Varronia*P., de onde pertence também a espécie *Varronia curassavica* (sinonímia de *Cordia verbenaceae*) que deu origem ao fitomedicamento Acheflan<sup>®</sup>, o qual é de invenção genuinamente brasileira e tem como princípio ativo, para atividade antiinflamatória, os compostos  $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno presentes no óleo essencial (QUEIROZ, FARO, MELO, 2009; FERNANDES *et. al.*, 2007).

O Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2018) sugere algumas formas para o preparo de fitoterápicos oriundos da espécie *Cordia verbenacea*, dentre elas, cita-se uma compressa com o chá das folhas secas por infusão, para o qual orienta o uso externo três vezes ao dia sobre o local lesionado.

Assim, partindo do fato de que *Cordia multispicata* e *Cordia verbenaceae* foram taxinomicamente realocadas do gênero *Cordia* L. para o gênero *Varronia* P. (dando origem às respectivas sinonímias *V.multispicata* e *V.curassavica*), por sequenciamento genético, estas dividem semelhanças no ADN (Ácido Desoxirribonucleico), que por sua vez implica no metabolismo dos seres vivos, produzindo enzimas que determinarão os seguimentos das rotas biossintéticas. (BORHIDI et. al., 1988; MILLER e GOTTSCHLING, 2007). E por esse motivo o estudo de um extrato de *V.multispicata* seguindo as mesmas condições para o chá das folhas de *C. verbenácea* pode ser de grande contribuição para a literatura científica.

Assim, o presente estudo objetivou estudar o resíduo gerado pelo processo de extração, pois acredita-se na possibilidade de desenvolvimento de uma logística de reaproveitamento do material botânico, com o fim de reduzir desperdícios de outros compostos comercialmente valorizados, uma vez que os extratos aquosos são seletivos aos metabólitos de elevada hidrofiliabilidade, e que por isso, compostos de média e alta lipofiliabilidade, que também possam apresentar importantes aplicações, ainda estejam presentes no material botânico residual (torta).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Estudar o resíduo botânico (torta) - oriundo do extrato aquoso via infusão - com o intuito de isolar compostos que também possam vir a conferir atividades similares e/ou superiores aqueles já reportados para a espécie.

### 2.2 Específicos

- Obter extrato aquoso via infusão das folhas secas e trituradas de *Varronia multispicata*(CHAM) Borhidi;
- Obter extrato metanólico resultante do resíduo “torta” do extrato aquoso;
- Desenvolver método cromatográfico via HPLC para o isolamento dos compostos majoritários do extrato metanólico e aquoso;
- Propor caracterização via UPLC-MS/MS dos compostos isolados;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Família Boraginaceae

A família Boraginaceae possui dez gêneros aceitos como ocorrência nativa no Brasil, sendo encontradas espécies desta família no mundo inteiro principalmente em zonas de clima tropical e temperado. Existem cerca de 3000 espécies classificadas em aproximadamente 200 gêneros que apresentam a principal sinapomorfia o estilete ginobásico e não possuem floema interno e nem estípulas. As folhas são dispostas alternadamente e de forma espiralada. O nome Boraginaceae literalmente significa herbaceae de aplicação sudorífica, devido a alta taxa de evapotranspiração das espécies pertencentes á esta família. (MELO, et. al., 2013; MELO e LYRA-LEMOS, 2008; JUSSIEU,1789).

No tocante à exploração fitoquímica e quimiotaxonômica ainda há muito que se descobrir, e sobre as clases de matabólitos que, sugestivamente, podem estar presentes em espécies da família Boraginaceae registram-se: alcalóides, quinonas, naftoquinonas, saponinas, taninos, ácidos fenólicos, alantoínas, mucilagens, polissacarídeos, flavonóides, ciclitóis e ácidos graxos como o ácido gamalinolênico (ARREBOLA, et. al., 2004; KUROYANAGI et.al., 2001, THIRUPATHI *et al*, 2008).

### 3.2 O Gênero *Varronia*

*Varronia* P. é um gênero, relativamente “novo”, que foi proposto como gênero através de trabalhos de identificação morfológica, e principalmente genética, nas espécies que pertencera a um subgênero (*Varronia* P.) do gênero *Cordia* L. (BORHIDI, GONDÁR, OROSZ-KOVÁCS, 1988; MILLER e GOTTSCHLING, 2007).

Devido a este fato, ainda há alguns conflitos sobre como deva ser a nomenclatura taxonômica das espécies componentes deste novo gênero. Segundo Borhidi et. al. (1988) o nome baseado em características morfológicas da espécie *Cordia multispicata* deve ser a sinonímia *Varronia multispicata*, entretanto muitos autores discordam, levando em consideração aspectos genéticos para sustentar seus argumentos.

Enquanto não há uma proposta aceita para como deva ser esta nova nomenclatura, utilizou-se a combinação de Borhidi (por características morfológicas) para se referir à espécie.

Como o nome é apenas questão de identificação das espécies para efeito de catalogação, e este, mesmo sendo alterado não modifica o genótipo das mesmas, será adotado *Cordia multispicata* em levantamento bibliográfico para referenciar a sinonímia *Varronia multispica*.

Uma importante integrante do gênero *Varronia* P. é a espécie *V. curassavica* (sinonímia de *Cordia verbenacea* e *Cordia curassavica*) que além de ter dado origem ao medicamento antiinflamatório Acheflan<sup>®</sup> possui atividades antialérgicas e antitumoral (PARISOTTO, et. al., 2012).

#### 3.2.2 A espécie *Varronia multispicata* (CHAM) Borhidi.

É uma importante planta de incidência espontânea (invasora) de pastagens no leste da Amazônia, aparecendo em ambientes abertos. A floração se estende durante o ano inteiro (VIEIRA e DA SILVA, 1997). Polinização de moscas e polinização compartilhada foram reportadas (MACHADO e LOIOLA, 2000).

##### 3.2.2.1 Estudos farmacológicos.

Etnofarmacologicamente ela é utilizada no tratamento de doenças do trato respiratório como tosse, asma, bronquite e usado como expectorante, por diversos povos da América do Sul; é usado também para tratar contusões (KUROYANAGI *et al*, 2001), erisipela, furúnculo, embora não haja trabalhos científicos validando tais atividades. O

infuso das folhas é também utilizado no combate à anemia, à tosse, bronquite e gripe. As fibras da casca são usadas na fabricação de cordas. A espécie é predominante de solo argiloso-pedregoso, ocorrendo em matas, terrenos baldios e beira de estradas. Apresenta boa concentração em fibra. O ferro é o elemento presente em maior concentração, no caule e folha (RIBEIRO, CALDAS, MARTINS, 1990).

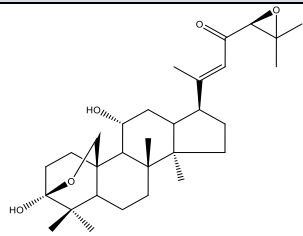
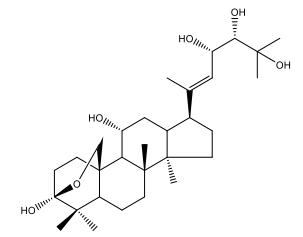
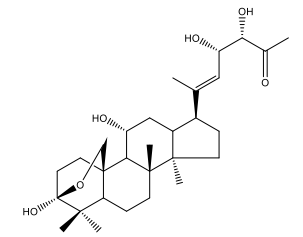
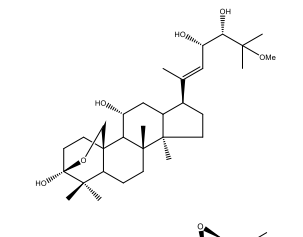
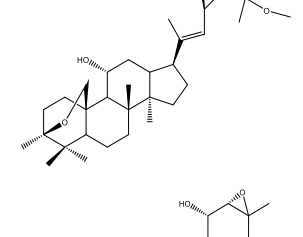
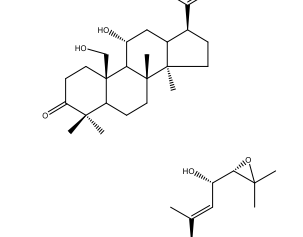
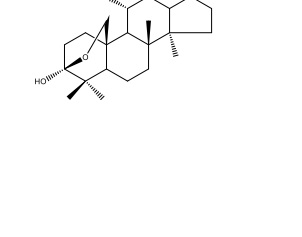
A fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas e alguns compostos isolados desta espécie exibiram uma potencial atividade antiandrogênica, apresentando uma inibição de 73% frente à testosterona 5- $\alpha$ -redutase (KUROYANAGI, *et. al*, 2001).

Foi avaliado o extrato acetônico das folhas de *C. multispicata* (sin. *V. multispicata*) para atividade de inibição do estresse oxidativo e determinação do teor de compostos fenólicos no mesmo, o qual, foi atestado, o potencial antioxidante e um elevado teor de compostos fenólicos, entretanto inferior à espécie *V. curassavica* (sinonímia *C. verbenaceae*). (KUROYANAGI, *et. al*, 2001).

#### 3.2.2.2 Os marcadores quimiotaxonômicos

Os marcadores quimiotaxinômicos do gênero *Cordia* L. e que também corresponde ainda à família *Varronia* L., estão tabelados a seguir, são eles a Cordialina e os Cordianol de A-I que são triterpenos do tipo demerano.

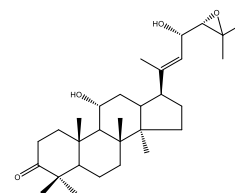
**Tabela 01.** Marcadores quimiotaxionômicos de gênero *Varronia* P e *Cordia* L isoladas por KUROYANAGI, *et al.*, 2003.

Nome	Fórmula molecular	Massa de alta resolução	Estrutura
Cordianolina	$C_{30}H_{46}O_5$	486,3373	
Cordianol A	$C_{30}H_{50}O_6$	506,7243	
Cordianol B	$C_{30}H_{48}O_5$	488,7092	
Cordianol C	$C_{31}H_{52}O_6$	520,7519	
Cordianol D	$C_{30}H_{48}O_5$	488,7092	
Cordianol E	$C_{30}H_{46}O_5$	486,6931	
Cordianol F	$C_{32}H_{50}O_6$	530,7467	

Cordianol G

 $C_{30}H_{48}O_4$ 

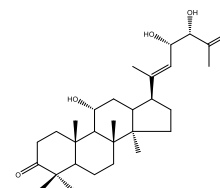
472.7102



Cordianol H

 $C_{30}H_{48}O_4$ 

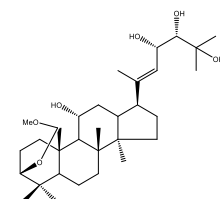
472.7102



Cordianol I

 $C_{31}H_{52}O_6$ 

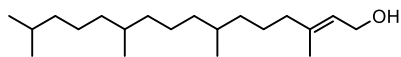
520,7519



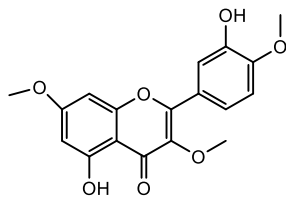
---

E outros compostos também foram isolados de *Varronia multispicata*:

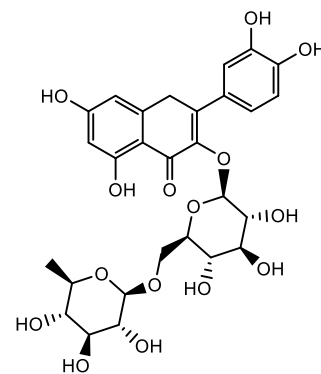
**Figura 1:** Substâncias já isoladas.



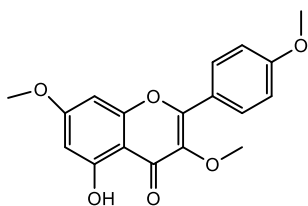
Trans-fitol



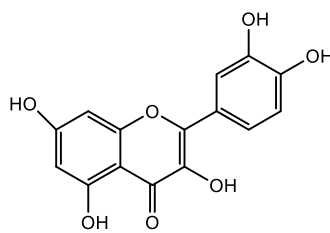
3',5-dihidroxi-3,4',7- trimetoxiflavona



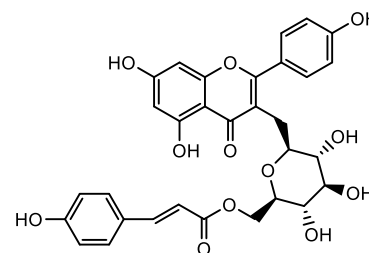
Rutina



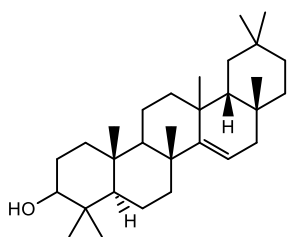
5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona



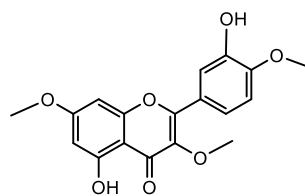
Quercetina



Tilirsosideo



Taxerol



Ayanina

*Compostos isolados de V. multispicata por Da Silva et. al., 2010.*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Equipamentos

- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência –LC-20AD (Shimadzu®) – com detector de diodo SPD-M20A, auto-injetor SIL-20A e interface de comunicação CBM-20A integrado com software *LC-solution* versão 1.25 SP2.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência–LC-6AD PROMINENCE (Shimadzu®) – com detector de diodo SPD-10AV, auto-injetor LC-8A e interface de comunicação CBM-20A integrado com software *LC-solution* versão 1.25 SP2.
- ✓ Espectrômetro de Massas XEVO G2-S QToF (Waters®) acoplado a um Cromatógrafo Líquido UPLC (Waters®);
- ✓ Balança Analítica AUW220D (Shimadzu®);
- ✓ Ultrassom 2510 (Branson®);
- ✓ Purificador de água Direct-Q5 da Millipore (MERCK®);

### 4.2 Reagentes e Material

- ✓ Solventes grau HPLC| MS: acetonitrila e metanol (Tedia®)| LiChrosolv®;
- ✓ Solventes grau P.A: hexano e etanol (Tedia®);
- ✓ Ácido fórmico (CPQ®);
- ✓ Filtro de seringa de nylon 0,45µm;
- ✓ Coluna analítica Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5µm) Phenomenex®;
- ✓ Coluna de vidro 7,5x70 cm;
- ✓ Fase estacionária de dextrana, SEPHADEX ()

### 4.3 Descrição da área de coleta e identificação do material botânico

O material botânico foi adquirido no município de Castanhal-PA, através da coleta *in locus* de espécimes com características morfológicas que indicassem não estarem deterioradas por ataque de predadores (como fungos e insetos), das quais foram seccionadas as folhas da espécie *Varronia multispicata* (Cham) BORHIDI. Uma exsicata, sob a inscrição n° 188979, foi preparada e identificada junto ao herbário da EMBRAPA-PA pela parobotânica Silvana Rodrigues Tavares.

#### 4.4 Etapas de processamento do material botânico

##### 4.4.1 Secagem e trituração.

Após a coleta, o material vegetal foi lavado com água sanitária 0,1% para eliminação de micro-organismos (fungos, bactérias etc) e foi submetido às etapas seguintes: (i) as folhas de *Varronia multispicata* (Cham) Borhidiforam secas em estufa de ventilação a 45° C até peso constante; (ii) o material seco foi triturado em moinhos de facas até obtenção de granulometria de pó semifino (355 µm) conforme Simões et al. (2017);

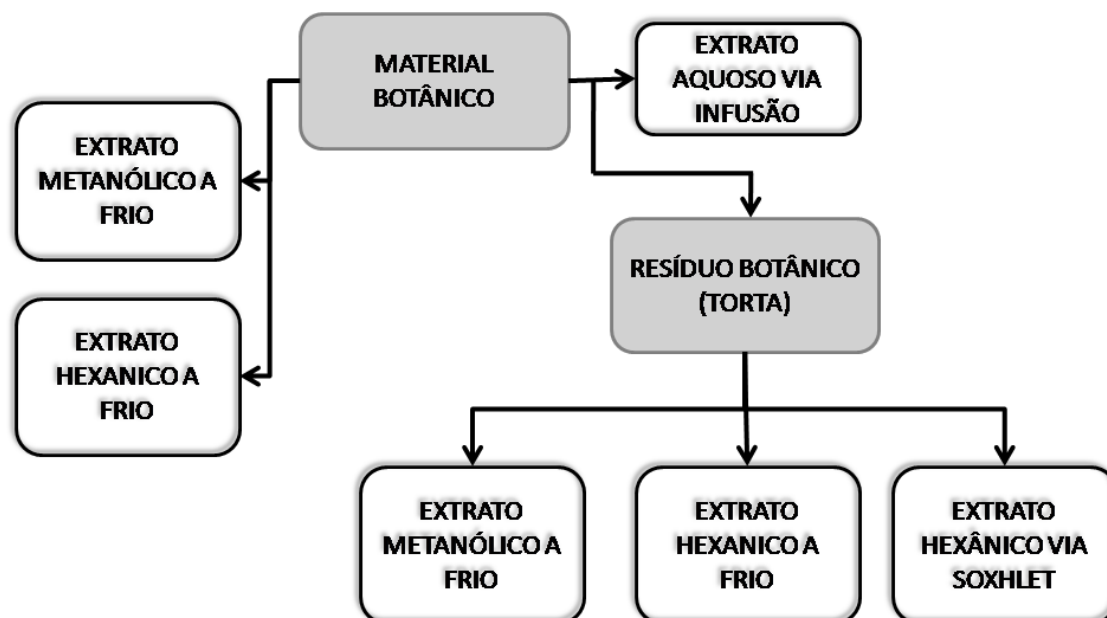
##### 4.4.2 Extração.

A obtenção do extrato aquoso das folhas de *Varronia multispicata* (Cham) Borhidi foi feita conforme sugerido pelo Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2018). Esta etapa consistiu na imersão de 15 gramas de material pulverizado em 750 mL de água ultrapura à 100° C, permanecendo em imersão por um período de 24 hs. O volume foi filtrado em papel de filtro, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado.

A “torta” proveniente do extrato aquoso foi seca a 45° C em estufa de circulação por 72 horas. Posteriormente, o material seco, equivalendo a 10 gramas, foi submetido à extração exaustiva a frio, razão 1:4 (resíduo/solvente), com metanol P.A, em duas bateladas que totalizaram 48 horas, sendo trocado o volume de solvente a cada intervalo de 24 horas. Outros 20g de torta do extrato aquoso tratada foram submetidos à extração com n-hexano, sendo: 10g a frio a razão 1:4 (resíduo/solvente) em duas bateladas de 24 horas cada, e os outros 10g por extração utilizando sistema Soxhlet em uma razão 1:8 (resíduo/solvente) por aproximadamente 5h e 15min e 7 sinfonadas de solvente. Os volumes de extratos foram reunidos respectivamente e concentrados em evaporador rotatório e o material extraído foi seco em estufa (45° C) até peso constante.

Dois outros extratos a frio (sendo: metanólico e hexânico) foram obtidos diretamente do material botânico integral para comparação com os respectivos extratos do resíduo (da extração aquosa) tratado, e estes extratos tiveram as mesmas condições (tempo de bateladas e razão resíduo:solvente) que os extratos a frio da torta.

*Figura 2: Fluxograma ilustrando os processos e suas respectivas fontes.*



#### 4.5 Fracionamento do aquoso.

Uma massa de 300 mg do extrato aquoso foi solubilizada em 5 mL de H<sub>2</sub>O/MeOH 8:2. Em seguida foi inoculada em uma coluna de vidro 32x2 cm contendo 25 gramas de fase estacionária Sephadex (60-200 µm). O sistema de eluição foi uma composição binária de H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1, em modo isocrático, totalizando cinco volumes de 600 mL. A cada volume de coluna coletado (100 mL) considerou-se como uma fração (conforme a Tabela 1 a seguir):

**Tabela 02.** Especificação da etapa de fracionamento do extrato aquoso de *Varronia multispicata* (Cham) Borhidi (Boraginacea).

SOLVENTES	RAZÃO (v/v)	VOLUME	CODIFICAÇÃO
Água/Metanol	90:10	100 mL	EAVM-FR1.spx
Água/Metanol	90:10	100 mL	EAVM-FR2.spx
Água/Metanol	90:10	100 mL	EAVM-FR3.spx
Água/Metanol	90:10	100 mL	EAVM-FR4.spx
Água/Metanol	90:10	100 mL	EAVM-FR5.spx

*Fonte: autor (2018).*

## 4.6 Desenvolvimento cromatográfico via HPLC

### 4.6.1 Pré-tratamento SPE

Três alíquotas de 10 mg dos extratos, metanólico, hexânicos por maceração e hexânico por Soxhlet, foram solubilizadas, paralela e independentemente, em 800 µL de ACN e colocadas em banho ultrassônico por 1 min, em seguida adicionou-se 200 µL de H<sub>2</sub>O e novamente foi colocada em banho ultrassônico. Posteriormente, as amostras foram inoculadas em 3 cartuchos para SPE de fase estacionária composta por 100 mg de sílica modificada com cadeia C18, para retenção de interferentes, em particular, a clorofila. Em seguida, os materiais coletados foram secos em estufa a 40° C.

### 4.6.2 Injeção via HPLC

As amostras foram analisadas via HPLC a partir de colunas analíticas de dimensões de 250x45 mm e 150x45 mm, através de método em estilo gradiente, que variou o percentual de composição orgânica (solvente B) de 5 a 100% ao longo de 60 min, sob fluxo constante de 1 mL/min. Os *vials* foram preparados na concentração inicial de 5,0mg/mL, sendo filtrados e homogeneizados em banho ultrassônico por 1 min.

O volume de injeção foi definido para 20 µL e a análise foi registrada, através de um detector de diodo com lâmpada de deutério (D2), na região do ultravioleta (200 a 400 nm). Para eluições em modo isocrático, as composições de solvente orgânico, acetonitrila e/ou metanol, foi estabelecida a partir da tabela de eluição isocrática proposto por Cass e Degani (2012).

#### 4.7 Caracterização via LC-MS/MS

As análises via LC-MS foram realizadas em um espectrômetro de massas XEVO G2-S QToF (Waters®) com fonte de *electrospray* (ESI). Leucina-encefalina (Waters®) foi usada como padrão de referência para massa exata de alta resolução. Uma alíquota de 1,0 mg da amostra foi solubilizada em 1 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (8:2), em seguida, a solução obtida foi filtrada em filtro de seringa, o procedimento se deu desta forma para todas as amostras. Para a separação cromatográfica, utilizou-se uma composição binária de água/acetonitrila como fase móvel e uma coluna de fase reversa octadecil (50 mm x 2,1 mm) Acquity UPLC – BEH1,7 µm(Waters®, USA). Uma alíquota de 5µL da amostra foi eluída em modo gradiente linear na faixa de composição de fase móvel 5-95% durante 10 minutos sob uma temperatura de 40°C, em fluxo de 0,3 mL/min.

A ionização da amostra foi realizada em modo positivo (ES+) na faixa de detecção de 50 a 1200 Da, com registro de 0.1 segundo. A temperatura da fonte foi estabelecida em 150° C, o fluxo de gás no cone de 20 L/h e o gás de dessolvatação foram ajustados em 550 L/h à temperatura de 250 °C, respectivamente. As voltagens do capilar e do cone foram definidas, respectivamente, em 2.0 kV e 40 V. A aquisição dos dados foi realizada através do software *Masslynx* versão 4.1.

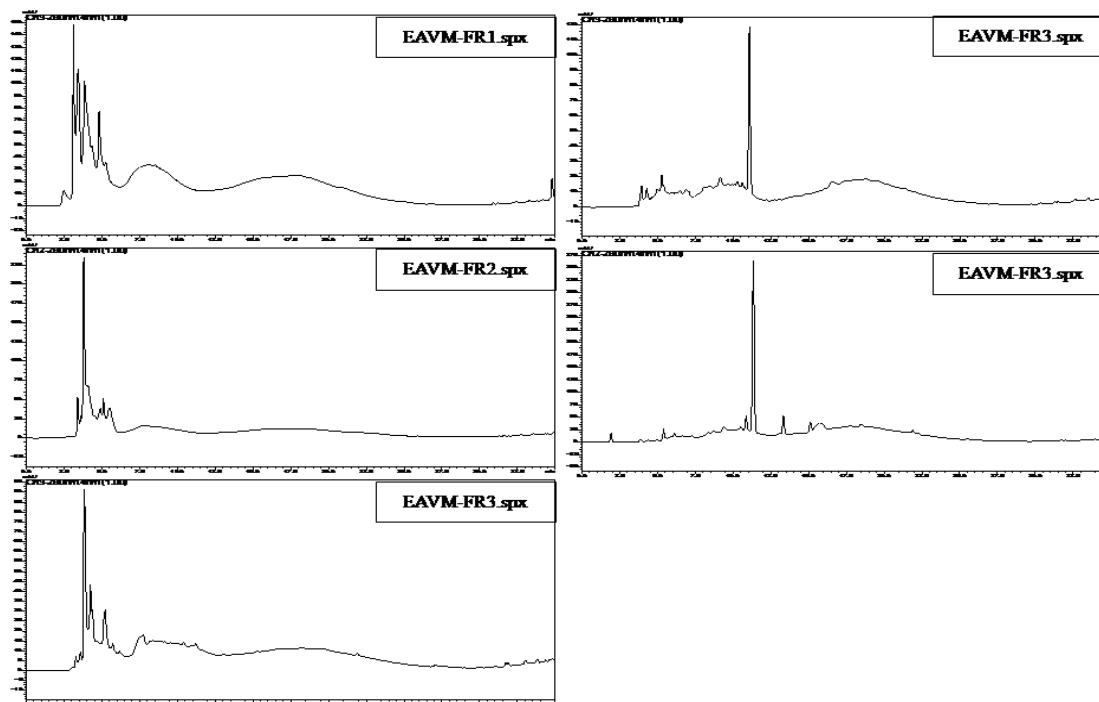
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Aspectos relevantes sobre a escolha dos extratos.

A escolha da extração aquosa por infusão já foi discutida neste trabalho, entretanto, os tipos de extração para investigação do resíduo se deve ao fato de os solventes escolhidos: metanol e hexano diferirem dos aspectos químicos da água - que é de ser um solvente de alta especificidade no modo de infusão. O extrato aquoso tem caráter hidrofílico do qual pode se esperar grandes quantidades de açúcares, compostos fenólicos e outras classes que, no metabolismo, foram glicosiladas para carreamento em fluxo hídrico pela estrutura fisiológica da planta. Devido à variação das dimensões das moléculas presentes, em extratos aquosos em geral, e similares solubilidades como substâncias: monoglicosiladas, diglicosiladas, ácidos fenólicos, taninos condensados, dentre outras possíveis, optou-se por cromatografia por exclusão ou peneira molecular – que se baseia em reter, gradativamente por absorção, na fase estacionária substâncias de menor raio molecular médio e eluir substâncias de maior raio molecular médio, como

técnica de separação, foi utilizado a fase estacionária SEPHADEX, que originou 5 frações que foram analisadas em HPLC gerando os cromatogramas a seguir:

**Figura 3:** Cromatogramas das frações do extrato aquoso.



*Cromatogramas das frações do extrato aquoso no modo gradiente em concentração de água e acetonitrila (5-100% de ACN), utilizando coluna SYNERGI HYDRO-RP 60 A 250x45 mm, tempo total de análise 30 min. Com absorção máxima de 670 mAU, comprimento de onda 260 nm.. Amostras de 2 miligramas solubilizadas somente em água.*

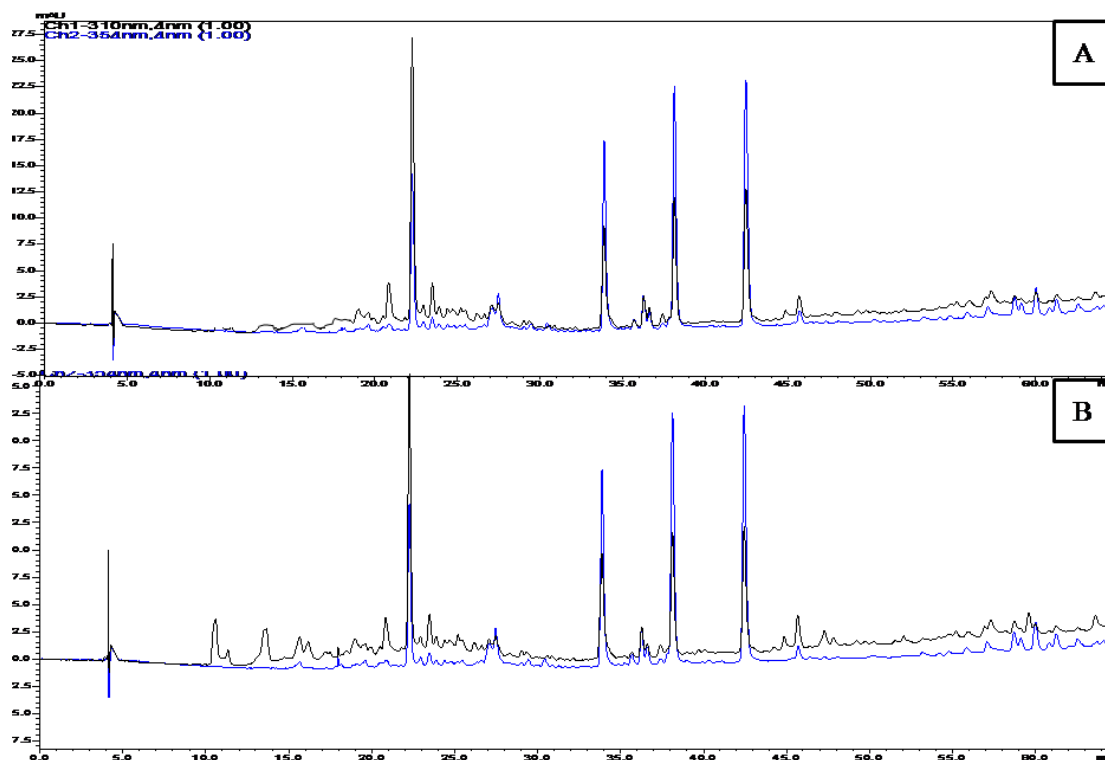
O perfil cromatográfico das frações mostrou que houve distinto comportamento de absorção registrada pelo DAD, o que sugere boa separação dos componentes do extrato e, segundo o fundamento da técnica utilizada, as primeiras frações são compostas por substâncias de maior raio molecular e como exemplos destes: taninos e compostos fenólicos glicosilados e as últimas frações por compostos de menor raio como: unidades de açúcares livres, e ácidos fenólicos.

O extrato aquoso integral tem a melhor solubilidade, e ainda sim baixa, em água, sendo testada a solubilidade em: DMSO, piridina, propanona, EtOH, MeOH, ACN e sistemas binários destes com água. A solubilidade do extrato em água aumenta com a temperatura, e na queda desta a viscosidade aumenta propiciando a formação de espumas quando agitado, o que é característico de saponinas ou outros compostos tensoativos. O extrato aquoso oferecia resistência ao ser filtrado, o que demonstra formação de colóides por, mais provavelmente, insolubilidade - levando em consideração que a massa a ser solubilizada foi 1 mg por mL.

## 4.2 Extratos metanólicos: do material botânico e da torta.

O metanol é um solvente de alta para média hidrofiliicidade, podendo também ser considerado universal quando referente a metabólitos secundários. (ZHANG, LIN, YE, 2018). O extrato metanólico do material botânico integral foi comparado, na figura a seguir, com o extrato metanólico do resíduo da extração aquosa:

*Figura 4: Cromatogramas dos extratos metanólicos.*

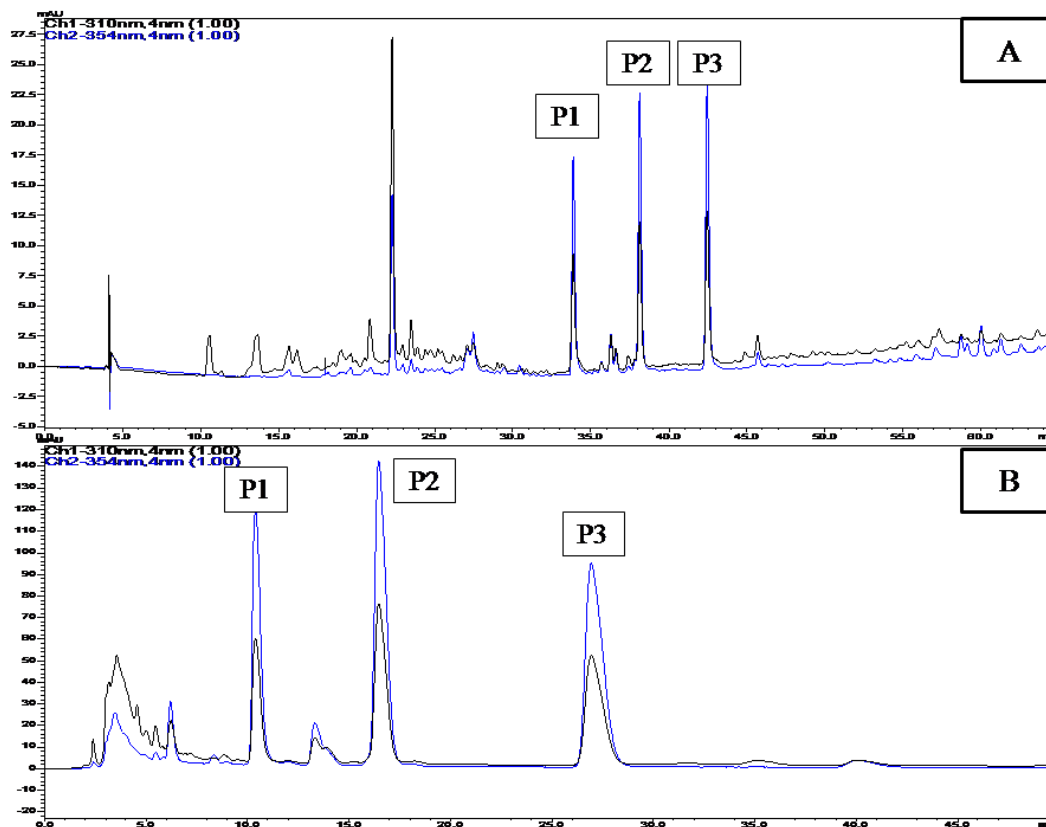


*Análises no modo gradiente de 60 minutos em concentração de 5 a 100% de ACN, amostras de concentração 2000 ppm, utilizando coluna de dimensões 250x45mm empacotada com C18, comprimentos de onda analisado 310 e 354 nm. A - Cromatograma do extrato metanólico da torta. B – Cromatograma do extrato metanólico da torta.*

O perfil dos extratos revela uma similaridade, o que comprova que mesmo depois da extração aquosa ainda há compostos presentes na torta que são extraídos com metanol, embora certa quantidade de compostos no extrato da torta deixa de ser registrada na mesma intensidade de absorção quando comparado ao extrato direto.

Foi desenvolvido um método isocrático segundo a metodologia de Snyder, Kikerland e Glajch (1987) apud Cass e Deganni (2010), baseado em um gradiente de 5 a 100% de ACN balanceado com água por 60 minutos utilizando coluna de fase estacionária C18 de dimensões de 250x45mm, tendo como primeiro e último pico de interesse: os que, respectivamente, se localizam no eixo correspondente ao tempo que representa 34 minutos e 42,5 minutos. Ambos os cromatogramas são expostos a seguir:

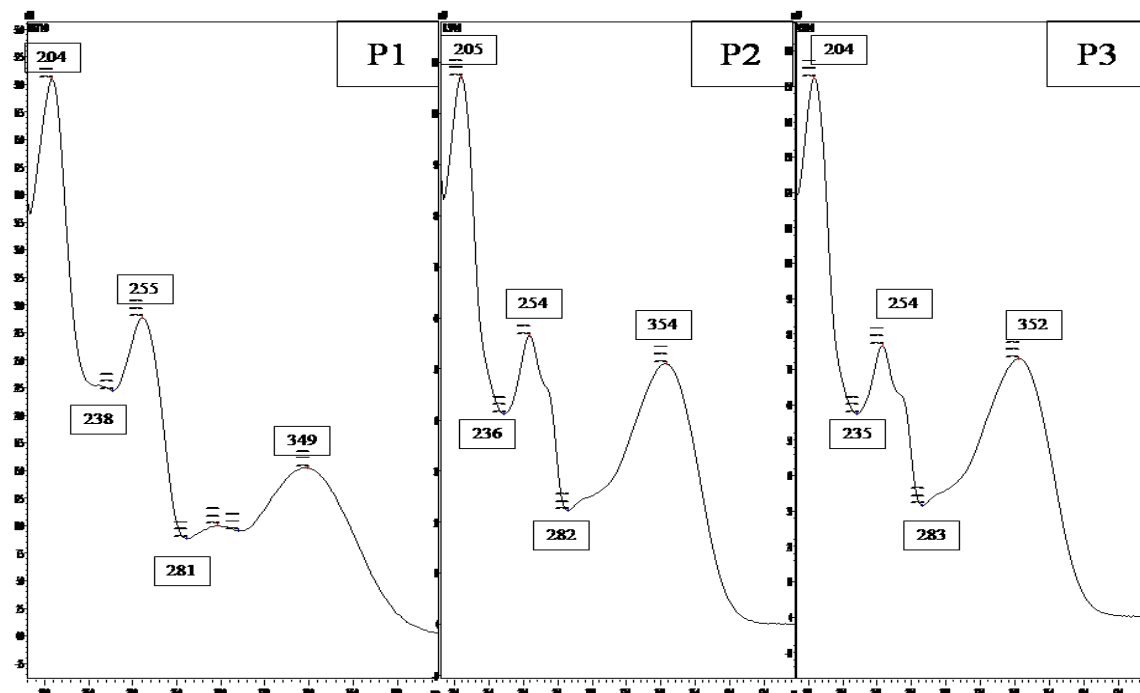
Figura 5: Cromatograma do extrato residual (gradiente e isocrático)



**A** - Gradiente do extrato metanólico da torta aquosa amostra de 3 mg/mL, fluxo de 1 mL/min.  $\lambda=310$  nm,  $\lambda=254$  nm. Picos de interesse identificados: P1, P2 e P3. **B** – Isocrático de 45% de ACN balanceado com água com pressão de 119 Kg/cm<sup>2</sup>, tempo máximo de 45 minutos de análise.

O perfil de absorção da radiação ultravioleta incidida pela lâmpada de dêutério do equipamento foi registrado, no tempo correspondente, no isocrático, a picos nos minutos: 10,5, 16,5 e 27, e o comportamento sugere ser esqueleto flavoinoídico, como pode ser visto na próxima figura.

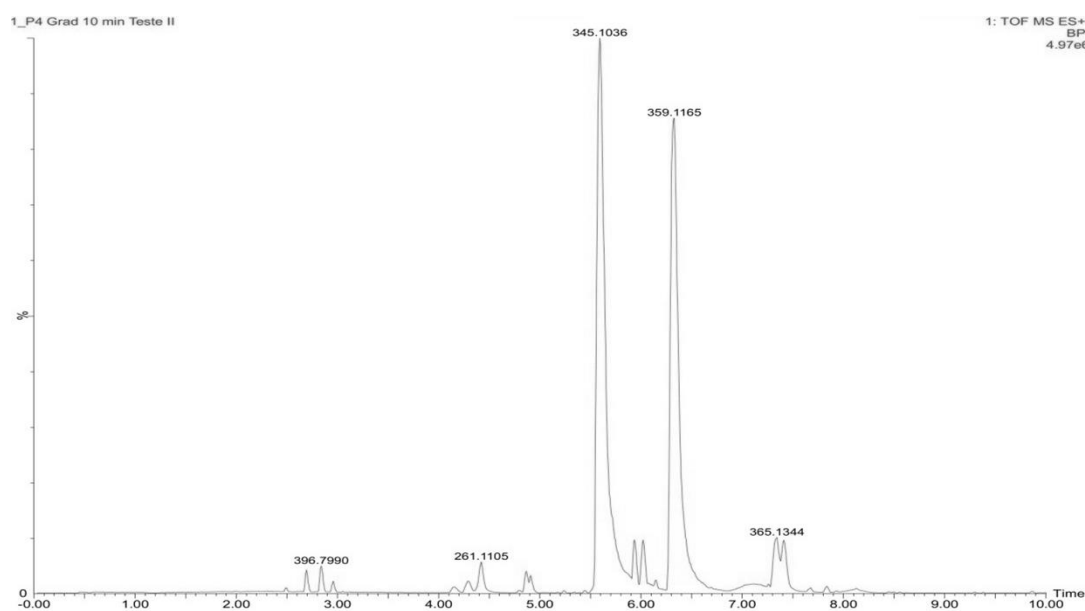
**Figura 6:** Perfis de absorção no ultravioleta.



Perfis de absorbância dos picos: **P1**, **P2** e **P3** na varredura dos comprimentos de onda de 200 nm a 400 nm, correspondente ao espectro ultravioleta, apresentando máximos e mínimos locais rotulados.

Foram coletados os volumes afluentes correspondente aos picos **P2** e **P3**, registrando 2 e 3 mg respectivamente, estes foram inoculados em *pool* para análise em LC-MS/MS, o cromatograma de íons totais é exibido a seguir:

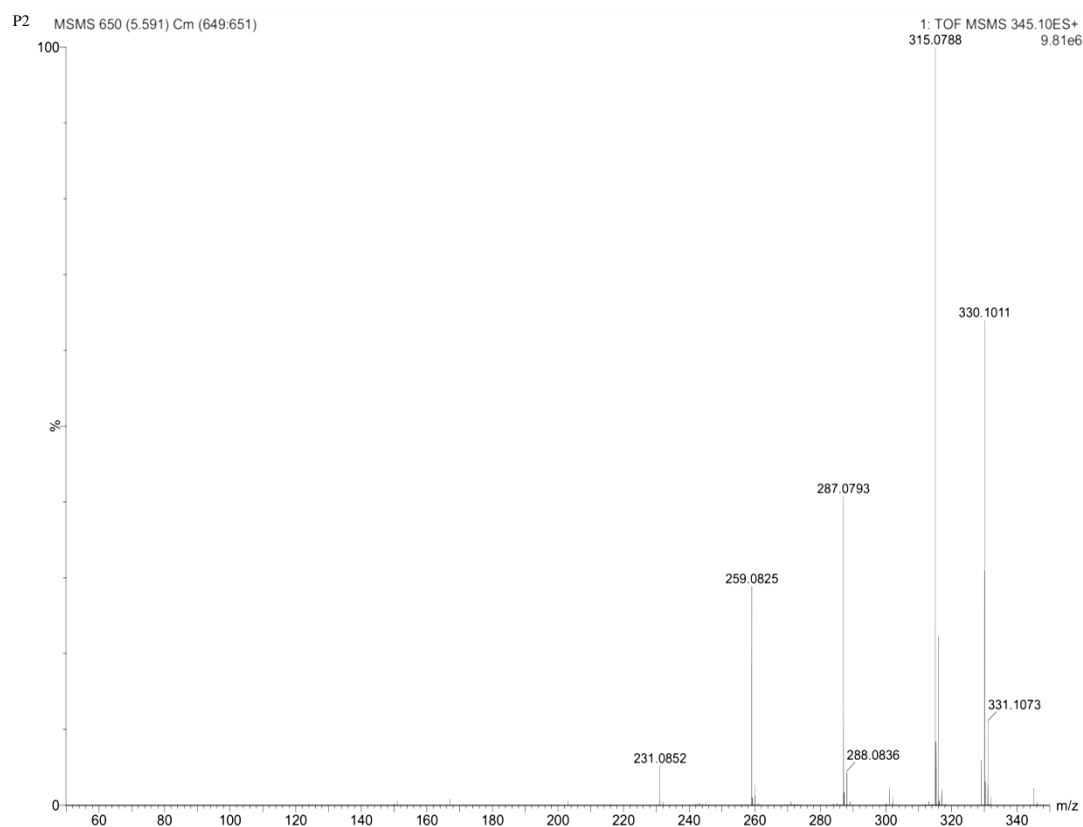
**Figura 7:** Cromatogramas de íons totais do pool dos picos **P2** e **P3**.



Cromatograma de íons totais do pool de **P2** e **P3** ionizado no modo positivo.

Com o cromatograma de íons totais mostrando a razão massa/carga dos compostos ionizados pode-se executar a fragmentação dos mesmos para determinar a estrutura possível para cada um, para isso é necessário que se faça a seleção da massa que se queira fragmentar, pois o quadrupolo deve ter a energia certa para separar as razões massa/carga e recirculá-la para a ionização de fragmentação que promoverá clivagens das moléculas gerando fragmentos detectáveis que auxiliaram a elucidação das estruturas moleculares referentes às massas iniciais. A ionização no modo positivo adiciona uma unidade de próton nas moléculas, e estas passarão a ter carga positiva dando origem ao íon precursor, e na fragmentação dará origem a íons derivados, que por sua vez possuem massas menores e serão gerados pelas clivagens das ligações mais suscetíveis ao rompimento pela energia ionizante.

**Figura 8:** fragmentograma do pico P2.

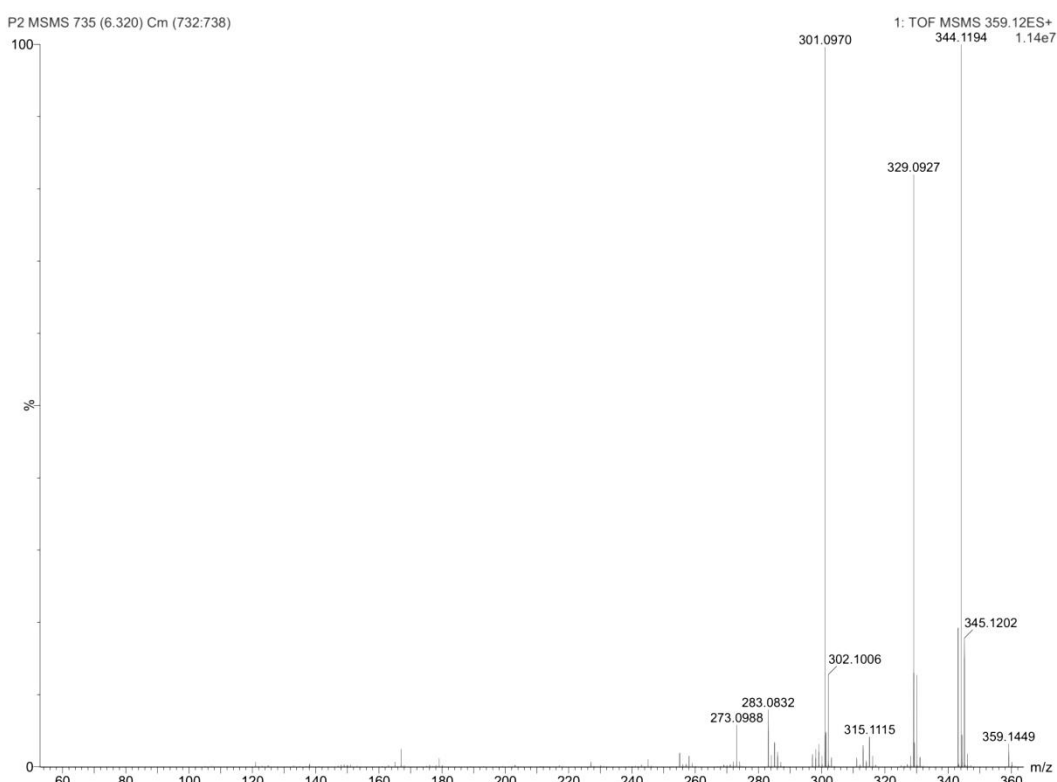


*Fragmentograma da massa 345,1036 daltons, fonte LC, 3,5 kV de voltagem da fonte de ionização, 40 V de energia de colisão, temperatura do capilar 250°C, modo de ionização positiva.*

Analisando o fragmentograma pode-se constatar que inicialmente há o desprendimento de 15 daltons do que seria o íon precursor 345,1036, gerando o íon derivado 330,1011 e em seguida pode-se observar um segundo desprendimento de 15 daltons, o que se propõe que sejam unidades de metilas ( $\text{CH}_3$ ) que estão sendo segregadas dos íons detectados. Após existem mais três subtrações em massas de 28 daltons correspondente à essas massas unidades de CO, ou 2 unidades metilênicas -  $\text{CH}_2$ .

O fragmentograma referente a massa do íon precursor 359,1165, foi executado também em detecção por análise de ToF, e selecionado por Quadrupolo, o mesmo é mostrado a seguir.

**Figura 9:** Fragmentograma do pico P3.



*Fragmentograma da massa 359,1165 daltons, fonte LC, 3,5 kV de voltagem da fonte de ionização, 40 V de energia de colisão, temperatura do capilar 250°C, modo de ionização positiva.*

No fragmentograma registrou-se a perda de massa correspondente a 15 daltons, o que se supõe ser unidade de metila que é clivada do íon precursor para o íon de maior abundância no fragmentograma (359-344=15), e do íon de maior abundância do fragmentograma de massa 344,1194 ao outro íon derivado de 329,0927 daltons, observa-se a subtração de outra possível unidade de metila. E do íon de 329,0927 para 301,0970 pode se propor a perda de CO ou 2 unidades de metileno ( $\text{CH}_2$ ).

Até o presente momento não foi encontrado padrão de fragmentação em banco de dados para os compostos aqui fragmentados, entretanto isso não infere que sejam inéditos, apenas que ainda não tiveram seus dados de fragmentação alimentados em plataformas on-line.

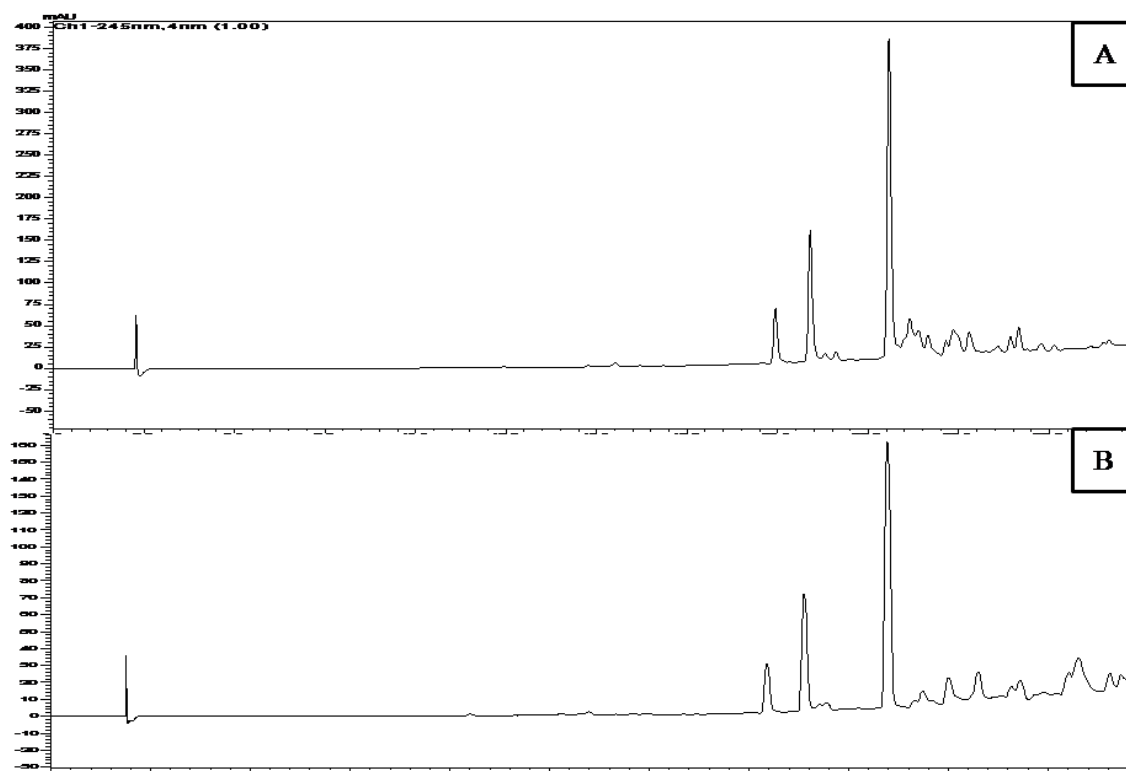
#### 4.4 Extratos hexânicos.

Já o n-hexano é um solvente específico de alta lipofilicidade que seria o agente de solvatação que melhor extrairia as substâncias que não se encontrariam no extrato aquoso ou estariam em pequenas concentrações. Com este solvente foi efetuado extrações do material botânico e da torta a frio para comparar os perfis e à quente da torta para aumentar a eficácia da extração acentuando a seleção de compostos mais lipofílicos.

##### 4.4.2 Extrato à frio do material botânico e da torta.

Para efeito de comparação dos materiais, foram executados os extratos e estes foram analisados em HPLC para obtenção dos cromatogramas.

*Figura 10: Cromatogramas dos extratos hexânicos a frio.*

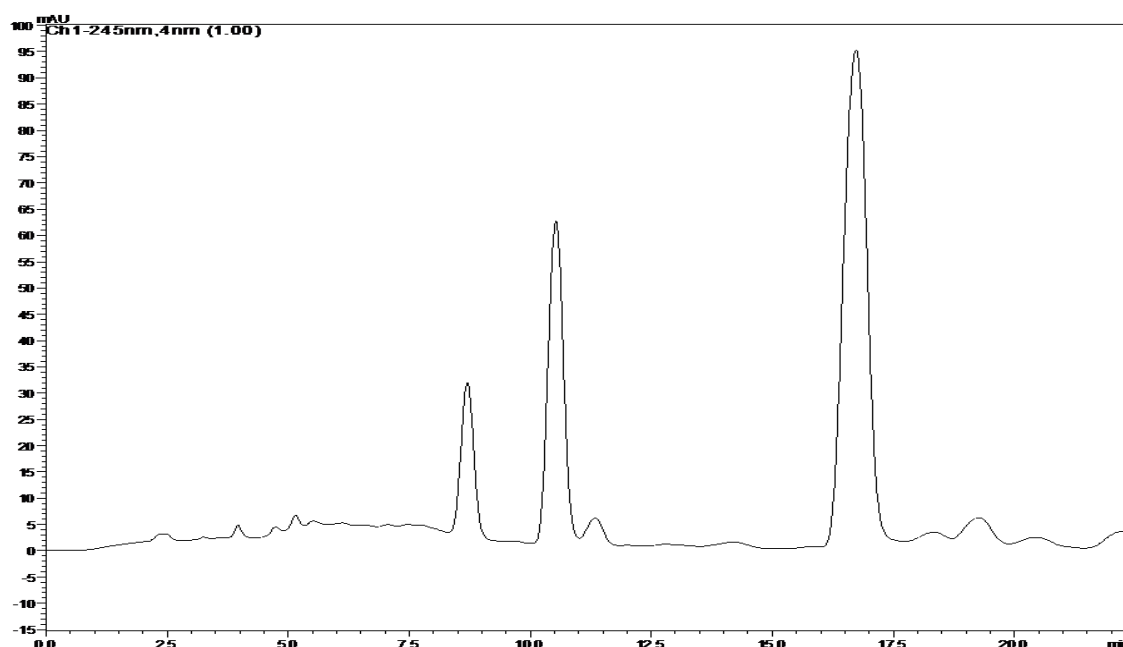


Cromatograma **A** – referente ao extrato do material botânico. Cromatograma **B** – referente ao extrato da torta. Análises foram executadas em coluna de dimensões 250x45mm, com fase estacionária C18, fase móvel água e ACN no modo gradiente de 5 a 100 % de ACN em 60 minutos. Ambas as amostras foram solubilizadas em água:ACN (2:8) e tiveram o comprimento de onda analisado de 445nm.

Os perfis cromatográficos dos extratos hexânicos são ainda mais parecidos que os extratos metanólicos respectivos- o que já era esperado levando em consideração a diferente especificidade de extração da água, mas neste caso outro parâmetro não pode ser desconsiderado, a temperatura de extração por infusão. Mesmo sendo por menos tempo do que por decocção, a infusão tem elevada temperatura, o que poderia vir a degradar compostos tanto no extrato quanto na torta residual, entretanto observa-se que o perfil permanece quase que inalterado. E comparando com os extratos metanólicos, os três picos de majoritária absorbância no extrato hexânico, muito provavelmente são os três picos de interesses dos extratos metanólicos, analisando o tempo de retenção e o perfil de absorbância no espectro ultravioleta.

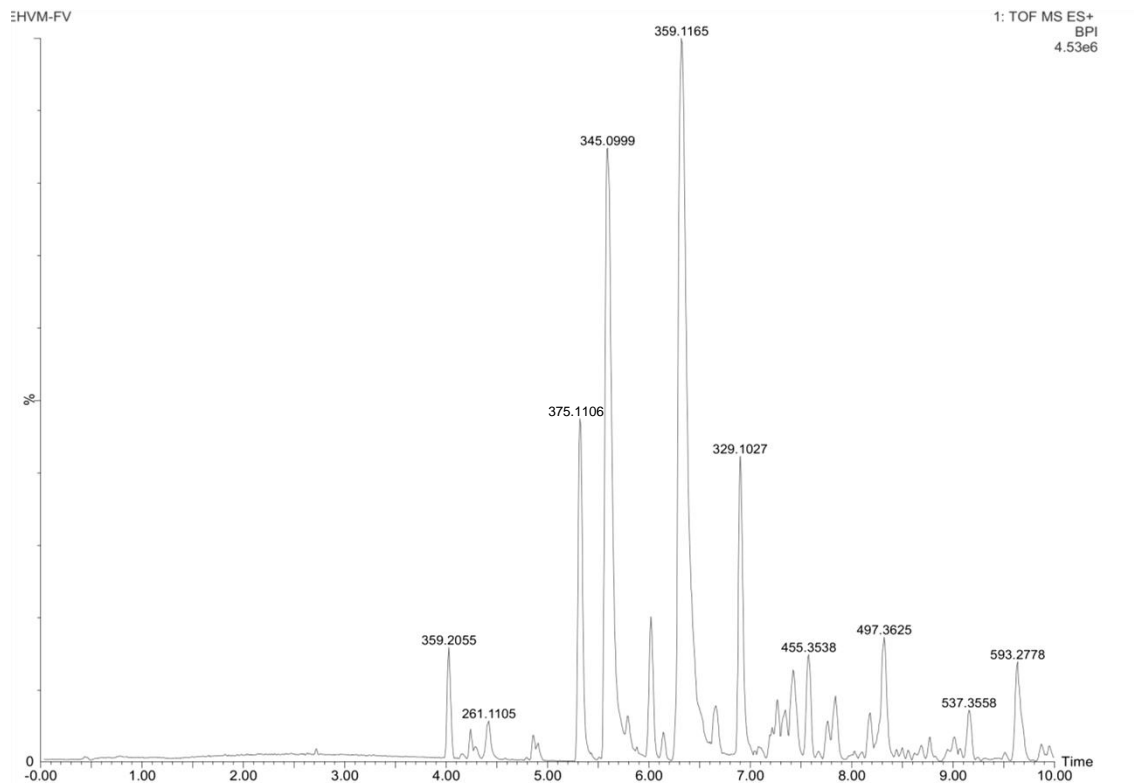
A mesma metodologia executada no extrato metanólico da torta foi aplicada para o extrato hexânico da torta, originando um método isocrático que por consequência é aplicável também ao extrato hexânico do material botânico – pela notável similaridade. O sistema do isocrático encontrado foi ajustado com o fim de reduzir o tempo de análise sem prejudicar a eficácia de separação, o cromatograma no modo isocrático é apresentado a seguir:

**Figura 11:** Cromatograma em modo isocrático do extrato hexânicos.



*Cromatograma do extrato hexânico a frio da torta, realizado em modo isocrático de fase móvel sendo 55% de ACN, balanceado com água, análise realizada em fluxo de 1 mL/min. Pressão de 119 Kg/cm<sup>2</sup>.*

Uma alíquota de 1 mg do extrato hexânico a frio da torta foi analisado via LC-MS em modo de ionização positiva, sendo detectado via ToF, o cromatograma de íons totais registrou as razões massa/carga protonadas dos íons e a análise revelou o que podemos ver na figura 12.

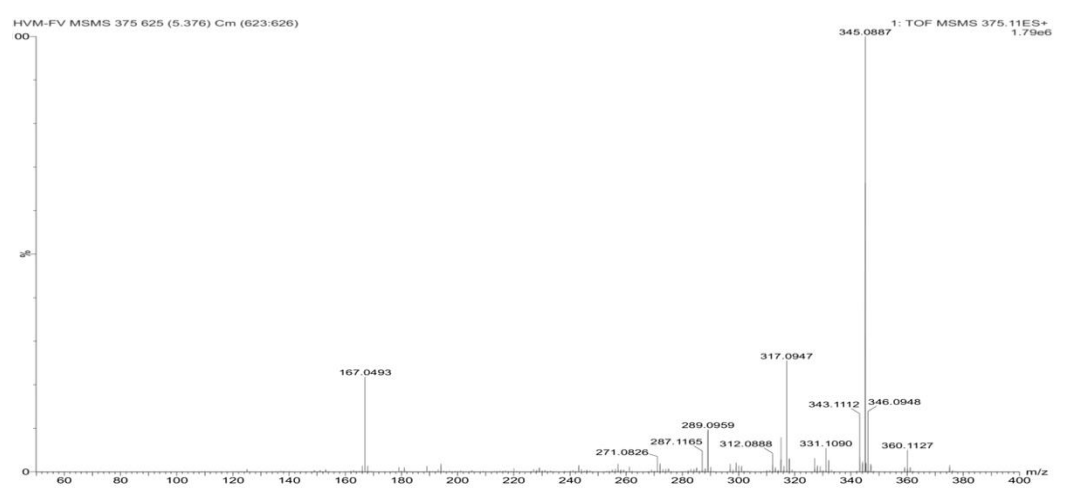


**Figura 12:** Cromatograma de íons totais do extrato hexânico a frio da torta, ionizados em modo positivo, e detectado por análise de ToF.

Analisando o cromatograma de íons totais do extrato hexânico pode-se constatar que não existem substâncias ionizando e sendo detectadas fora do registrado pelo DAD, o que sugere mais seguramente, a ausência de substâncias desprovidas de cromóforos, pois considerando que o extrato hexânico proporciona maior probabilidade de extrair compostos sem cromóforos, o que é indetectável por absorvância no ultravioleta.

Foi observado a massa 375,1106, e tendo esta como *target* executou-se a fragmentação para esta razão carga/massa, o intervalo de análise levado em consideração foi o tempo em que o pico de respectiva massa foi detectado. O fragmentograma é apresentado na figura 13.

**Figura 13:** Fragmentograma de uma massa detectada no extrato hexânico a frio.



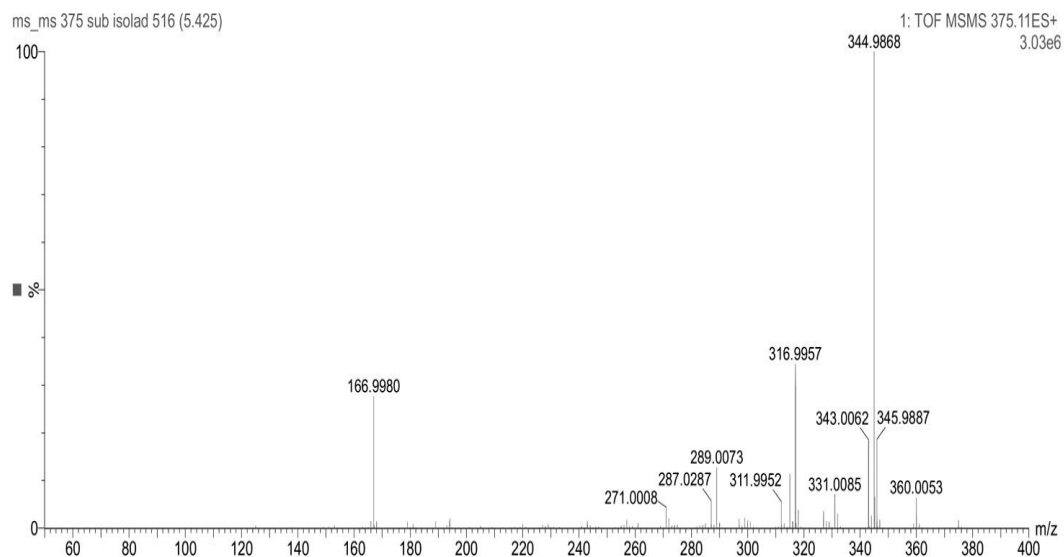
*Fragmentograma oriundo do extrato exânico da torta e correspondendo à razão carga/massa de 375,1106, fonte LC, 3,5 kV de voltagem da fonte de ionização, 40 V de energia de colisão, temperatura do capilar 250°C, modo de ionização positiva..*

Os fragmentos registram duas perdas consecutivas de 15 daltons, sendo o fragmento originado pela segunda subtração desta massa o mais abundante. O precursor a ser fragmentado não registra massa relevante devido à instabilidade do íon molecular protonado diante a energia de fragmentação estabelecida nos parâmetros.

Um padrão previamente isolado e elucidado de 7,2',4',5'-Tetrametoxi-6,6'-dihidroxi-flavona foi fornecido por Oliveira (2018, no prelo)<sup>1</sup> para comparar perfil de fragmentação e por desrepliação, identificar o composto no extrato hexânico da torta.

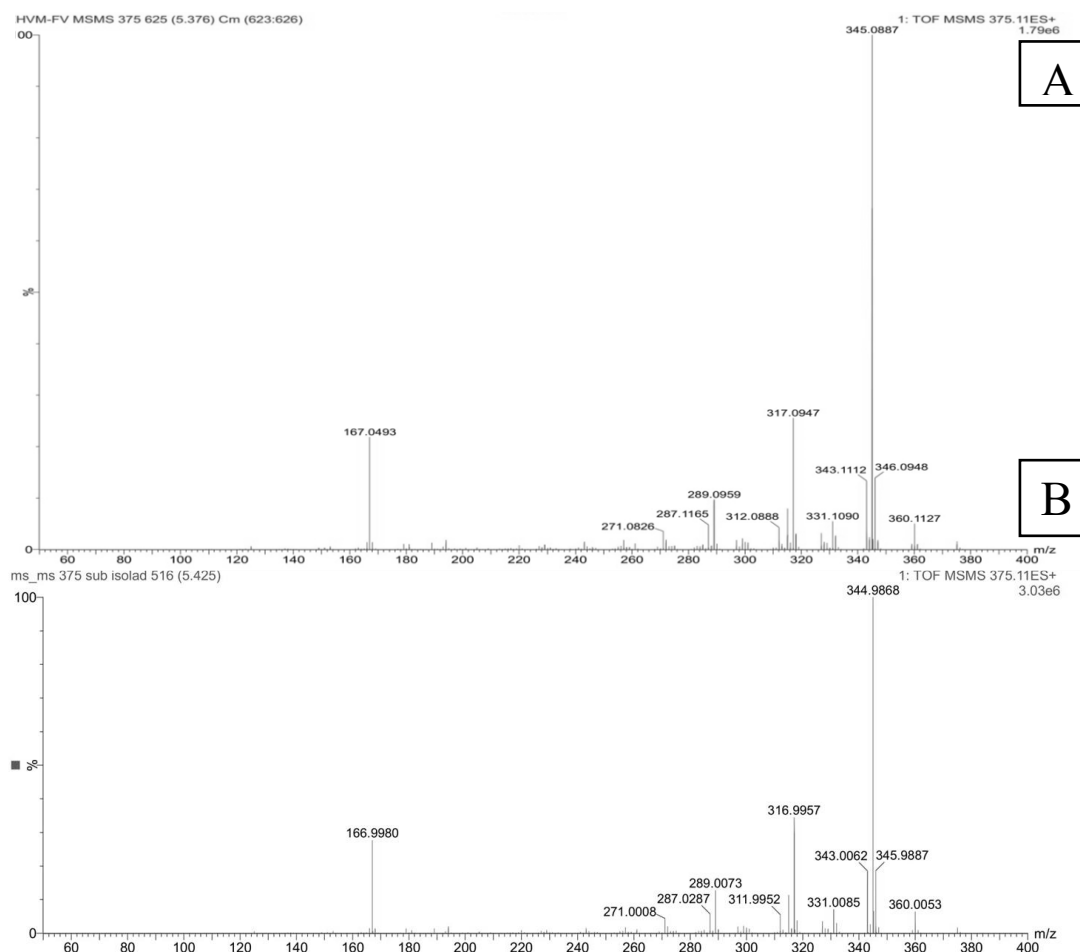
<sup>1</sup> Oliveira, Juliana. P. **Estudo fitoquímico e atividade imunomoduladora do extrato etanólico da espécie *Varronia multispicata***. Tese (doutorado em química dos produtos naturais) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Pará. 2018.

**Figura 14:** Fragmentograma do padrão da substância previamente elucidada.



O perfil de fragmentação do padrão de substância fornecido para comparação executado nas mesmas condições de análise e ionização da fragmentação do componente do extrato hexânico a frio da torta.

**Figura 15:** Comparação dos fragmentogramas.



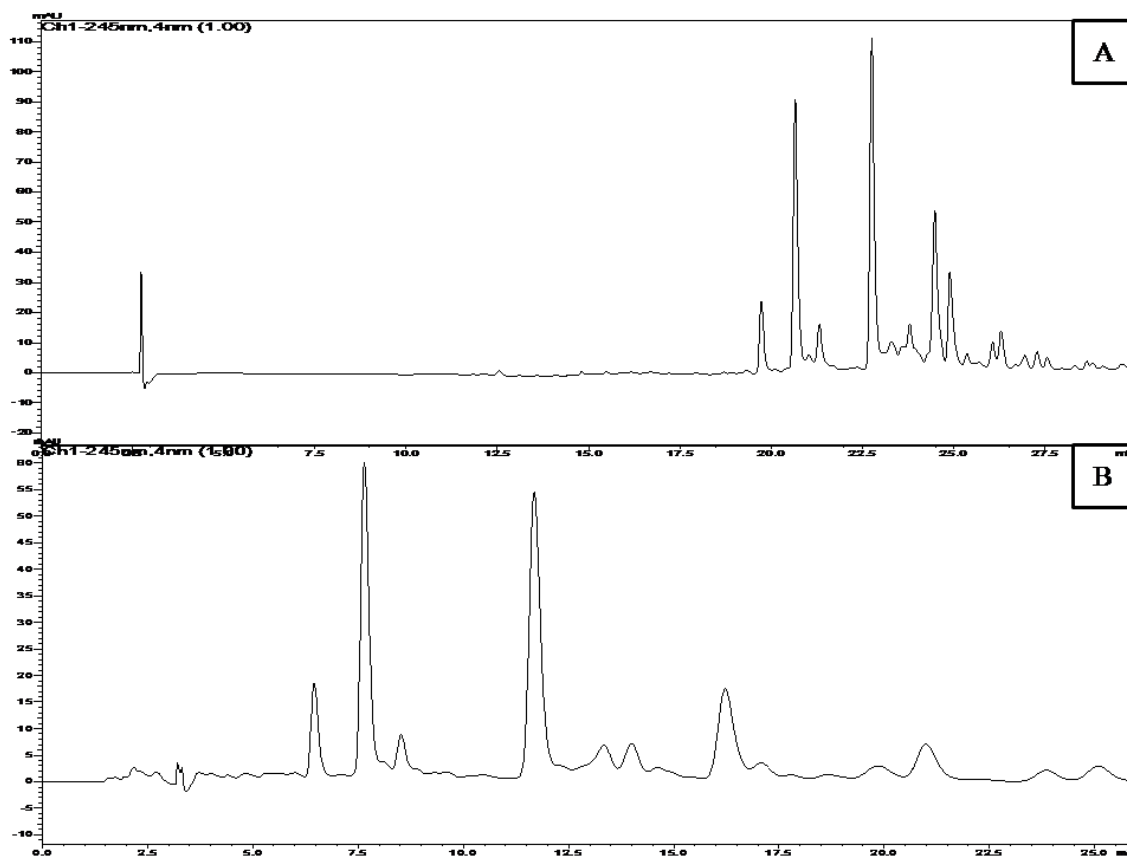
**A** - Fragmentograma da massa de 375,11, oriunda do extrato hexânico a frio da torta. **B** - Fragmentograma oriundo da massa do padrão fornecido pela autora Oliveira (2018).

Devido a correspondência dos picos registrados como íons derivados em ambos os fragmentogramas, pode-se afirmar que o composto 7,2',4',5'-Tetrametoxi-6,6'-dihidroxi-flavona é encontrado no extrato hexânico a frio da torta.

#### 4.4.3 Extrato por Soxhlet da torta.

O extrato hexânico por soxhlet da torta demonstrou coloração mais esverdeada que o extrato por exaustão à frio tanto da torta quanto do material botânico, isso pode se justificar pelo fato de haver maior energia entrópica no sistema, pois ocorre o aquecimento e a sucção do solvente neste sistema. O extrato teve o mesmo preparo de amostra que os demais extratos hexânicos e foi analisado em HPLC. Observado o comportamento familiar em gradiente de água e ACN, foi submetido ao isocrático encontrado pela metodologia executada ao extrato hexânico a frio da torta, os cromatogramas são expostos na figura que se sucede.

**Figura 16:** Cromatogramas do extrato hexânico por Soxhlet (gradiente e isocrático).



**A** - Gradiente do extrato hexânico por soxhlet executado em coluna 150x45mm em 60 min Fase móvel composta por água e ACN, amostra de concentração de 2000 ppm. **B** - isocrático desenvolvido para o extrato hexânico a frio da torta aplicado ao extrato hexânico por soxhlet e composto pela fase móvel de 55% de ACN em água, pressão de 87Kgf/cm<sup>2</sup>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato aquoso por infusão tem características relativamente boas quanto a desenvolvimento de um produto farmacológico, características como baixo custo quanto à solvente e energia térmica, pois a infusão necessita de menos energia térmica que a decocção e a água é um solvente de fácil tratamento para uso no processo.

Os extratos de mesmo solvente, mudando apenas o material de extração (material botânico e torta) se mostraram similares, o que comprova que a extração aquosa não extrai substâncias de classes e subclasse importantes como flavonóides metoxilados. Este trabalho identificou por desreplicação o composto 7,2',4',5'-Tetrametoxi-6,6'-dihidroxi-flavona que se encontra presente no extrato hexânico a frio da torta. O que torna possível especulações quanto a viabilidade de exploração econômica do resíduo gerado pelo extrato aquoso por infusão.

## 7 REFERÊNCIAS

ADIGA, P. G.; SHRIDHAR, N.B.; SANGANAL, J. S., RAO, S.; SHILPA, N., APARNA V.; SANTHOSH, I.M.; TIRUMALA M.; SINDHU, B.M. In vivo anti-tumor efficacy of *Croton oblongifolius* in DMBA induced mammary tumor in rats. **Indian J. Anim. Res.**, v. 52, n. 1, p. 144-147, 2018.

ARREBOLA, M.R.B., et. al. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia* L. (Boraginaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, n. 1, p.57-65, 2004.

BORHIDI, A.; GONDÁR, E.; OROSZ-KOVÁCS, Z.S. The reconsideration of the genus *Cordia* L. *Acta Botanica Hungarica*. 34: 375-423, 1988.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de método por HPLC – Fundamentos, estratégias e validação. EdUFSCar, São Carlos, 2010.

DA SILVA, T. B. C.; SOUZA, V. K. T.; DA SILVA, A. P. F.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Determination of the phenolic content and antioxidant potential of crude extracts and isolated compounds from leaves of *Cordia multispicata* and *Tournefortia bicolor*. *Pharmaceutical Biology*, v. 48, n. 1, p. 63–69, 2010.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)- trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, Amsterdam, v. 27, n. 569, p. 228-236, 2007.

GUPTA, R. Plant taxonomy: past, present, and future. **New Delhi: The Energy and Resources Institute (TERI)**, 2011. Disponível em:[http://books.google.com.br/books?id=m9u\\_247PryEC&pg=PA36&lpg=PA36&dq=icnb+vienna+code+2006&source=bl&ots=vyTYmCUMTU&sig=Z7jiz79kNjd3Gb3-apHUx0yYxE&hl=ptBR&sa=X&ei=LJLUdXbNZSlqQGEmoCQDw&ved=0CF4Q6AEwBg#v=onepage&q=icnb%20vienna%20code%202006&f=false](http://books.google.com.br/books?id=m9u_247PryEC&pg=PA36&lpg=PA36&dq=icnb+vienna+code+2006&source=bl&ots=vyTYmCUMTU&sig=Z7jiz79kNjd3Gb3-apHUx0yYxE&hl=ptBR&sa=X&ei=LJLUdXbNZSlqQGEmoCQDw&ved=0CF4Q6AEwBg#v=onepage&q=icnb%20vienna%20code%202006&f=false)> Acesso em: 26 mar. 2018.

JUSSIEU, A. L.. genera lantarum ordines naturales disosita, justa methodum in horto régio parisiensis exaratum. Herissant Typographum, p. 498, 1789.

KUROYANAGI, M.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; HAYASHI, T.; TAKASE, Y.; MASUDA, K. Dammarane-type triterpenes from the Brazilian medicinal plant *Cordia multispicata*. J Nat Prod, v. 66, n. 10, P.1307-1312, 2003.

KUROYANAGI, M.; SEKI, T.; HAYASHI, T.; NAGASHIMA, Y.; KAWAHARA, N.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Anti-androgenic triterpenoids from Brazilian medicinal plants. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.49, n.8, p.954-957, 2001.

MACHADO, I. C.; LOIOLA, M. I. Fly pollination and pollinator sharing in two synchronopatric species: *Cordia multispicata* (Boraginaceae) and *Borreria alata* (Rubiaceae) Revta brasil. Bot., São Paulo, V.23, n.3, p.305-311, set. 2000.

MELO, J. I. M.; LYRA-LEMOS, R. P. Sinopse taxonômica de Boraginaceae *sensu lato* A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. Acta bot. bras.v. 22, n.3, p.701-710, 2008.

MELO, J.I.M. de; SILVA, L.C. da; STAPF, M.N.S.; RANGA, N.T. *Boraginaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MILLER, J. S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the *Cordiaceae* (Boraginales): Resurrection of the genus *Varronia* P. Br. (*Cordiaceae*). Taxon 56: 163-169, 2007.

PARISOTTO, E. B.; Michielin, E. M. Z.; Biscaro, F. B.; Ferreira, S. R. S.; Filho, D. W.; Pedrosa, R. C. The antitumor activity of extracts from *Cordia Verbenacea* D. C. obtained by supercritical fluid extraction. The Journal of Supercritical Fluids. 61: 101-107, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 4 , p. 146-152, 2012. Disponível em: [HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067179](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067179). doi: 10.1021/jf1037745

QUEIROZ, E., FARO, R., MELO, C. A biodiversidade brasileira como fonte de novas drogas: passado, presente e futuro. *Revista de Fitoterapia*, v. 9, 2009.

RIBEIRO, M. C. M.; CALDAS, M. J. T.; MARTINS, C. O. Estudo farmaco-botânico do chá de caboclo (*Cordia multispicata*, CHAM). *Revista cadernos de pesquisa*. V. 6, n. 2, p. 17-21, jul./dez,1990.

SNYDER, L. R.; KIKERLAND, J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. 2º ed. John Wiley & Sons, p. 282 – 287, 1997.

THIRUPATHI, K., S. SATHESH KUMAR, V. S. RAJU, B. RAVIKUMAR, D. R. KRISHNA, G. KRISHNA MOHAN, 2008. A review of medicinal plants of the genus *Cordia*: Their chemistry and pharmacological uses. *Journal Of Natural Remedies*. Vol. 8/1. 1-10.

VIEIRA, I. C.G.; DA SILVA, J. M. C. Phenology, fruit set and dispersal of *Cordia multispicata* Cham., an important weed shrub of abandoned pastures in eastern Amazonia *Revta Brasil. Bot.*, São Paulo, V.20, n.1, p.51-56, jun. 1997.

ZHANG, Q. W; LIN, L. G; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*. 2018.