



Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - CIPHARMA



“Estudo morfoanatômico e fitoquímico de folhas
de *Abatia americana* (Gardner) Eichler
(Salicaceae)”

Mestranda: Regislainy Gomes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa

Ouro Preto, 16 de fevereiro de 2016.

REGISLAINY GOMES DA SILVA

“Estudo morfoanatômico e fitoquímico de folhas
de *Abatia americana* (Gardner) Eichler
(Salicaceae)”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial ao título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ouro Preto, 16 de fevereiro de 2016.

S586e Silva, Regislainy Gomes da.
Estudo morfoanatômico e fitoquímico de folhas de *Abatia americana* (Gardner) Eichler (Salicaceae) [manuscrito] / Regislainy Gomes da Silva. - 2016.
94f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.
Coorientador: Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas .
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. *Abatia americana* (Gardner) Eichler. 2. Metabolismo secundário. 3. Flavonoides. 4. Folhas - Anatomia. 5. Histoquímica. I. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. II. Sousa, Hildeberto Caldas de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 581.4

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 108ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Regislainy Gomes da Silva**, com a defesa da dissertação intitulada: “Estudo morfoanatômico e fitoquímico de folhas de *Abatia americana* (Gardner) Eichler (Salicaceae)”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 16 de fevereiro de 2016.

Prof. Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias
UFOP

Prof. Dra. Rachel Oliveira Castilho
UFMG

“Acho que a felicidade é uma espécie de susto; quando você vê, já aconteceu.
Ela é justamente uma construção pequena de todos os dias.” Pe. Fábio de
Melo

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Divino Espírito Santo pela graça do discernimento;

À minha mãe, Geni Gomes Pinto da Silva, pelas inúmeras bênçãos que me concede lá do céu, bem pertinho de Nossa Senhora;

Ao meu pai, José Raimundo da Silva, pela paciência, amor sem medidas, apoio incondicional, por estar sempre do meu lado e nunca me deixar perder a fé;

A minha irmã, Regiany Gomes da Silva, pela paciência, carinho e força em diversos momentos dessa caminhada e da minha vida, me acalmando e incentivando sempre à medida em que era necessário;

Ao meu sobrinho, Yuri Nathan Silva Carvalho, (meu bb) pelo carinho, dedicação e apoio em todos os momentos;

Agradeço também ao meu pai, Giany e Yuri pelas inúmeras idas ao campo (fofuras!!!)

Ao meu irmão, Regisvander Gomes da Silva, pelo incentivo e por me fazer mais curiosa a pesquisar;

A minha irmã, Regisleny Gomes da Silva e Sousa, pela presença, carinho e torcida;

Ao meu irmão, Reginaldo Gomes da Silva, pelo incentivo e votos de sucesso;

Ao meu irmão Regisley Gomes da Silva, pelo apoio e incentivo;

Aos meus sobrinhos: Yuri Nathan, Larissa Sousa, Lílian Sousa, Leonardo Sousa, Vítor Gomes, Matheus Gomes, Bruna Gomes, Luísa Gomes, Alícia Silva e Breno Silva pelas alegrias e por tornar tudo mais leve e bonito;

Aos meus padrinhos, Sérgio Henrique e Maria Aparecida, pelo apoio, torcida e orações;

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza pela confiança, paciência, presença e, acima de tudo, pelo incentivo;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa pelos ensinamentos, pela alegria e por me apoiar, me encorajando a seguir em frente;

Ao Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão pela paciência, pela análise das amostras e enorme apoio na identificação dos flavonoides;

Ao Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo) pelas oportunidades, onde aprendi muito;

Aos amigos do Laboratório de Fitotecnologia (em especial, Fernanda Barçante Perasoli, Fernanda Senna Ferreira, MSc. Janaína Brandão Seibert, MSc. Karen Vitor Carvalho, MSc. Luana Christian C. Silva, MSc. Lucas Andrade Ferreira,

MSc. Simone Pinto Carneiro, Tatiane Roquete Amparo e Tamires Cunha Almeida) pela força na caminhada e por tornar o laboratório tão acolhedor. Muito obrigada, “Nozes”!!!

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal (em especial Bruna Rossi e MSc. Jaqueline Alves Pereira) pelo carinho e pela força;

Ao Laboratório de Ecologia Aquática (DEBIO/ICEB/UFOP) pelas fotomicrografias;

Ao Prof. PhD. Orlando David Henrique dos Santos pela paciência e confiança nas fotomicrografias;

Ao Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, coordenado pela Profa PhD. Alaíde Braga de Oliveira, pelas análises das amostras.

Ao Prof. Dr. José Mário Barichello pelo apoio e à Profa. Dra. Maria Cristina Braga Messias pelas dicas;

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Humberto pela boa vontade em ajudar;

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos amigos da Escola de Farmácia, pelo carinho;

E a todos que, de alguma forma tiveram o zelo de contribuir nesse estudo, o meu muito obrigada!!!

Sumário

| | |
|---|-----|
| ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE TABELAS..... | xiv |
| RESUMO..... | xv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| 1 - INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 - OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1 – Objetivo Geral..... | 3 |
| 2.2 – Objetivos Específicos..... | 3 |
| 3-REVISÃO DA LITERATURA..... | 4 |
| 3.1 – A utilização das plantas como medicamento..... | 4 |
| 3.1.1 – Elaboração de medicamentos a partir de plantas medicinais..... | 5 |
| 3.2 – O metabolismo secundário..... | 8 |
| 3.2.1 – Os flavonoides..... | 9 |
| 3.3 – Importância dos estudos botânicos no controle de qualidade da droga vegetal..... | 17 |
| 3.3.1 - Histolocalização..... | 18 |
| 3.4 – A Família Salicaceae..... | 18 |
| 3.4.1 – Estudos de componentes químicos da família Salicaceae..... | 20 |
| 3.4.2 – Atividade farmacológicas de espécies da família Salicaceae..... | 20 |
| 3.4.3 – Estudos botânicos de folhas de <i>Abatia americana</i> | 22 |
| 3.4.4 – Estudo fitoquímico de folhas de <i>Abatia americana</i> | 22 |
| 4 – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 26 |
| 4.1 – Coleta do material vegetal..... | 26 |
| 4.2 – Estudos botânicos..... | 26 |
| 4.2.1 – Cortes histológicos..... | 26 |
| 4.2.1.1 – Estudos ontogenéticos..... | 27 |
| 4.2.2 – Dissociação de epidermes..... | 27 |
| 4.2.3 – Diafanização..... | 27 |
| 4.2.4 – Coloração histológica..... | 28 |
| 4.2.5 – Estudos histoquímicos..... | 28 |
| 4.3 – Estudos fitoquímicos..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1 – Extração sequencial – Percolação..... | 30 |
| 4.3.2 – Pesquisa de compostos fenólicos nas frações obtidas..... | 32 |
| 4.3.3 – Estudo fitoquímico da fração rica em flavonoides..... | 32 |
| 4.3.3.1 – Determinação do perfil cromatográfico..... | 32 |
| 4.3.3.2 – Fração metanólica..... | 33 |
| 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 35 |
| 5.1 – Resultados – Estudos botânicos..... | 35 |
| 5.1.1 – Resultados – Estudos histoquímicos..... | 41 |
| 5.2 – Discussão Estudos botânicos..... | 45 |
| 5.3 – Resultados – Estudos fitoquímicos..... | 47 |
| 5.3.1 – Fração metanólica..... | 47 |
| 5.4 – Discussão – Estudos fitoquímicos..... | 65 |
| 6 – CONCLUSÃO..... | 67 |
| 7 – REFERÊNCIAS..... | 69 |

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| % | Porcentagem |
| AcOEt | Acetato de Etila |
| <i>A. americana</i> | <i>Abatia americana</i> (Gardner) Eichler |
| APCI | Ionizador químico à pressão atmosférica |
| C-18 | Sílica ligada a octadecilsilano |
| CC | Cromatografia em coluna clássica |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CCDA | Cromatografia em camada delgada analítica |
| CCDC | Cromatografia em camada delgada comparativa |
| CLAE | Cromatografia a líquido de alta eficiência |
| Cm | Centímetros |
| DEBIO | Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente |
| DEFAR | Departamento de Farmácia |
| EFS | Extração em fase sólida |
| ESI | <i>Electron spray ionization</i> (Ionização por elétron-spray) |
| ESI MS/MS | <i>Electron spray ionization</i> em massa/massa |
| eV | Elétron-volt |
| FAA ₇₀ | Formaldeído, ácido acético glacial e álcool 70% |
| G | Gramas |
| g/mol | Gramas/mol |
| Hex | Hexano |
| HPLC | <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> |
| HPLC-MS | <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> acoplada a espectrometria de massas |
| HPLC-MS/MS | <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> acoplada a massa/massa |
| ICEB | Instituto de Ciências Exatas e Biológicas |
| KV | Quilovolt |
| L. | Lineu |
| M | Metro |
| <i>m/z</i> | Razão massa/carga |
| mA | Mili-Ampère |

| | |
|--------|--|
| MAE | <i>Microwave extraction</i> (extração por micro-ondas) |
| MeOH | Metanol |
| Min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| MOBOT | <i>Missouri Botanical Garden</i> |
| Nm | Nanômetros |
| NP-PEG | difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol e polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol |
| °C | Graus Celsius |
| PLE | <i>Pressurized Liquid Extraction</i> (extração com líquido pressurizado) |
| Psi | <i>Pound force per square inch</i> |
| Sw. | Swartz |
| SPE | <i>Solid Phase Extraction</i> |
| TR | Tempo de retenção |
| UPLC | <i>Ultra Pressure Liquid Chromatography</i> |
| UV | Ultra-violeta |
| V | Volts |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1: | Biossíntese de flavonoides..... | 10 |
| Figura 2: | Sistemas benzoil e cinamoil em flavonoides..... | 16 |
| Figura 3: | Alguns componentes químicos isolados e identificados em extratos de várias polaridades de folhas de <i>Abatia americana</i> | 23 |
| Figura 4: | Fluxograma da metodologia de estudos botânicos de folhas de <i>Abatia americana</i> | 29 |
| Figura 5: | Fluxograma da metodologia de estudos fitoquímicos de folhas de <i>Abatia americana</i> | 34 |
| Figura 6: | Aspecto geral de <i>Abatia americana</i> (Gardner) Eichler..... | 35 |
| Figura 7: | Folha de <i>Abatia americana</i> diafanizada..... | 36 |
| Figura 8: | Corte transversal do limbo foliar de <i>Abatia americana</i> | 36 |
| Figura 9: | Vista frontal da epiderme foliar de <i>Abatia americana</i> | 37 |
| Figura 10: | Corte transversal da nervura central da folha de <i>Abatia americana</i> | 38 |
| Figura 11: | Cortes transversais da folha de <i>Abatia americana</i> | 39 |
| Figura 12: | Corte transversal de folha do primeiro nó, não totalmente expandida de <i>Abatia americana</i> | 40 |
| Figura 13: | Corte transversal do pecíolo de <i>Abatia americana</i> | 41 |
| Figura 14: | Reação de compostos fenólicos com cloreto férrico..... | 41 |
| Figura 15: | Estrutura do floroglucinol..... | 42 |
| Figura 16: | Reação de taninos condensados com a vanilina em meio ácido..... | 42 |
| Figura 17: | Testes histoquímicos em cortes transversais de folhas de <i>Abatia americana</i> | 44 |
| Figura 18: | Espectro <i>full scan</i> da fração metanólica purificada de <i>Abatia americana</i> | 47 |
| Figura 19: | Espectro de UV da substância 1, com tempo de retenção 2.33min em folhas de <i>Abatia americana</i> | 49 |
| Figura 20: | Espectro de massas da substância 1 (TR: 2.36min. e m/z 609) de folhas de <i>Abatia americana</i> | 50 |
| Figura 21: | Proposta de fragmentação substância m/z 609 de folhas de <i>Abatia americana</i> | 51 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 22: | Lucenina-2: 4-H-1-Benzopiran-4-ona-2-(3,4-dihidróxifenil)-6,8-β-D-diglicopiranosil-5-7-dihidróxi..... | 52 |
| Figura 23: | 4-H-1-Benzopiran-4-ona-2-(3,4-dihidróxifenil)-6-β-D-galactopiranosil-8-β-D-glicopiranosil-5-7-dihidróxi..... | 52 |
| Figura 24: | Espectro de UV da substância 2, com TR 2.39min de folhas de <i>Abatia americana</i> | 53 |
| Figura 25: | Espectro de massas da substância 2 (TR: 2.39min. e m/z 579) de folhas de <i>Abatia americana</i> | 53 |
| Figura 26: | Proposta de fragmentação da substância m/z 579 de folhas de <i>Abatia americana</i> | 55 |
| Figura 27: | Lucenina-1: 4H-1-Benzopiran-4-one, 2-(3,4-dihidroxifenil)-8-β-D-glicopiranosil-5,7-dihidroxi-6-β-D-xilopiranosil..... | 56 |
| Figura 28: | Lucenina-3: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 2-(3,4-dihidroxifenil)-6-β-D-glicopiranosil-5,7-dihidroxi-8-β-D-xilopiranosil..... | 56 |
| Figura 29: | Lucenina-5: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 8-α-L-arabinopiranosil-2-(3,4-dihidroxifenil)-6-β-D-glicopiranosil-5,7-dihidroxi..... | 56 |
| Figura 30: | Espectro UV da substância 3, m/z 625 e TR 2,43min..... | 58 |
| Figura 31: | Espectro de massas da substância m/z 625 de folhas de <i>Abatia americana</i> | 59 |
| Figura 32: | Proposta de fragmentação da substância m/z 609 de folhas de <i>Abatia americana</i> | 60 |
| Figura 33: | 4H-1-Benzopiran-4-ona, 5,6,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)..... | 61 |
| Figura 34: | Espectro UV da substância 4, TR: 5,73min. e m/z 577 de folhas de <i>Abatia americana</i> | 62 |
| Figura 35: | Espectro de massas da substância 4 de folhas de <i>Abatia americana</i> | 63 |
| Figura 36: | 4H-1-Benzopiran-4-ona, 5,7-dihidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)..... | 64 |

Figura 37: Proposta de fragmentação da substância *m/z* 577 de folhas de *Abatia americana*..... 65

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Exemplos de fármacos e suas plantas de origem..... | 07 |
| Tabela 2: Exemplos de separações preparativas de flavonoides por CLAE..... | 15 |
| Tabela 3: Dados geográficos do gênero <i>Abatia</i> | 21 |
| Tabela 4: Frações obtidas na CCR e suas fases móveis..... | 32 |
| Tabela 5: Teste histoquímico em folhas de <i>A. americana</i> | 43 |
| Tabela 6: Exemplos de fragmentos encontrados nos espectros de massa dos três isômeros..... | 57 |

RESUMO

A família Salicaceae apresenta em sua química molecular heterosídeos fenólicos. A espécie *Abatia americana* (Gardner) Eichler, pertencente à família Salicaceae, é considerada endêmica do Brasil e embora não haja ainda referências sobre seu uso popular, devido à importância medicinal das Salicaceas, torna-se pertinente o conhecimento da sua constituição química e de prováveis efeitos farmacológicos. Nesse contexto, foram realizados estudos botânicos e fitoquímicos de folhas dessa espécie, determinando as características morfológicas e anatômicas das folhas além de investigação da presença de compostos fenólicos em seus tecidos, bem como a identificação desses compostos com o foco nos flavonoides. Para tal, folhas frescas e totalmente expandidas foram coletadas em Ouro Preto. Parte desse material foi fixada em FAA₇₀, e, após 48 horas, lavada em etanol 70%, de onde confeccionaram-se cortes anatômicos, diafanização e dissociação de epidermes, para estudos morfoanatômicos. Outra parte foi conservada para estudos histoquímicos. Os cortes mostraram que a folha é dorsiventral e hipostomática com tricomas tectores ornamentados, em ambas as faces. A epiderme da face adaxial é multisseriada e a abaxial unisseriada, com estômatos braquiparacíticos. Possui padrão de nervação camptódromo-broquidódromo e feixe vascular colateral em arco aberto. Nenhuma estrutura secretora ou cristal foi encontrado. Testes histoquímicos foram positivos para compostos fenólicos em geral, e especificamente lignina e taninos. A fim de se realizar estudos fitoquímicos, outra parte do material coletado, seco e pulverizado, e, em seguida submetida a extrações sequenciais, por meio da técnica de percolação sequencial em hexano, acetato de etila e metanol, visando a identificação de metabólitos secundários majoritários. Essa etapa se deu por análises cromatográficas clássicas para a obtenção de frações mais purificadas e cromatografia de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Após as análises, foi possível a identificação dos flavonoides lucenina-1, lucenina-3, lucenina-5, lucenina 2 e outros dois O-heterosídeos da fração metanólica, sendo que, nenhum dos flavonoides identificados foram descritos para a espécie estudada.

Palavras-chave: *Abatia americana* (Gardner) Eichler, metabolismo secundário, flavonoides, folhas – anatomia, histoquímica.

ABSTRACT

The Salicaceae family often has phenolic glycosides. *Abatia americana* (Gardner) Eichler, belonging to the Salicaceae family, is endemic in Brazil and has not a popular use described yet; therefore lacks research on its chemical structures and possible pharmacological activities because of the medicinal importance of Salicaceae family. In this project, it was conducted botanical and phytochemicals studies for to determine the morphological and anatomical characteristics of the leaves as well as research the possible presence of phenolic compounds in their tissues and the identification of these compounds with a focus on flavonoids. To this end, fresh and fully expanded leaves were collected in Ouro Preto; part of this material was fixed at FAA₇₀, and after 48 hours and preserved on ethanol 70%. Were made transversal sections, diaphanization and epidermis dissociation in order to morphoanatomic and histochemical studies. The leaf lamina is dorsiventral and hypostomatic. There are multiseriate adaxial epidermis and uniseriate abaxial epidermis with paracytic stomata and tectores ornamented trichomes on both sides. It has intersecondary veins camptodromous-brochidodromous and collateral vascular bundle in open arc. No secretory structure or crystal were found in the leaves. Histochemical tests were positive for phenolic compounds, lignin and tannins. In order to carry out phytochemical studies, another part of the collected material was dried and pulverized, and then subjected to sequential extractions by means of percolation technique, aimed to the identification of major secondary metabolites. This step was given by classical chromatographic techniques aimed most purified fractions and high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry, that made possible the identification of the flavonoids lucenin 1, lucenin 3, lucenin 5, lucenin 2 and two O-glycosides from methanolic fraction, not yet described in the studied species.

Key-words: *Abatia americana* (Gardner) Eichler, secondary metabolism, flavonoids, leaves – anatomy, histochemistry.

1-INTRODUÇÃO

Até o século XIX, os recursos terapêuticos utilizados eram principalmente as plantas medicinais e seus extratos; no entanto, no início do século XX, esses recursos começaram a ser estudados e, aos poucos, se estabelecia a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados princípios ativos (SCHENKEL *et al.*, 2010).

O grupo das angiospermas é o mais diversificado de plantas, com aproximadamente 250.000 espécies (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015). O Brasil, com sua vasta extensão territorial, 8,5 milhões km², ocupando quase a metade da América do Sul, concentra de 11% a 14% da diversidade de plantas do mundo e tem mais de 41 mil espécies catalogadas e milhares ainda desconhecidas pela ciência (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2013).

Graças à sua propriedade de sintetizar diversas substâncias, as plantas podem ser consideradas uma das mais ricas fontes de novas moléculas biologicamente ativas. Portanto, as pesquisas com material vegetal trazem novas alternativas terapêuticas, tanto pelo desenvolvimento de fitoterápicos inovadores, passando pela elucidação de substâncias isoladas, que ainda podem ser utilizadas como modelo para a síntese de novos fármacos, a fim de se obter propostas de respostas terapêuticas para muitas doenças (PHILIPPSEN, 2010).

Existem quatro abordagens básicas para a escolha da espécie a ser estudada: etnodirigida, randômica, etológica e quimiotaxonômica. A abordagem quimiotaxonômica envolve a seleção de espécies de família ou gênero em que se tenha conhecimento fitoquímico de ao menos uma espécie daquele grupo (ALBUQUERQUE & HANAZAKI 2006), sendo essa a abordagem selecionada no desenvolvimento desse estudo.

A família Salicaceae distribui-se em diversos biomas, com 43 gêneros e cerca de 1000 espécies, sendo que no Brasil, ocorrem 19 gêneros e aproximadamente 80 espécies (SOUSA & LORENZI, 2005). Possui vários representantes com potencial farmacológico, sendo conhecida pela presença de espécies medicinais já estudadas como a *Casearia sylvestris* Sw., de nome popular guaçatonga, que apresenta várias atividades, entre elas antidiarreica, antirreumática, diurética, anti-inflamatória, antipirética e antiofídica (IMATOMI *et*

al., 2009), e várias espécies de salgueiro, incluindo a histórica *Salix alba* L., fonte do ácido salicílico, molécula que deu origem ao ácido acetilsalicílico de forte importância medicinal, além de *Salix pentandra* L. e *Salix purpurea* L., com propriedades anti-inflamatória, antirreumática, antipirética, e antisséptica (BARNES *et al.*, 2002).

Diante disso, a espécie vegetal selecionada nesse estudo, a *Abatia americana* (Gardner) Eichler, pertencente à família Salicaceae, não possui relatos na literatura de sua utilização popular, apesar da importância medicinal das Salicaceae. É considerada nativa, endêmica do Brasil, com distribuição geográfica no Sudeste e que apresenta como domínios fitogeográficos o Cerrado e a Mata Atlântica, sendo conhecida vulgarmente como marmeleiro na região de São Paulo (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015).

Portanto, apesar das atividades descritas acima para a família Salicaceae, tanto o gênero *Abatia*, como a espécie *A. americana*, carecem de pesquisas sobre suas possíveis atividades farmacológicas e composição química. O estudo fitoquímico dessa espécie pode fornecer um panorama mais preciso de seu possível uso, seja para utilização como droga vegetal ou como fonte de isolamento de metabólitos secundários de interesse. O estudo botânico, por meio de ferramentas da anatomia vegetal, pode auxiliar no reconhecimento da planta e possibilitar o controle de qualidade que, associado a técnicas de histoquímica, evidencia tecidos que armazenam os compostos em questão por meio de colorações específicas (KRAUS & ARDUIN, 1997).

2-OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

Descrever as características morfológicas e anatômicas das folhas de *Abatia americana* (Gardner) Eichler, visando sua utilização no reconhecimento botânico de uma possível droga de origem vegetal, além de investigar a sua química micromolecular, focando na subclasse de metabólitos secundários, os flavonoides.

2.2– Objetivos Específicos:

- Descrever a morfologia e a anatomia foliar de *Abatia americana* (Gardner) Eichler;
- Evidenciar tecidos onde as substâncias químicas ou grupos de substâncias do metabolismo secundário estejam presentes, por meio de técnicas histoquímicas;
- Realizar extrações e isolar metabólitos secundários majoritários, com ênfase nos flavonoides;
- Identificar as substâncias isoladas através de técnicas cromatográficas (UPLC/MSMS) e espectrofotométrica (UV-DAD).

3-REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - A utilização de plantas como medicamento:

Até o século XIX, os recursos terapêuticos existentes eram principalmente as plantas medicinais e seus extratos, que, naquela época, pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular. No início do século XX, esses recursos começaram a ser estudados e, aos poucos, se estabelecia a tendência de utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados princípios ativos (SCHENKEL *et al.*, 2010).

A maioria das espécies vegetais com utilização popular no Brasil são espécies exóticas, sendo de origem mediterrânea, trazidas no processo de colonização, como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e a camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauuschert] (NODARI & GUERRA, 2010). Por outro lado, várias espécies nativas têm sido amplamente empregadas pela população, sendo o conhecimento sobre seu uso medicinal oriundo de comunidades indígenas e caboclas do país, como espécies de *Baccharis* (carqueja) e de *Passiflora* (maracujazeiro) (NODARI & GUERRA, 2010). Vários autores tem relatado a importância de se realizar estudos químicos e farmacológicos em espécies tropicais dada sua intensa produção de metabólitos secundários, fato esse intimamente associado aos processos evolutivos envolvendo mecanismos de proteção contra predadores ou sua utilização para fins de polinização e dispersão da espécie (NODARI & GUERRA, 2010).

Segundo POSER & MENTZ (2010), os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser classificados em: essenciais, quando se tratam dos metabólitos primários, conhecidos também como macromoléculas. Estão incluídos nesse grupo, os lipídeos, protéidos e glicídeos e possuem funções bem definidas. O outro grupo é classificado como metabólitos secundários ou micromoléculas, geralmente de estrutura complexa, marcantes atividade biológicas e baixo peso molecular. Entretanto, apesar de os metabólitos secundários serem considerados por muito tempo como subprodutos do metabolismo primário, sabe-se que essas moléculas são necessárias à sobrevivência e manutenção da espécie em seu ecossistema, atuando na defesa

do vegetal contra o ataque de herbívoros, por exemplo, além de por muitas vezes serem importantes na atração de polinizadores e dispersores da espécie.

Vários caminhos para escolha da planta a ser estudada, onde são destacados quatro tipos de abordagens básicas: etnodirigida, etológica, randômica e quimiotaxonômica. As investigações etnodirigidas consistem na escolha de espécies de acordo com sua indicação de uso por grupos populacionais em determinadas situações específicas. Dessa forma, enfatiza-se a busca por informações construídas naquela região de acordo com seus recursos naturais e a forma de utilização dessas plantas em seus tratamentos de doenças. Suas principais vantagens são o baixo custo e o tempo envolvidos na coleta de dados (MACIEL *et al.*, 2002). A etnobotânica e a etnofarmacologia são importantes ferramentas nessa pesquisa, onde a primeira se ocupa da “inter-relação direta entre pessoas e plantas” (ALBUQUERQUE, 2005). A etnofarmacologia, por outro lado, estuda os preparados tradicionalmente utilizados nos sistemas de tratamento, podendo incluir essas plantas isoladamente ou em associação em conjunto plantas, animais, fungos ou minerais. A abordagem etológica é baseada nos estudos de comportamento animal com primatas (KRIEF *et al.*, 2004), e tem como objetivo avaliar a utilização dos metabólitos secundários por animais, com a finalidade de controlar ou combater doenças (HUFFMAN, 2003; CARRAI *et al.*, 2003). Investigações randômicas envolvem a coleta ao acaso de plantas para triagens farmacológicas e fitoquímicas. A abordagem quimiotaxonômica, também conhecida como filogenética compreende a seleção de espécie de uma determinada família ou gênero, onde se tenha algum conhecimento fitoquímico de pelo menos uma espécie daquele grupo (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

Uma vez definida a planta, quando baseada na sua utilização popular ou por animais, geralmente se escolhe as partes dessa planta sobre as quais se possua algum dado de utilização. Em outras abordagens, podem ser escolhidas diversas partes da planta, embora seja interessante a escolha da folha, quando se trata de espécies sempre verdes, não decíduas. Além disso, as folhas são os órgãos mais utilizados na medicina popular.

3.1.1 – Elaboração de medicamentos a partir de plantas medicinais:

Segundo FRANÇA (2010), apesar de muitos compostos derivados de plantas medicinais serem sintetizados em laboratório, sua síntese pode muitas vezes ser tão complexa que propicia baixos rendimentos. Entretanto, alguns compostos ainda não foram ou nunca serão sintetizados quimicamente.

Na pré-história, a utilização de plantas pelo homem pode ser dividida em sete classes: alimentos, construção, fibras, materiais, transporte, usos diversos e para fins medicinais (ALLEN, 2012), onde esse conhecimento vem sendo transmitido de geração em geração. Já na antiguidade, registros detalham usos e aplicações de plantas ou de produtos derivados; por exemplo, ópio (*Papaver somniferum* L.), galbano (*Ferula galbaniflua* Boiss & Buhse), assafetida (*Ferula assafetida* L.), meimendo (*Hyoscyamus niger* L.) e mandrágora (*Mandragora officinalis* L.) (CUNHA, 2005, GARCIA, 1995 e PELT, 2004) e no Antigo Egito, utilizações de espécies vegetais em rituais e na terapêutica, onde frequentemente, consumia-se vinhos com ervas medicinais. Na Idade Média, (a partir do século VII) a medicina Árabe incorporou conhecimentos médicos gregos e indianos à medida em que se tornava mais complexa e forte influente dos séculos posteriores (ALMEIDA, 2003; SAAD, 2013). No século XX, os principais textos de Galeno, Hipócrates e Dioscórides já haviam sido traduzidos para o árabe (SYED, 2002), incorporando os recursos terapêuticos gregos. Na Idade Moderna mosteiros e conventos da Europa Medieval centralizaram conhecimentos médicos (MEDEIROS, 2009), contando com enfermarias, boticas e jardins botânicos (DIAS, 2005). Empiricamente, os monges no século XVI, ampliaram o conhecimento greco-latino contido nos trabalhos de Theophrastus, Plínio, Dioscórides e Galeno, por meio de ilustrações e novas informações (BUENZ, 2004; PIRES, 1984). Logo, as plantas medicinais passaram a ser compreendidas como fontes curativas por suas propriedades medicinais intrínsecas, dessa forma, desmistificando a sua ação terapêutica (CUNHA, 2005). A Idade Contemporânea trouxe consigo um novo parecer, onde foi atribuído a boticas e enfermarias, papel importante no tratamento das pessoas próximas aos Mosteiros e Abadias Beneditinos (ALENCAR, 2010; MEDEIROS *et al.*, 2007).

O Brasil, nas décadas de 1940 e 1950, passou por uma transformação no que diz respeito à utilização de plantas medicinais (BRUNNING; MOSEGUI; VIANA, 2012), sendo a indústria farmacêutica e não a desvalorização da cultura popular, responsável por esse fato (FIGUEIREDO; GURGEL; GURGEL JÚNIOR,

2014). Entretanto, segundo LUZ (2005), atualmente, observa-se uma redescoberta da utilização de plantas medicinais, evento esse fortemente influenciado pelo novo padrão de comportamento “ecologicamente correto”.

De acordo com ROCHA *et al.* (2015), a utilização de plantas medicinais foi reconhecida como recurso terapêutico válido no final do século XX. A partir da iniciativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), 2006, o Brasil instituiu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (Portaria MS/GM No. 971, de 3 de maio de 2006), estimulando a criação de hortos de espécies medicinais, bem como a implantação de seu uso no Sistema Único de Saúde – SUS, sendo o PNPIC uma estratégia inovadora por propor à população o uso terapêutico da flora.

Cerca de 25 % dos medicamentos prescritos no mundo tem sua origem em plantas. Dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais pela OMS, 11 % são exclusivamente de origem vegetal e uma grande parte são precursores de fármacos sintéticos (RATES, 2001). Alguns exemplos de fármacos com origem nas plantas estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de fármacos e suas plantas de origem (RATES, 2001).

| Fármaco | Função | Planta de origem |
|---------------------------|---|----------------------------|
| Digoxina | Aumenta a força do coração, fazendo com que ele bombeie melhor o sangue | <i>Digitalis spp.</i> |
| Quinina e Quinidina | Tratamento da malária <i>Falciparum</i> | <i>Cinchona spp.</i> |
| Vincristina e Vinblastina | Agentes anti-tumorais | <i>Catharanthus roseus</i> |
| Atropina | É muito utilizada para combater arritmias e no Mal de Parkinson | <i>Atropa belladonna</i> |
| Morfina e codeína | Analgésico, ação sedativa. | <i>Papaver somniferum</i> |

A investigação e o desenvolvimento de materiais terapêuticos de origem vegetal é uma tarefa difícil e cara (BORRIS, 1996; TURNER, 1996; WILLIANSOON *et al*, 1996). Cada novo fármaco requer um investimento de cerca de \$100-360 milhões e no mínimo dez anos de trabalho e apenas um composto em dez mil testados é considerado promissor. Outro fator é que apenas um em quatro destes é aprovado como um novo fármaco. No que diz respeito ao rendimento médio de compostos ativos, a quantidade de matéria prima requerida para a descoberta, desenvolvimento e lançamento de um novo medicamento no mercado, estima-se que cada 50 kg de matéria-prima gera cerca de 500 mg de um composto puro para bioensaios, toxicologia, e avaliação *in vivo* e, ainda 200 toneladas de matéria-prima geram aproximadamente 2 kg de compostos puros para estudos pré-clínicos e clínicos.

Outro fator relevante no que diz respeito ao estudo de plantas medicinais é que o processo de descoberta de novos fármacos é multidisciplinar (DE PASQUALE, 1984; VERPOORTE, 1989), sendo que as ciências básicas envolvidas são: botânica, química, farmacologia e toxicologia.

3.2 - O metabolismo secundário:

Segundo VLIETINCK (1987), a relação entre os homens e as plantas foi essencial ao desenvolvimento da maioria das civilizações, onde muitas das plantas superiores apresentavam produção de óleos, fragrâncias e medicamentos. Além disso, é fato que muitos dos fármacos utilizados ainda hoje têm como protótipos os produtos naturais. Logo, as plantas superiores representam um reservatório imenso de substâncias que podem ser modelos na síntese de análogos ou uma ferramenta importante no entendimento do funcionamento dos processos biológicos (VLIETINCK, 1987).

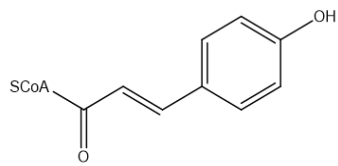
Portanto, o surgimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza se dá por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução das plantas e demais organismos leva à síntese de metabólitos secundários para fins de defesa ou atração (RHODES, 1994). Assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre os organismos, frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes, embora por

muito tempo tenham sido considerados como produtos de excreção vegetal (SCHENKEL *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos, uma classe de metabólitos secundários, se formam nas plantas em condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, e outros (NACZK & SHAHIDI, 2004). Esses compostos conferem às plantas sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas (CARVALHO *et al.*, 2010). Como exemplos temos o aldeído cinâmico da canela (*Cinnamomum zeyllanicum* Blume) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). Em ecologia química, é ressaltada a participação de fenóis como a hidroquinona, o ácido elágico e ésteres de ácido gálico na defesa das plantas, além de participarem na inter-relação entre animais e vegetais, com atividades como a inibição da germinação de sementes, do crescimento de fungos e de plantas em geral. Podem ser formados através de duas rotas biogênicas: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalonato que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A e, uma característica de sua biogênese, cita-se a capacidade que os vegetais têm de produzir um mesmo composto a partir de diferentes intermediários (CARVALHO *et al.*, 2010).

3.2.1-Os flavonoides:

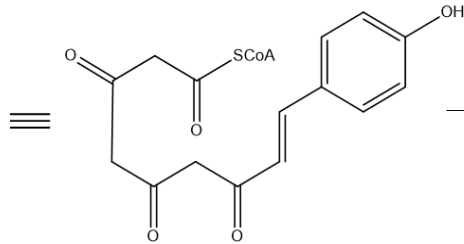
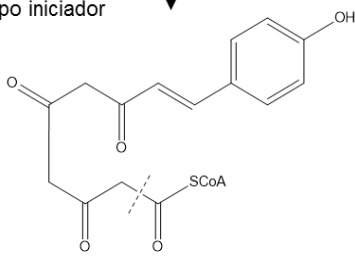
Os flavonoides, uma subclasse de compostos fenólicos, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem uma importante classe de polifenóis. São de relativa abundância entre os metabólitos secundários vegetais, com ampla distribuição no reino vegetal e representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados, entre os produtos de origem natural. Alguns representantes foram encontrados em briófitas e pteridófitas, mas estão presentes em abundância em angiospermas, com enorme diversidade estrutural (ZUANAZZI & MONTANHA, 2010). Suas várias subclasses estão associadas à rota biossintética, como demonstrado na figura 1:



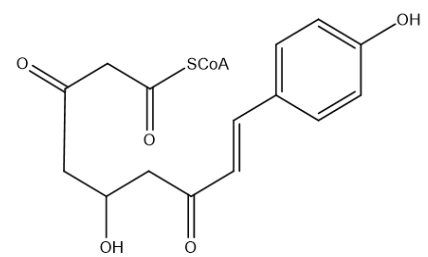
4-Hidroxicinamoil-CoA

Extensão da cadeia;
Via acetato com um
cinamoil-CoA como
grupo iniciador

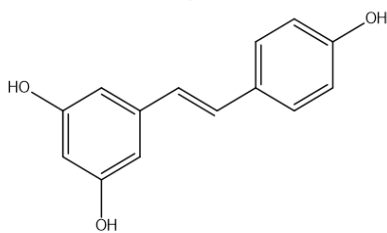
3 x malonil-CoA



NADPH
redutase

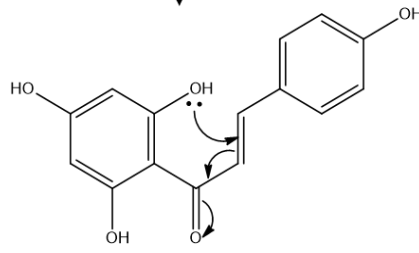


CO₂
aldol
(estilbeno sintase)



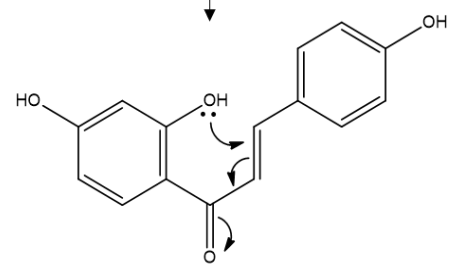
resveratrol
(estilbeno)

Claisen
(chalcona sintase)



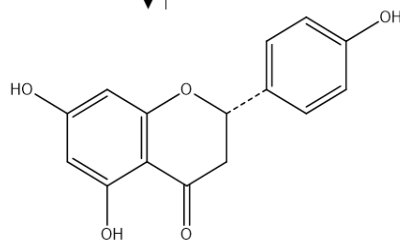
naringenina-chalcona
(chalcona)

Claisen

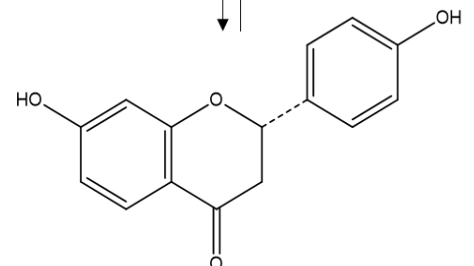


isoliquiritigenina
(chalcona)

Ataque nucleofílico do
tipo Michael da OH na
cetona α,β -insaturada



naringenina
(flavanona)



liquiritigenina
(flavanona)

(continuação)

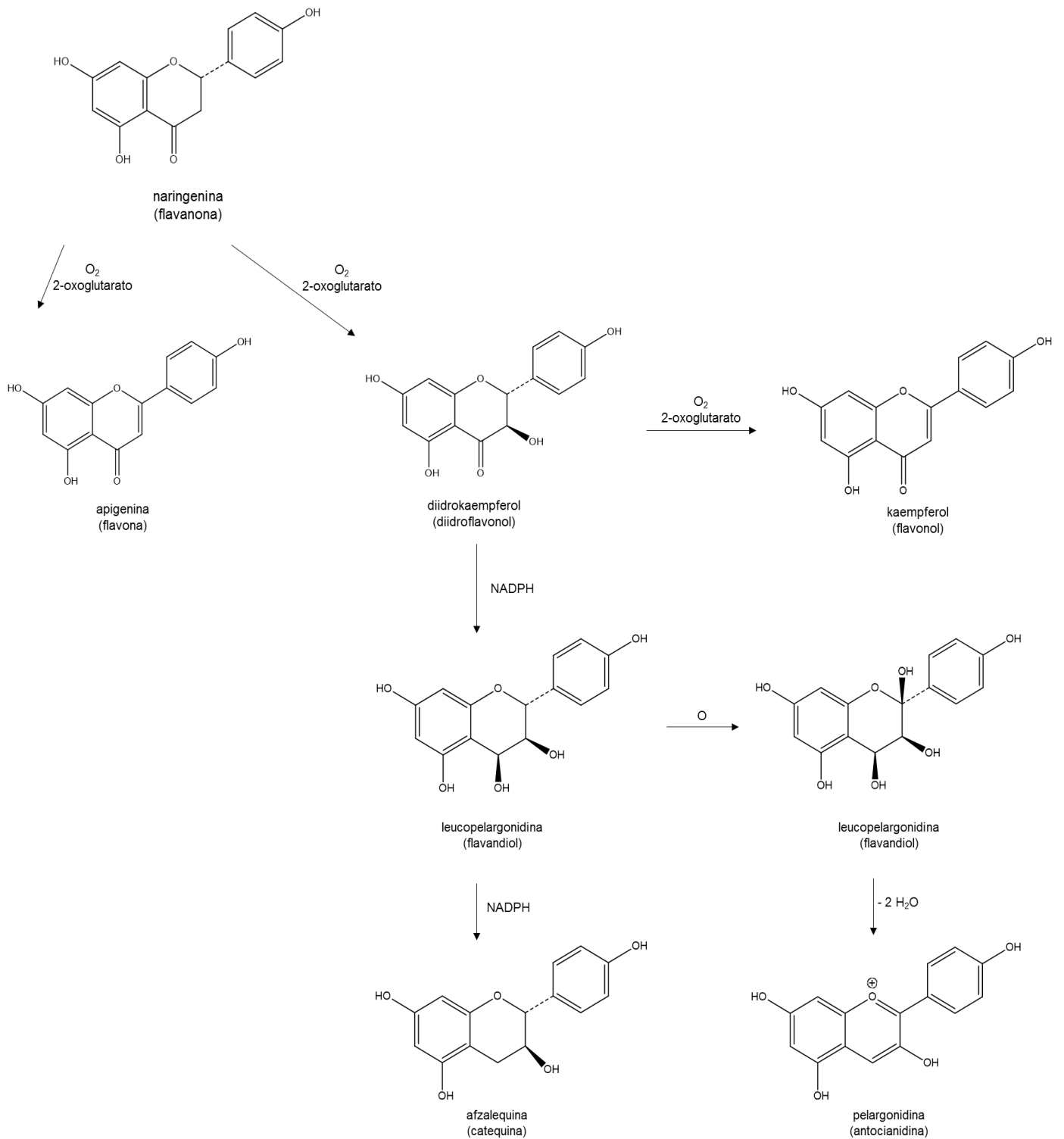


Figura 1: Biosíntese de flavonoides. Adaptada de DEWICK (2009).

Os flavonoides de origem natural são sempre oxigenados, devido à sua biossíntese, e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Quando na forma conjugada, podem ser chamados heterosídeos e, quando sem o açúcar, denomina-se aglicona ou genina. Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Dentre elas, pode-se citar: proteção dos vegetais contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; atividade antioxidante; controle de ação dos hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE, 1988; HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Vale destacar que, segundo FERREIRA *et al.* (2008), flavonas e flavonóis não estão presentes apenas nas flores, podendo ser encontrados nas folhas de todas as plantas verdes. Essas classes de flavonoides protegem as células contra os raios UV-B (280-320 nm), uma vez que se acumulam nas camadas das epidermes das folhas e caules, mas permitem a passagem da luz visível, que apresentam as cores fotossinteticamente ativas, azul e vermelho. Outro fator importante é que uma exposição maior das plantas ao raio UV-B leva a um aumento na síntese desses flavonoides (FERREIRA *et al.*, 2008). Células especializadas de plantas sintetizam compostos fenólicos e esses são estocados em seus vacúolos, durante o processo normal de diferenciação. No entanto, essas células são capazes de, por meio de uma rápida oxidação de seu conteúdo fenólico, seguida de lignificação e suberização das células, levar à morte celular, e, conseqüente bloqueio de infecção, impedindo injúrias (BECKHAM, 2000).

O interesse econômico pelos flavonoides decorre de suas diferentes propriedades como, por exemplo, alguns apresentam cor e podem ser usados como pigmentos, e outros conferem cor e valor nutricional para alguns alimentos. Sua importância farmacológica é oriunda de propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e antiviral. Outros estudos sugerem que alguns flavonoides são responsáveis por ação antitumoral considerável, podendo ainda agir como antivirais, anti-hemorrágicos, hormonais, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes. Existem no mercado medicamentos elaborados a partir desse metabólito, em particular para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator da vitamina C (ZUANAZZI & MONTANHA, 2010).

No que diz respeito à sua extração, os flavonoides (particularmente os glicosilados) podem ser degradados pela ação enzimática quando o material coletado está fresco ou não foi seco corretamente. Logo, para a estabilização sugere-se utilizar materiais vegetais secos, liofilizados ou amostras congeladas. Quando o material seco é utilizado, geralmente é triturado até o estado de pó fino. Para a extração, o solvente é escolhido de acordo com a subclasse de flavonoide pesquisada. Flavonoides menos polares (por exemplo, isoflavonas, flavanonas, flavonas metiladas e flavonóis) são extraídos com clorofórmio, diclorometano, éter dietílico ou acetato de etila, enquanto que flavonoides glicosilados e agliconas mais polares são extraídos com álcoois ou misturas de álcool-água. A maioria das extrações de flavonoides ainda é feita pela extração direta com solventes (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

O flavonoide da droga vegetal pode ser extraído também em um aparato de Soxhlet, primeiramente com hexano, por exemplo, para remover lipídeos e, então, o acetato de etila ou etanol para obtenção de fenólicos. Um procedimento frequentemente utilizado é a extração sequencial, onde, a primeira etapa da extração, com diclorometano, por exemplo, extrairá flavonoides não glicosilados, as geninas e outras substâncias menos polares. Uma etapa subsequente com álcool é capaz de extrair flavonoides glicosilados, os heterosídeos, e outros constituintes mais polares. Algumas flavanonas e chalconas glicosiladas possuem baixa solubilidade em metanol, etanol ou misturas álcool-água. A solubilidade da flavanona depende do pH das soluções contendo água (ANDERSEN & MARKHAM, 2006). Flavan-3-ol (catequinas, protoancianidinas e taninos condensados) podem ser extraídos diretamente com água. No entanto, a composição do extrato varia com a polaridade do solvente misturado à água (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

A preparação do extrato pode ser feita ainda de várias formas, como por extração com líquido pressurizado (*Pressurized Liquid Extraction* - PLE), onde a extração é otimizada por alta temperatura e alta pressão, o que aumenta a difusão do solvente no meio e, ao mesmo tempo, se trabalha ao abrigo da luz. A extração por fluido supercrítico utiliza das propriedades dos fluidos supercríticos, onde sua baixa viscosidade e altas taxas de difusão garantem o ambiente ideal para extração de matrizes por difusão controlada. Dentre as vantagens desse método,

citam-se o baixo consumo de solvente, seletividade e a degradação química e térmica de compostos é menor que em outros métodos como a extração por Soxhlet. A extração por ultrassom é uma técnica rápida, que também permite o uso de misturas de solventes de polaridades diferentes. A extração por micro-ondas (*Microwave Extraction* - MAE) foi descrita para extração de vários compostos de diferentes matrizes. É uma técnica rápida, onde a amostra é ressuspendida em um solvente, sendo que esse processo envolve o aquecimento (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

A metodologia utilizada nesse trabalho envolve o método de percolação, onde, segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011), é o processo extrativo que consiste na passagem de solvente através da droga previamente macerada, mantida em percolador, sob velocidade controlada, tendo como objetivo a extração até exaustão das substâncias ativas. Na percolação, a droga vegetal moída é colocada no percolador, através do qual é passado o líquido extrator. Ao contrário da maceração, a percolação é muito utilizada para extração de substâncias com alta ação farmacológica, presentes em baixos teores ou que apresentem baixa solubilidade ou ainda quando o preço do composto desejado é considerável (SIMÕES *et al.*, 2010).

No que diz respeito à identificação de flavonoides, várias técnicas podem ser utilizadas para separações preparativas, sendo que a escolha da técnica e estratégias estão associadas aos grupos de flavonoides pesquisados.

Um dos métodos utilizados com vantagens econômicas e de simples operação é a cromatografia em camada delgada (CCD). As vantagens dessa técnica são o curto tempo de separação, utilização de reveladores e a possibilidade de fazer corridas cromatográficas de várias amostras ao mesmo tempo, além de ser referido como método de escolha em *screening* de extratos de plantas antes da análise por CLAE (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

A cromatografia em coluna convencional é ainda amplamente utilizada devido à sua simplicidade e sua aplicabilidade na etapa inicial de separação, sendo útil em pesquisas iniciais de extratos ricos em flavonoides. A fase estacionária pode ser de poliamida, celulose, sílica-gel e os vários tipos de Sephadex (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

Segundo ANDERSEN & MARKHAM (2006), a CLAE tem se tornado a técnica mais popular para identificação de flavonoides, tanto em escala preparativa quanto em escala analítica. Os avanços nos equipamentos, fases estacionárias e tecnologia das colunas acontecem a todo tempo, o que deixa a técnica cada vez mais atrativa. A diferença entre as metodologias para CLAE preparativa e analítica, é que na analítica, ocorre destruição da amostra, enquanto que na preparativa é realizado um processo de purificação que objetiva o isolamento de uma substância pura daquela mistura.

Em uma revisão das técnicas de isolamento realizada em 1982, é possível observar que a CLAE preparativa não era bem explorada. No entanto, a situação hoje é bem diferenciada e cerca de 80% dos isolamentos de flavonoides passam pela etapa de CLAE. Aproximadamente 95% das aplicações de CLAE relatadas utilizam fase estacionária de octadecilsilano (C-18) e são aplicadas tanto em corridas isocráticas quanto em corridas em gradiente (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

Alguns exemplos de aplicação dessa técnica estão relatados na tabela 2:

Tabela 2: Exemplos de separações preparativas de flavonoides por CLAE. Adaptada de ANDERSEN & MARKHAM, 2006.

| Amostra | Coluna | Eluente |
|--|--------------------------------|---|
| Compostos Fenólicos <i>Picea abis</i> | Nucleosil 100-7C18 250x21mm | MeOH:H ₂ O, gradiente |
| Chalconas <i>Myrica serrata</i> | Nucleosil 100-7C18 250x21mm | MeOH:H ₂ O 76:24 |
| Flavonas <i>Tanacetum parthenium</i> | LiChospher RP-18 250x25mm | CH ₃ CN:H ₂ O 3:7 |
| Flavonas glicosiladas <i>Lysionotus pauciflorus</i> | LiChospher RP-18 250x10mm | Hex: AcOEt 7:3 |

Dentre os métodos analíticos utilizados para identificação de flavonoides, o acoplamento de técnicas como cromatografia líquida com espectrofotometria no ultra-violeta e/ou ionização por elétron-spray (ESI) na detecção por espectroscopia de massas tem sido uma ferramenta importante na identificação e quantificação de compostos fenólicos em extratos vegetais (NIESSEN & TINKE, 1995). O cromóforo no UV é o sistema aromático de elétrons π do álcool salicílico ou outro substituinte aromático e exibe o espectro de absorção típico do anel benzênico com três bandas causadas pelas transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (BOECKLER *et al.*, 2011).

Os espectros em metanol de flavonas e flavonóis exibem dois picos de absorção máximos entre 240-400nm. Esses dois picos são comumente referidos como Banda I (300-380nm) e Banda II (240-280nm). A Banda I tem sua absorção associada com o sistema cinamoil do anel B, e a Banda II com a absorção do sistema benzoil do anel A (Fig. 2). O espectro em metanol, particularmente a posição da Banda I, fornece informações sobre o tipo de flavonoide e sobre seu padrão de oxidação. Por exemplo, a Banda I para flavonas ocorre entre 304-350nm, enquanto que a Banda I para flavonóis aparece entre 352-385nm. No entanto, em flavonóis com o grupo 3-hidroxil substituído (metilado ou glicosilado), a Banda I (328-357nm) se sobrepõe à região da Banda I em flavonas (MABRY *et al.*, 1970).

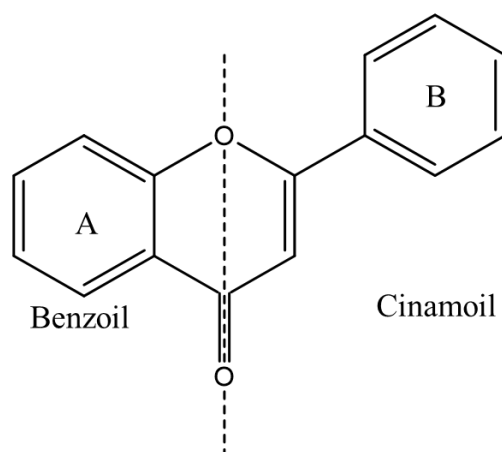


Figura 2: Sistemas benzoil e cinamoil em flavonoides (MARKHAM, 1970).

Um aumento na oxigenação do anel B em flavonas e flavonóis e um deslocamento batocrômico na banda I ocorrem a cada grupo oxigenado

adicionado. Por outro lado, enquanto mudanças no padrão de oxigenação no anel B, geralmente não produz deslocamento da banda II, que pode aparecer como um ou dois picos. Aumentar a hidroxilação do anel A em flavonas e flavonóis produz um efeito batocrômico forte na banda II e um efeito menor na banda I (MABRY *et al.*, 1970).

O HPLC pode estar acoplado à espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS), HPLC-MS, sendo uma das mais importantes técnicas da última década do século 20. MS é um dos métodos mais sensíveis de análise molecular, uma vez que devido ao seu poder de separação por massas, é possível obter uma alta seletividade na análise (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

3.3 – Importância dos estudos botânicos no controle de qualidade da droga vegetal

Segundo SIMÕES & SCHENKEL (2002), o preparo de monografias oficiais sobre plantas medicinais exige conhecimentos botânicos, agrônômicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos e, apenas após essas análises se torna possível, eticamente, considerar ensaios clínicos. Atualmente, exige-se um alto nível de segurança, eficácia e qualidade na produção de fitoterápicos por agências regulamentadoras. Logo, a permanência ou a entrada no mercados desse produtos estão relacionados com o desenvolvimento de estudos para a obtenção de matérias-primas controladas, tecnologias apropriadas para produção de extratos vegetais e, por fim, a realização de ensaios clínicos.

Para o controle de qualidade de uma possível droga vegetal, são necessários estudos farmacobotânicos. Conceitualmente, a farmacobotânica se preocupa com os estudos de matérias-primas vegetais (OLIVEIRA & AKISSUE, 1993). A qualidade dos extratos vegetais utilizados na terapêutica depende do tipo de droga vegetal utilizado na sua elaboração, segundo OLIVEIRA & AKISSUE (1993). No que diz respeito ao estudo da raiz e do caule, são importantes estudos da estrutura primária e da estrutura secundária; já na folha, consideram-se três regiões, a saber: estudo da nervura central, do limbo e do pecíolo. Sépalas e pétalas recebem o mesmo tratamento da folha e as anteras podem ser seccionadas antes de serem fixadas, bem como frutos e sementes. A microtécnica

vegetal, um conjunto de conhecimentos e práticas para o preparo de materiais de origem vegetal, objetivando-se o estudo microscópico, tem como imprescindível o domínio da anatomia vegetal para a perfeita orientação da peça a ser cortada, de acordo com a finalidade de estudo.

A Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), em suas monografias de plantas medicinais, são pontuados tópicos a respeito da descrição morfoanatômica do material em estudo. São eles: características organolépticas, descrição macroscópica, descrição microscópica, descrição microscópica do pó, identificação, ensaios de pureza e doseamento dependendo da espécie em questão.

3.3.1 - Histolocalização:

Em várias espécies, o local da biossíntese do metabólito secundário está restrito a um órgão, enquanto que os produtos podem ser acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes, devido ao sistema de transporte intercelular. Os metabólitos secundários com características mais polares tendem a ser acumulados nos vacúolos, enquanto que os lipofílicos tendem a acumular-se em ductos de células lignificadas ou ligam-se aos componentes celulares lipofílicos, como membranas, ceras cuticulares e lignina (WINK, 1990).

Essa localização pode ser definida por meio de ferramentas da anatomia vegetal e técnicas de histoquímica, que juntas, permitem o reconhecimento estrutural da planta, além de reconhecimento dos compostos por colorações específicas. Na histoquímica vegetal, distinguem-se substâncias de caráter lipofílico e hidrofílico, tendo os compostos fenólicos (flavonoides e taninos), caráter lipofílico (PEARSE, 1960).

3.4 - A família Salicaceae:

Flacourtiaceae foi descrita como uma família pantropical, com 80-95 gêneros abrangendo cerca de 800-1000 espécies, sendo essas com morfologia floral

extremamente heterogênea, o que levou a uma difícil identificação das espécies a ela pertencentes. Em um estudo realizado por CHASE *et al.* (2002), foi detectado que nenhuma outra família de plantas tem delimitação tão variável e controversa (15-20% dos gêneros), com características macromorfológicas comuns a vários gêneros.

No intuito de resolver esse problema, desde 1925 vários pesquisadores estiveram envolvidos em propor um remanejamento de espécies dessas famílias. Os principais pontos de desacordo eram a inclusão das tribos Abatieae, Paropsieae (Passifloraceae) e Prockieae (Tiliaceae), além do grande número de famílias com um ou dois gêneros. Segundo CHASE *et al.* (2002), Sleumer determinou Flacourtiaceae como uma “Família com características confusas e irreconhecíveis”. O professor Pittier, botânico respeitado, era um dos que afirmavam que a família Flacourtiaceae era um receptáculo de todas as espécies sem reconhecimento, por meio da seguinte frase: “Na dúvida, coloque em Flacourtiaceae” (WILLIAMS, 1965).

Lemke propôs uma nova organização onde a família era composta por 10 tribos, 79 gêneros e 880 espécies, sendo sua classificação baseada na macromorfologia, palinologia, fitoquímica e anatomia do xilema e teve como objetivo a melhoria do estudo anterior, abrangendo todas as linhas de investigação possível. Essa sua classificação, em 1988, ficou denominada como “Flacourtiaceae *sensu* Lemke” (CHASE *et al.*, 2002).

Com a evolução dos estudos das Flacourtiaceae, foi possível notar uma relação entre Flacourtiaceae e Salicaceae, como a ocorrência de dentes salicoides e salicina em suas folhas. Logo, CHASE *et al.* (2002) propôs como objetivo de seu estudo de reorganização do gênero Flacourtia, a divisão dos membros da família Flacourtiaceae em duas famílias: Salicaceae e Achariaceae, por meio de técnicas de biologia molecular, utilizando, para tal, a região do gene *rbcL* do cloroplasto. Dessa forma, espécies que apresentavam glicosídeos cianogênicos e não apresentavam dentes salicoides foram realocados para a família Achariaceae, juntamente com os gêneros *Acharia* e *Guthrieae*. Por outro lado, aquelas espécies que possuíam dentes salicoides, mas não apresentavam glicosídeos cianogênicos foram colocadas na família Salicaceae, junto com os gêneros *Salix* e *Populus*, estando de acordo com a *Angiosperm Phylogeny Group*, APG III (2009).

A família Salicaceae apresenta frequentemente heterosídeos fenólicos, possui tricomas diversos, folhas decíduas, alternas, espiraladas ou dísticas, simples, geralmente serreadas ou denteadas, dentes salicoides, exceto em *Casearia*, com venação peninérvea ou palminérvea. Possui inflorescências determinadas a indeterminadas, de forma variada, às vezes pêndulos, reduzidas a uma flor solitária, terminais ou axilares (JUDD *et al.*, 2009). Distribui-se em diversos biomas do mundo, com 43 gêneros e cerca de 1000 espécies, sendo que no Brasil, ocorrem 19 gêneros e aproximadamente 80 espécies (SOUSA & LORENZI, 2005).

3.4.1 – Estudos de componentes químicos de espécies da família Salicaceae:

Nos estudos realizados com outras espécies que migraram da família Flacourtiaceae para a Salicaceae, foi possível identificar vários compostos do metabolismo secundário, das mais diversas classes. MOSADDIK *et al.* (2007a) encontrou um sesquiterpeno, diterpenos clerodânicos e uma furanona em raízes de *Casearia multinervosa* e um novo diterpeno clerodânico e halimane em folhas e cascas de caule de *Casearia grayi* (Flacourtiaceae/Salicaceae). MOSADDIK *et al.* (2007b) encontrou diterpenos clerodânicos em caule de *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*), três novos derivados de 3-benzilbenzofuran-2-onas em *Homalium brachybotrys* (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*), além de glicosídeos fenólicos em espécies australianas de Flacourtiaceae (Salicaceae *sensu lato*) (MOSADDIK *et al.* 2007c). Também foram encontrados glicosídeos fenólicos em extrato de caule de *Homalium ceylanicum* (Gardner) Bentham (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*) (LIU *et al.*, 2013).

3.4.2 – Atividades farmacológicas de espécies da família Salicaceae:

Dentro da família Salicaceae existem espécies medicinais consagradas na literatura, como a espécie *Salix alba* L., conhecida popularmente salgueiro branco. A salicilina, seu princípio ativo, é encontrada em várias espécies do gênero *Salix* e *Populus*. A substância foi isolada pela primeira vez em 1829 pelo farmacêutico francês H. Leroux e possui propriedades anti-reumáticas muito semelhantes às

do ácido salicílico, no qual se converte por oxidação no organismo. O ácido salicílico foi sintetizado a primeira vez pelo alemão Kolbe, que preparou em 1859 pela reação entre o fenóxido de sódio e dióxido de carbono. Como o ácido salicílico causava irritações estomacais e gosto amargo na boca dos pacientes, a fim de combater esses efeitos colaterais Hoffman preparou o ácido acetilsalicílico (PINTO, 2008). Conhecido comercialmente como Aspirina®, o ácido acetilsalicílico é considerado como um dos fármacos mais antigos com reconhecida propriedade anti-inflamatória.

Outra espécie de relevância medicinal nessa família é a *Casearia sylvestris* Sw., de nome popular guaçatonga. É uma espécie nativa do Brasil e estudos demonstraram efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes (ALBANO *et al.*, 2013), citotóxicos (PRIETO *et al.*, 2012; PRIETO *et al.*, 2013), antídoto contra veneno de serpente (CAVALCANTE *et al.*, 2007) e analgésico (DE MATTOS *et al.*, 2007). Cascas de *Casearia multinervosa* C. T. White & Sleumer, outra espécie desse gênero, nativa da Austrália, demonstrou ação antitumoral (COLLINS *et al.*, 1990).

Segundo a Lista de Espécies da Flora do Brasil (2015), quatro espécies do gênero *Abatia* ocorrem no Brasil (Tabela 3):

Tabela 3: Dados geográficos do gênero *Abatia*:

| Espécie | Distribuição geográfica | Domínio fitogeográfico | Tipo de vegetação |
|--|--|--------------------------|--------------------|
| <i>Abatia angeliana</i> M. H. Alford | Sul (Paraná) | Mata Atlântica | Floresta Ombrófila |
| <i>Abatia glabra</i> Sleumer | Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) | Mata Atlântica | Floresta Ombrófila |
| <i>Abatia microphylla</i> Taub | Sudeste (Rio de Janeiro) | Mata Atlântica | Floresta Ombrófila |
| <i>Abatia americana</i> (Gardner) Eichler | Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) | Cerrado e Mata Atlântica | Floresta Ombrófila |

A espécie *Abatia americana* (Gardner) Eichler, pertencente à família Salicaceae, é uma espécie endêmica do Brasil, com distribuição geográfica no Sudeste e que apresenta como domínios fitogeográficos o Cerrado e a Mata Atlântica, sendo conhecida vulgarmente como marmeleiro na região de São Paulo (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2015). Não é uma planta de uso popular descrito na literatura, apesar de seu potencial farmacológico, portanto, carece de estudos a respeito de sua fitoquímica e histoquímica, os quais poderão contribuir para uma futura utilização da mesma na produção de fitoterápicos, ou ainda como modelo para síntese de moléculas biologicamente ativas.

3.4.3 - Estudo botânico de folhas de *Abatia americana*

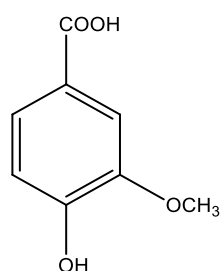
THADEO *et al.* (2014) descreveram a anatomia foliar de espécies de Salicaceae neotropicais, dentre elas, a *Abatia americana* (Gardner) Eichler. Nessa descrição, foi relatada a presença de dentes salicoides que mostraram uma estrutura com vascularização intensa formada pela fusão e ramificação de diversos feixes, sendo o dente salicoide uma característica taxonômica importante dessa espécie. O padrão de nervação apresentado foi camptódromo-broquidódromo, com nervuras anastomosadas na base da folha, formando uma série de arcos próximos à borda e não detectou a presença de idioblastos cristalíferos. A nervura central apresenta xilema adaxial e floema abaxial, em forma de arco, com esclerênquima acompanhando a nervura mediana, sendo que nas nervuras mais amplas o feixe vascular forma um cilindro, e se apresenta, em toda a extensão do limbo, com extremidades invaginadas. A anatomia do pecíolo segue o sistema vascular, também formando um cilindro, mas sem esclerênquima. Também foi relatada a presença de tricomas tectores, sendo *A. americana* uma das espécies com maior pilosidade nas folhas. THADEO *et al.* (2014) relataram a presença de hipoderme em *A. americana*, variando de um a dois estratos de células e mesofilo dorsiventral, com diferenciação bem evidente entre o parênquima paliçádico e o lacunoso. As folhas são hipoestomáticas com estômatos braquiparacíticos.

3.4.4 – Estudo fitoquímico de folhas de *Abatia americana*

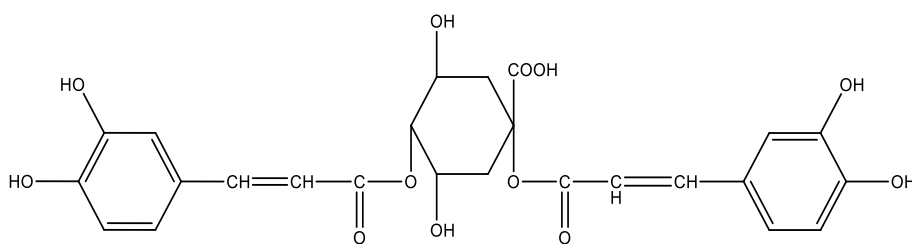
JAMAL (2002) realizou a coleta de folhas de *Abatia americana* no Parque Municipal da Cachoeira das Andorinhas, Ouro Preto, MG. Esse material foi seco

espontaneamente e as folhas foram reduzidas a fragmentos menores e moídas. A extração seguiu o procedimento de percolação em benzeno, seguida de extração em etanol e partição desse extrato etanólico, utilizando-se n-Hexano:clorofórmio:acetonitrila:água (2:1:3,4:1). As substâncias identificadas nesse estudo foram detectadas por CCD, com reveladores anisaldeído em ácido sulfúrico, NP/PEG, reagente Dragendorff, vanilina em ácido sulfúrico, ninhidrina, difeniamina em ácido fosfórico, reagente de Liebermann-Bouchard e sulfato cérico. Além disso, as amostras foram submetidas a cromatografia em coluna de fase normal e de exclusão, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta pressão e de média pressão, sendo as identificações realizadas por técnicas de ponto de fusão, espectrometria no infravermelho e RMN ^1H e ^{13}C . Esse estudo ainda detectou maior atividade para os extratos acetonitrila/clorofórmio de *A. americana*, no teste de toxicidade frente a larvas de *Artemia salina* e os extratos dessa espécie não apresentaram atividade analgésica nas condições experimentais utilizadas (JAMAL, 2002).

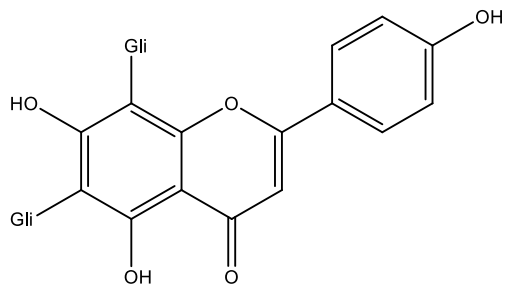
Nesse estudo realizado por JAMAL (2002), foram isolados e identificados vários componentes químicos da espécie em questão, entre eles compostos fenólicos simples como o ácido vanílico e cinarina; os flavonoides 2-vicenina, hesperitina, hesperidina, rutina, 1-vicenina e fisetina; as naftoquinonas lapachol e tecomaquinona I; mistura de hidrocarbonetos; mistura de ésteres graxos; ácido graxo de cadeia longa, dentre eles, sete álcoois primários de cadeia longa: heptaicosanol, tetraicosanol, hexaicosanol, pentatriacontanol, octapentacontanol, hexatriacontanol e tetratriacontanol; mistura de triterpenos lupeol, α e β -amirinas; esteroides β -sitosterol e carboxilato de β -sitosterila; além de glicose e uma mistura de glicose, sacarose e frutose (Fig. 3).



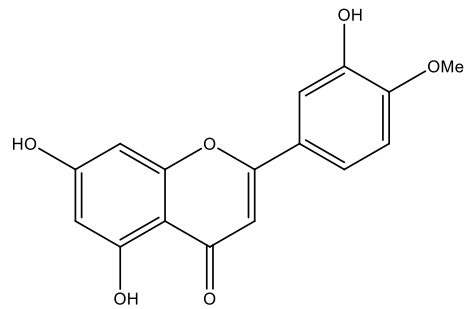
Ácido vanílico



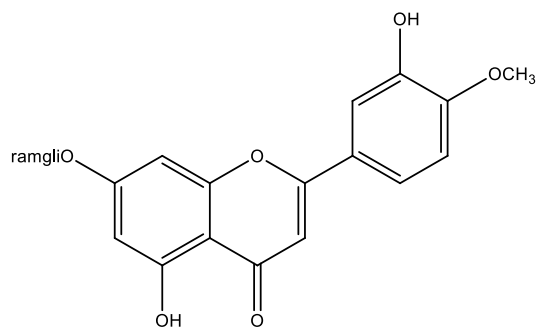
Cinarina



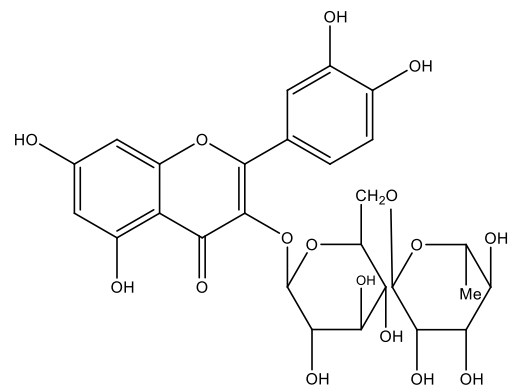
2-Vicenin



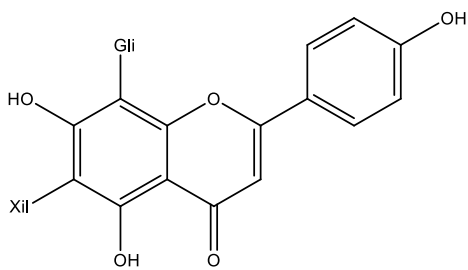
Hesperetin



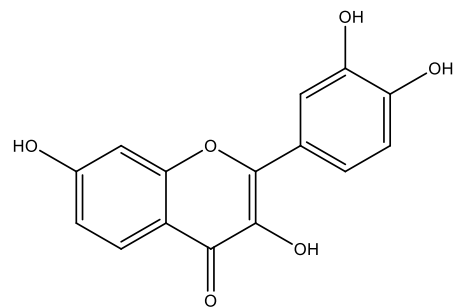
Hesperidin



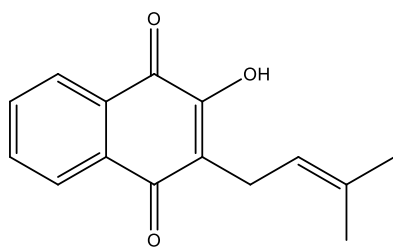
Rutin anidra



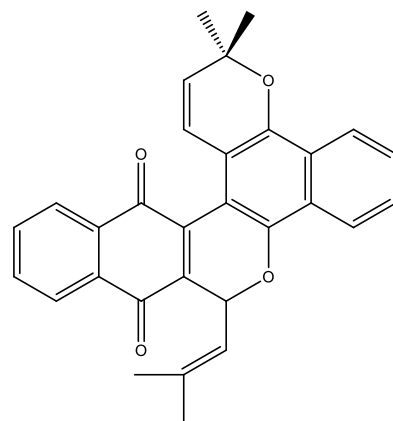
1-Vicenin



Fisetin



Lapachol



Tecomaquinona I

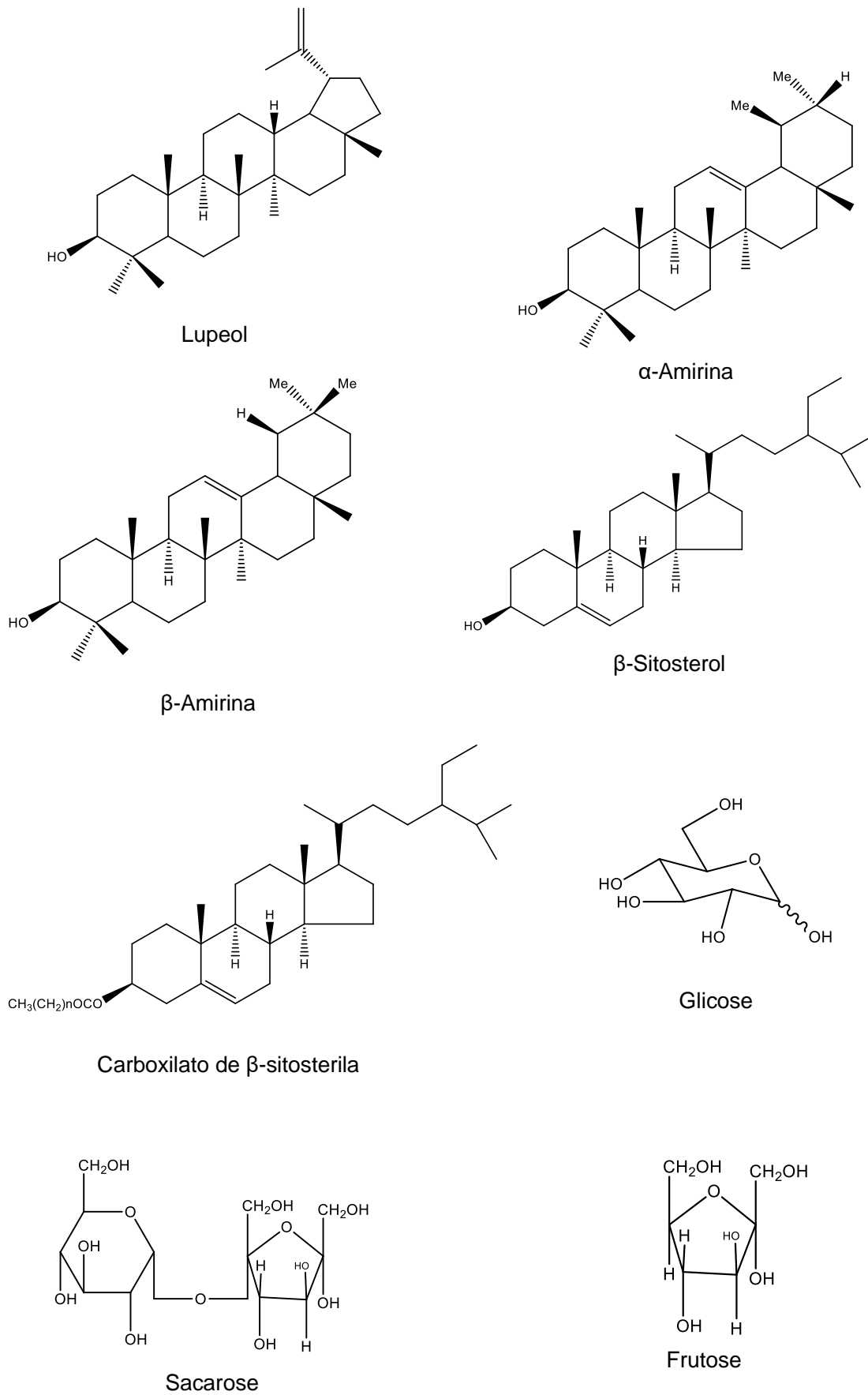


Figura 4: Alguns componentes químicos isolados e identificados em extratos de várias polaridades de folhas de *Abatia americana* (Adaptado de JAMAL, 2002).

4-MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1-Coleta do material vegetal:

Foram estudados indivíduos de *Abatia americana* (Gardner) Eichler que crescem no município de Ouro Preto, Minas Gerais, no Morro São Sebastião e na rodovia de acesso para Ouro Branco/Lavras Novas, visando saber se as estruturas anatômicas estão relacionadas ao ambiente em que se encontram.

Ramos contendo estruturas reprodutivas foram coletados e herborizados, confeccionando-se as exsiccatas do material testemunho, depositadas no Herbário Professor José Badini, DEBIO/ICEB/UFOP, sob números de identificação OUPR 28599 e OUPR 28600. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Hildeberto Caldas de Sousa, DEBIO/ICEB/UFOP.

4.2-Estudos botânicos:

Folhas totalmente expandidas, entre o terceiro e quartos nós, foram coletadas e fixadas em FAA₇₀ (formaldeído Proquímios[®], ácido acético glacial Reagen[®] e álcool etílico Proquímios[®] 70%) e, após 48 horas, conservadas em etanol 70%, segundo JOHANSEN (1940), para a confecção de laminário, visando o estudo morfoanatômico do material fresco-fixado. Folhas totalmente expandidas foram coletadas também para realização de testes histoquímicos, sendo essas armazenadas em caixas de isopor com gelo em gel, a fim de preservar suas características, realizando os testes histoquímicos, no mesmo dia da coleta.

4.2.1-Cortes histológicos:

Confeccionaram-se cortes transversais seriados em micrótomo rotativo e à mão livre, de amostras da região mediana (incluindo a nervura central), entre o meio e a margem, margem, ápice e base da folha. Para a obtenção de cortes seriados, fragmentos foliares da planta fresca-fixada foram desidratados pela

série etanólica e incluídos em parafina Sulfal[®], de acordo com adaptações da metodologia apresentada em KRAUS & ARDUIN (1997). Em seguida, desparafinizados com xilol Proquímios[®], reidratados na série etanólica, corados com a dupla coloração azul de astra e fucsina básica e montados em bálsamo-do-canadá Proquímios[®]. Os cortes à mão livre foram feitos com o auxílio de lâminas de barbear, utilizando-se a medula do pecíolo de embaúba como suporte, segundo KRAUS & ARDUIN (1997). Depois de corados com os corantes histoquímicos, os cortes foram montados em glicerina Isofar[®] a 50% e as lâminas vedadas com esmalte incolor.

4.2.1.1-Estudos ontogenéticos:

Foram coletadas folhas do primeiro nó, ainda não totalmente expandidas para a realização de estudo ontogenético. O material foi fixado em FAA₇₀, e depois de 48 horas lavado e conservado em etanol 70%, a fim de ser submetido ao processo de inclusão, para realização de cortes seriados, conforme metodologia descrita acima.

4.2.2-Dissociação de epidermes:

Para dissociação de epidermes foliares, fragmentos da folha fresca-fixada foram colocados na mistura de Jeffrey (ácido crômico Proquímios[®] a 10% e ácido nítrico Alphatec[®] a 10% 1:1 v/v), segundo JOHANSEN (1940). Após limpeza da face interna, com auxílio de pincel, a epiderme de ambas as faces foi corada com azul de astra e fucsina básica, as lâminas montadas em gelatina glicerinada de Kaiser e vedadas com base incolor.

4.2.3-Diafanização:

Folhas inteiras foram diafanizadas em hidróxido de potássio Dinâmica[®] a 5% para observação e identificação do padrão de nervação das folhas (KRAUS &

ARDUIN, 1997). Depois de clarificadas, as folhas foram coradas com safranina 1% e, após passagem pela série etanólica e em xilol, foram montadas em bálsamo-do-canadá e classificadas quanto ao padrão de nervação segundo HICKEY (1973).

4.2.4-Coloração histológica:

Epidermes dissociadas, cortes à mão livre e em micrótomo rotativo Zeiss®, Hyrak M40 foram corados pela dupla coloração com azul de astra Sigma® e fucsina básica Nuclear®. As folhas diafanizadas foram coradas com safranina Vetec®1% (KRAUS & ARDUIN, 1997).

4.2.5-Estudos Histoquímicos:

Foram realizados cortes transversais à mão livre do material fresco conservado. O material utilizado foi transportado em caixas de isopor com gelo até o laboratório, onde foi submetido aos testes no intervalo máximo de 24h. Todos os cortes foram feitos à mão-livre e montados em glicerina (KRAUS & ARDUIN, 1997). Por meio da coloração temporária, evidenciou-se a histolocalização de substâncias químicas ou grupos de substâncias do metabolismo secundário. Para tal, os seguintes corantes temporários foram utilizados:

- Cloreto Férrico Proquímios®: evidencia a região rica em compostos fenólicos, que se torna enegrecida (JOHANSEN, 1940), precipitando os compostos fenólicos.
- Floroglucinol Acidificado Nuclear®: cora a lignina de vermelho (JOHANSEN, 1940), uma vez que o floroglucinol reage com o ácido coniferílico, dando um cromóforo vermelho em meio clorídrico.
- Lugol Biotec®: cora o amido de roxo ou castanho (KRAUS & ARDUIN, 1997), pois é constituído por iodeto de potássio (KI), um sal iônico que provoca ruptura das pontes de hidrogênio e a consequente separação das várias unidades de glicose que constituem a molécula de amido. O iodeto

de potássio (KI), permite dessa forma, que o iodo se acumule na molécula de amido.

- Vanilina sulfúrica Proquímios®: os taninos condensados coram de laranja vivo a castanho-avermelhado (FIGUEIREDO *et al.*, 2007), formando um produto de condensação resultante da reação dos grupos aldeídicos da vanilina com os fenóis.

Também foram realizadas fotomicrografias de cortes transversais do material sem coloração para comparação com o material corado.

Todo o material produzido foi analisado em microscópio óptico Leica DMLS do Laboratório de Anatomia Vegetal, DEBIO/ICEB/UFOP e os registros feitos fotomicroscópio Olympus CX31 do Laboratório de Ecologia Aquática, DEBIO/ICEB/UFOP e no fotomicroscópio Zeiss Scope A1, com AxioCam Zeiss ICc3 do Laboratório de Fitotecnologia, DEFAR/UFOP.

A metodologia descrita segue o fluxograma abaixo (Fig. 4):

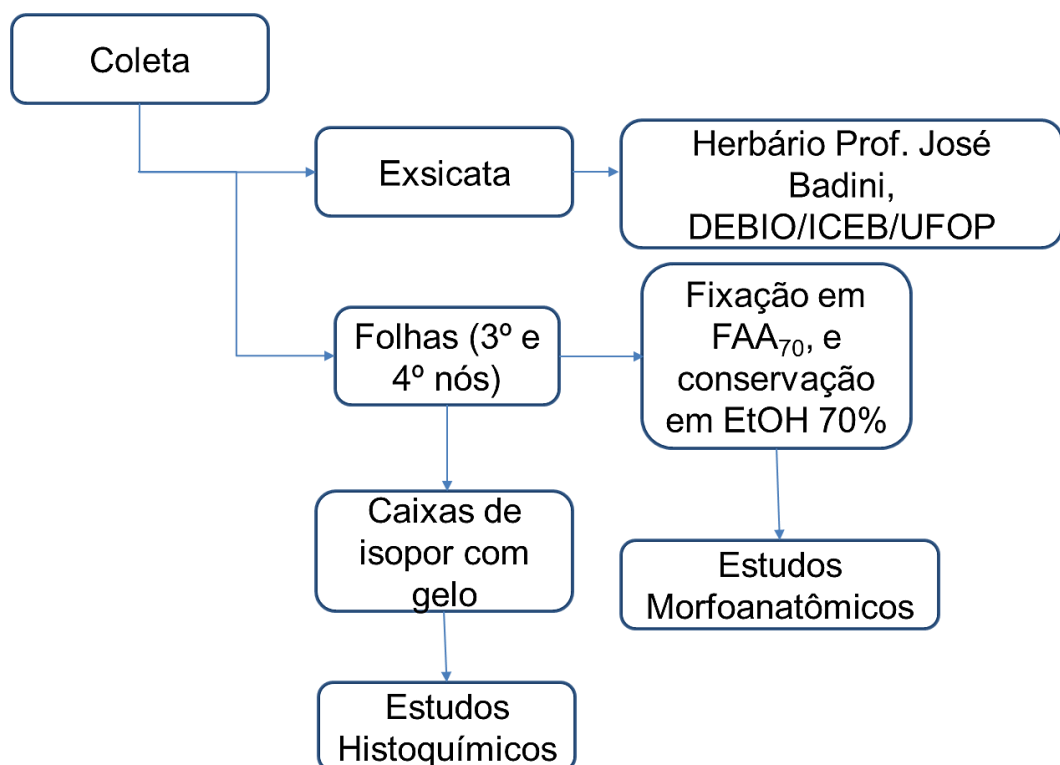


Figura 4: Fluxograma da metodologia de estudos botânicos de folhas de *Abatia americana*.

4.3-Estudos Fitoquímicos:

Foram coletados cerca de 1kg de folhas adultas de indivíduos de *Abatia americana*, sendo esse material coletado fora da unidade de conservação, e, submetido ao processo de secagem em estufa de ar circulante Nova Ética® a 40°C e, posteriormente, à trituração até o estado de pó fino em moinho de facas Manesco e Ranieri® Ltda., modelo MR 340.

Nesse estudo, foram utilizadas as seguintes técnicas para purificação dos extratos: cromatografia em camada delgada comparativa, cromatografia em camada delgada analítica, cromatografia em coluna clássica e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (*High Pressure Liquid Chromatography-HPLC*).

Já para identificação de flavonoides, foram utilizadas as seguintes técnicas: espectrofotometria no UV e espectroscopia de massas.

4.3.1 – Extração sequencial – Percolação:

Após a secagem e trituração, obteve-se 300g da droga vegetal, que foram submetidas à percolação, por meio do processo de extração sequencial, um procedimento frequentemente utilizado para extração de compostos fenólicos. Primeiramente, utiliza-se um solvente de menor polaridade, como o hexano Impex®, para remover lipídeos, em seguida, utiliza-se um solvente de polaridade intermediária, acetato de etila Alphatec® e, após, um de alta polaridade, o metanol Proquímios®, sendo que os compostos fenólicos são encontrados nessas duas últimas frações (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006).

A metodologia de extração por percolação foi a utilizada para a extração sequencial, seguindo a recomendação da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) com adaptações. Foram executadas as seguintes etapas:

1. Umedecimento da droga vegetal (300g) com quantidade suficiente de hexano, que foi deixada em repouso por duas horas em recipiente fechado;
2. Preparo do percolador, forrando-o com papel de filtro e algodão, mantendo a torneira fechada;

3. Transferência da droga umedecida para o percolador, em camadas superpostas, aplicando leve e uniforme pressão sobre cada camada com o auxílio de um pistilo. A superfície foi forrada com camada de algodão;
4. Adição lenta de hexano até que fosse eliminado o ar entre as partículas da droga e permanecesse uma camada sobre a droga (1600mL);
5. Repouso por 48 h;
6. Início da percolação em velocidade controlada, adicionando o líquido extrator constantemente, tomando o cuidado de não deixá-lo desaparecer da superfície da droga antes de nova adição;
7. Recuperação do solvente, retirando a umidade do mesmo com sulfato de sódio anidro, filtração e reutilização do solvente.

A percolação em solvente de baixa polaridade, hexano Impex[®], totalizou quinze dias, com extrações a cada dois dias, sendo o percolado recolhido com velocidade de gotejamento de 20-30 gotas/minuto, seguido de recuperação do solvente em rotaevaporador Fisatom[®], sob pressão reduzida e temperatura de 40°C. O volume total de hexano utilizado foi 3950mL e todos os extratos foram reunidos e levados ao dessecador ao fim de cada processo extrativo. Obteve-se 3,57g do extrato hexânico, o que representa um rendimento de 1,19%.

Seguindo a extração sequencial, o próximo solvente utilizado, com polaridade intermediária foi o acetato de etila Alphatec[®], em percolação, por trinta dias, seguindo a mesma metodologia apresentada anteriormente. Dessa forma, foram gastos 3950mL de solvente e obtidos 21,46g do extrato acetatoetilênico, com um rendimento de 7,15%.

Na sequência, a percolação foi em solvente de polaridade alta, metanol Vetec[®]. A percolação durou trinta dias, seguindo a mesma metodologia. O volume de metanol gasto foi 2400mL e a massa de extrato metanólico obtido foi 87,43g, o que representa um rendimento de 29,14% (Fig. 8).

Após as percolações, a torta foi seca e pesada, obtendo-se uma massa de 196,16g.

4.3.2 - Pesquisa de compostos fenólicos nas frações obtidas:

As frações obtidas na etapa anterior foram testadas quanto à presença de compostos fenólicos, visando à identificação daquelas ricas em flavonoides. Para tal, realizou-se cromatografia em camada delgada, com análise da cromatoplaça sob luz UV, e posteriormente revelada com NP-PEG (difetilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol), reagente para detecção de flavonoides (WAGNER & BLADT, 1996).

4.3.3 - Estudo Fitoquímico da Fração Rica em Flavonoides:

4.3.3.1 - Determinação do perfil cromatográfico:

Como descrito anteriormente, os compostos de interesse são encontrados nas frações acetato de etila (AcOEt) e metanólica (MeOH). Entretanto, como a fração MeOH foi a que possuiu maior rendimento (29,14%), essa fração foi escolhida para dar seguimento aos estudos de identificação de flavonoides.

Para tal, a fração MeOH foi submetida aos seguintes processos: Coluna Cromatográfica Rápida (CCR) sob pressão negativa, com as fases móveis Hex (100%), Hex:AcOEt (1:1) e MeOH (100%). Desta coluna, foi possível obter seis frações, com os respectivos sistemas de solvente, conforme a tabela 4:

Tabela 4- Frações obtidas na CCR e suas fases móveis.

| Fração | Solvente | Massa obtida |
|---------------|-----------------|---------------------|
| C.J 1 | Hex 100% | 3,6 mg |
| C.J 2 | Hex:AcOEt 1:1 | Massa indetectável |
| C.J 3 | Hex:AcOEt 1:1 | 100,9 mg |
| C.J 4 | MeOH 100% | 1.774,4 mg |
| C.J 5 | MeOH 100% | 7.993,5 mg |
| C.J 6 | MeOH 100% | 3.027,2 mg |

Dessa forma, foi possível perceber por meio de CCD que a fração CJ5 apresentou maior pureza e a mais rica em flavonoides heterosídicos, uma vez que a fração CJ4 ainda apresentava resquícios da fração anterior e a última extração poderia arrastar compostos mais polares, como açúcares e ter menor teor de flavonoides. Além disso, a fração CJ5 foi a de maior massa, sendo, dessa forma, escolhida para dar prosseguimento aos estudos.

4.3.3.2 – Fração Metanólica:

Conforme o fluxograma abaixo (Fig. 5), a fração CJ5 proveniente da CCR da fração metanólica foi ressuspensa em metanol previamente tratado com sulfato de sódio anidro Vetec® para remoção da umidade. A amostra foi filtrada em filtro de papel e, em seguida, submetida a uma extração em fase sólida (*Manifold*, Allcrom®), com cartuchos contendo sílica EFS C-18 (Cromabond® SPE C-18ec). Os cartuchos foram condicionados com a fase móvel a ser utilizada, metanol:água (9:1) e, em seguida, o extrato foi eluído. O material eluído foi recolhido e submetido à análise. A análise da fração foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido UPLC Acquity Waters® acoplado com espectrômetro de massas de captura de elétrons e ionizador químico à pressão atmosférica (APCI). A separação cromatográfica foi feita em coluna Acquity UPLC® BEH (1,7µm, 50x2 mm d.i.) (Waters®). A fase móvel utilizada era composta de água:ácido fórmico 0,1% (solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (solvente B), com protocolo de eluição 0-11 minutos em gradiente linear de 5-95% B. O fluxo foi 0,3 mL/min, e o volume de injeção da amostra de 4,0µL. Registrou-se o espectro de UV de 190-450 nm.

As análises em espectrometria de massas foram realizadas com equipamento operando nas seguintes condições: modos positivo e negativo; voltagem do capilar, 3500 V; temperatura do capilar, 320 °C; voltagem da fonte, 5 kV; temperatura do nebulizador 320 °C; corrente elétrica, 5 mA e gás de arraste nitrogênio, com pressão de 27 psi. As análises foram realizadas no modo *full scan* (100-2000 u). As análises ESI MS/MS foram feitas em um UPLC Acquity Waters®, com hélio como gás de colisão, com energia de colisão de 30 eV. A análise em

espectrômetro de massas foi feita em um analisador quadrupolo acoplado com uma fonte de *eletronspray* no modo negativo. Voltagem do íon spray: -4 kV e voltagem da fenda -60 V.

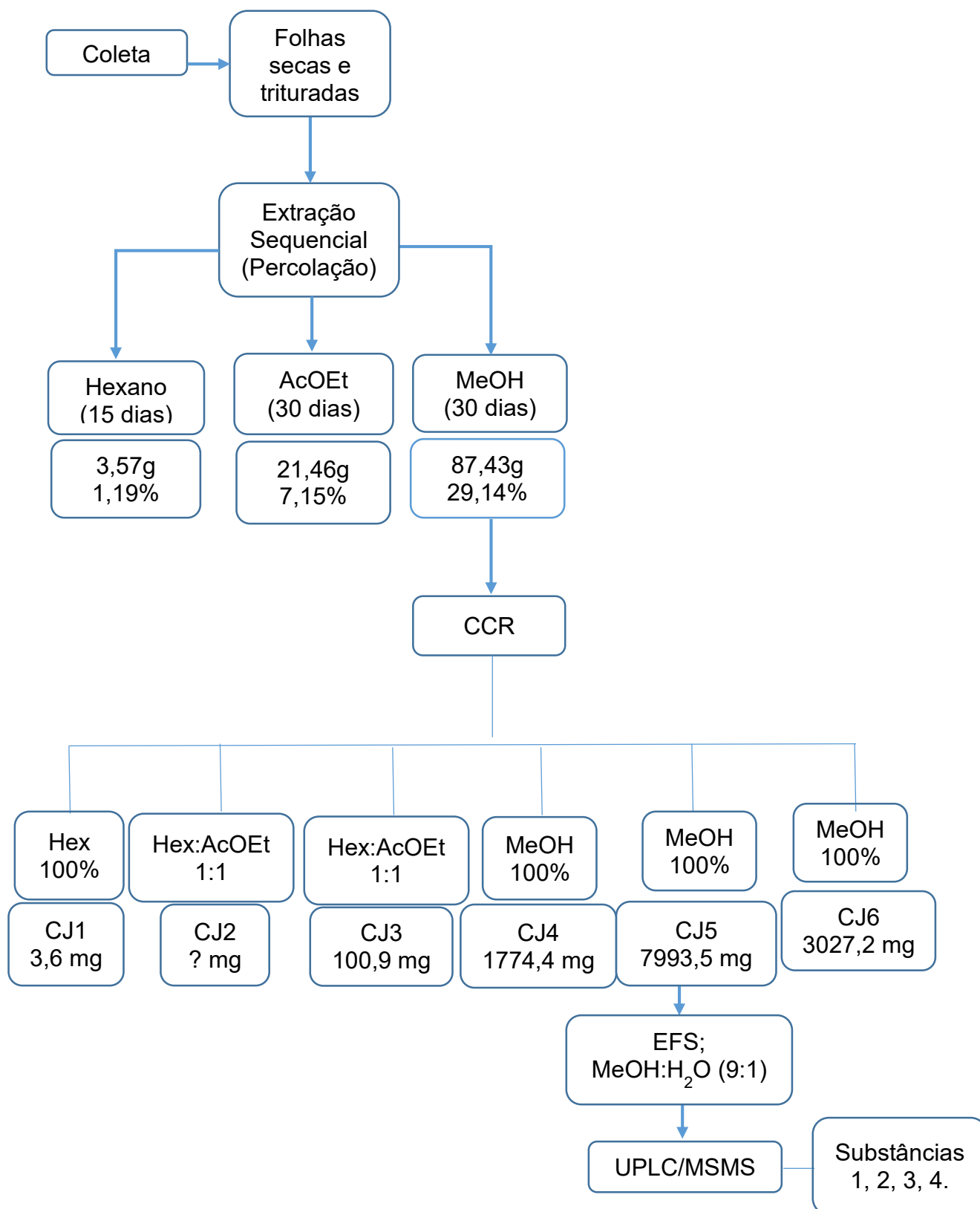


Figura 5: Fluxograma da metodologia de estudos fitoquímicos da fração MeOH de folhas de *Abatia americana*.

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Resultados - Estudos botânicos

Nos indivíduos de *Abatia americana* estudados, as folhas são simples, opostas ou verticiladas, com tricomas tectores em ambas as faces (Fig. 6). Possui margens serreadas, formadas por dentes salicoides. Os indivíduos estudados variaram de 1,0 a 1,5 metros de altura. Suas folhas adultas possuem cerca de 5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, com pecíolo de 1 cm e folhas simples, opostas ou verticiladas, com tricomas em ambas as faces. Possui classificação quanto ao eixo de orientação como apical, de curvatura convexa, simples, simétrica em toda lâmina e na base, com formato elíptico (HICKEY, 1973). A folha possui ápice e base agudos, margem serrada com dentes salicoides e textura membranosa.

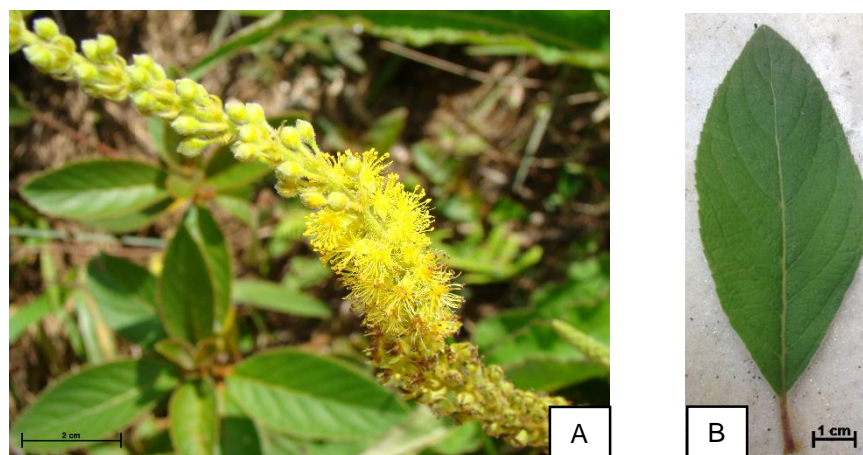


Figura 6: 6A: Aspecto geral de *Abatia americana* (Gardner) Eichler. 6B: Detalhe da folha de *Abatia americana*.

O padrão de nervação da folha é camptódromo-broquidódromo, pois a venação secundária não termina na margem, se juntando em uma série de arcos proeminentes, conforme demonstrado na figura 7, onde é possível se notar que a nervação é interrompida antes de chegar à margem:

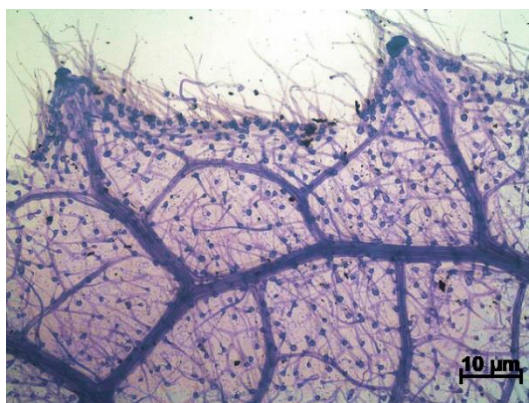


Figura 7: Folha de *Abatia americana* diafanizada (4x).

O limbo foliar, em corte transversal (Fig. 8), mostra que o mesofilo é dorsiventral e hipoestomático. A epiderme da face adaxial é multisseriada com 1, 2 e até raramente 3 estratos de células, mas foi possível observar a alguns trechos com epiderme unisseriada. Possui cutícula delgada e tricomas tectores unicelulares. O parênquima paliçádico é bem diferenciado com um estrato de células bem mais compridas que largas. O parênquima lacunoso é relativamente frouxo com 8-12 camadas de células arredondadas, dispostas verticalmente. A epiderme na face abaxial é unisseriada e os estômatos estão no mesmo nível das células epidérmicas comuns. Tricomas tectores, semelhantes aos da face adaxial, também estão presentes, conferindo à folha uma estrutura pilosa.

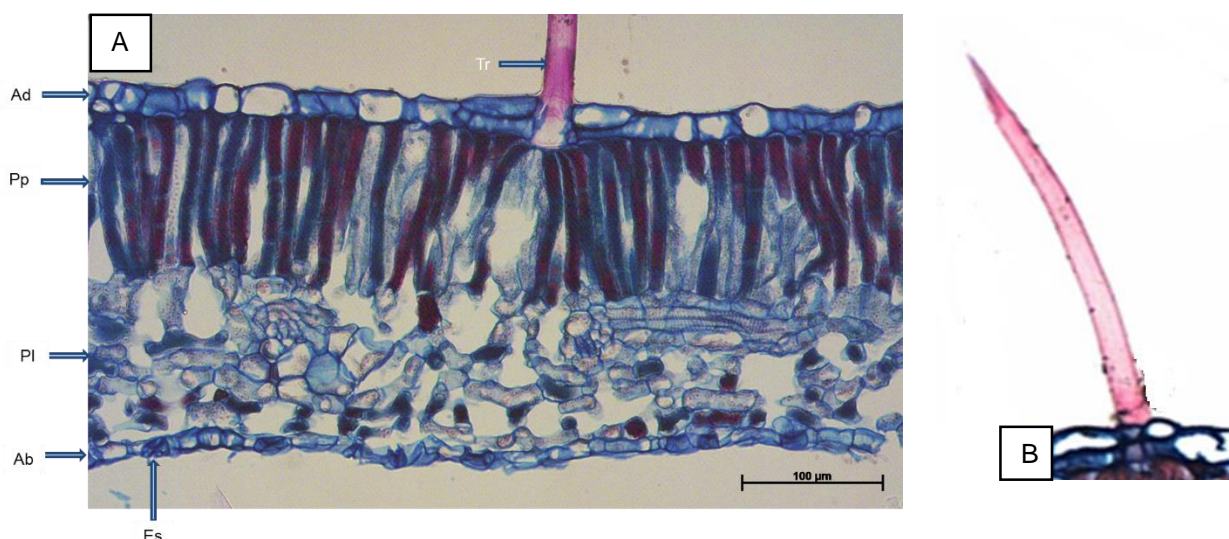


Figura 8: 8A: Corte transversal do limbo foliar de *Abatia americana*. Ab: epiderme da face abaxial; Ad: epiderme da face adaxial; Es: estômato; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico; Tr: tricoma tector. (200x). 8B: Destaque tricoma tector (200x).

A epiderme, em ambas as faces, em vista frontal (Fig. 9), mostra tricomas tectores unicelulares com ornamentação verrucosa da cutícula. As células epidérmicas possuem paredes retas a levemente onduladas na epiderme adaxial. Na face abaxial, a epiderme possui células com paredes levemente sinuosas e estômatos braquiparacíticos.

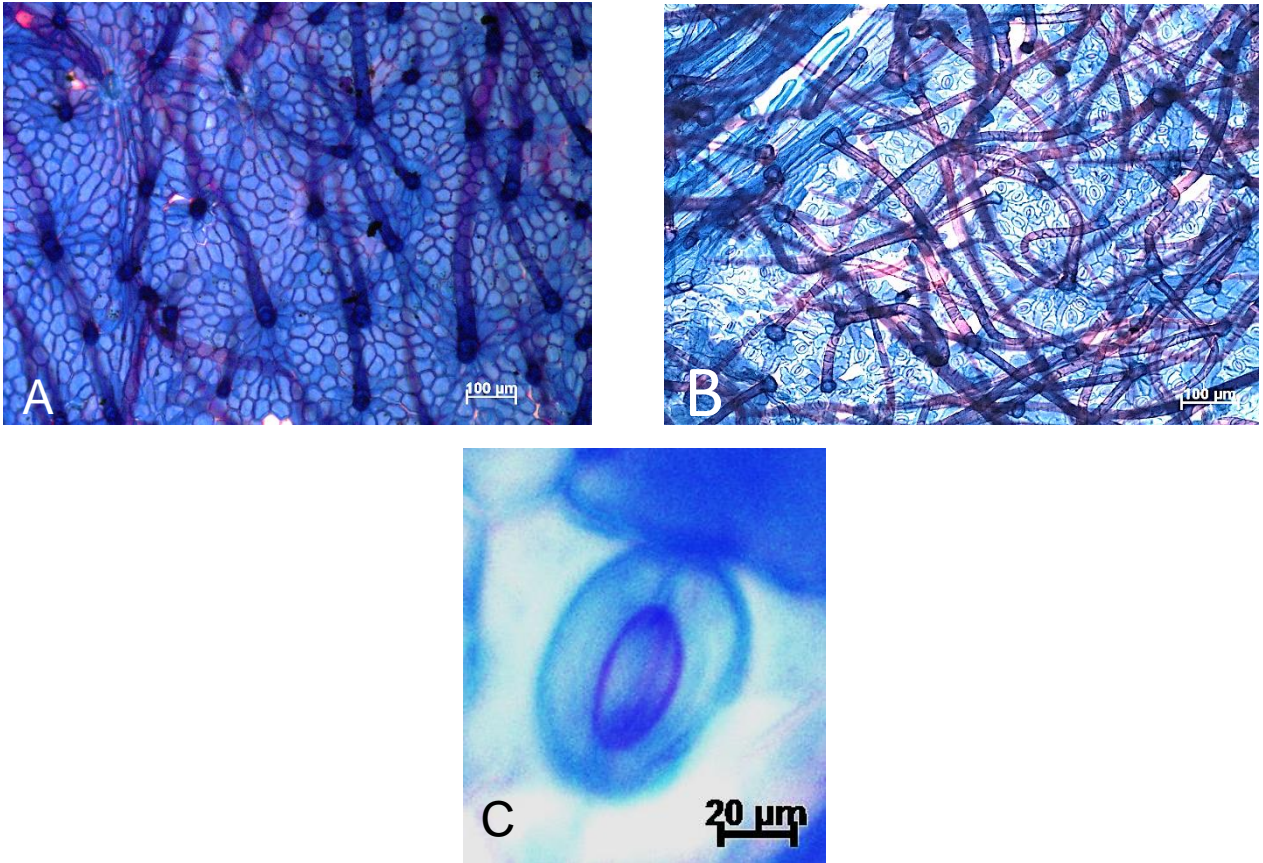


Figura 9: Vista frontal da epiderme foliar de *Abatia americana*. 9A: epiderme da face adaxial (100x); 9B: epiderme da face abaxial (100x); 9C: Detalhe do estômato braquiparacítico na epiderme da face abaxial (400x).

Na nervura central, a epiderme adaxial é uniestratificada. Abaixo da epiderme da face adaxial, surgem 3-4 camadas de colênquima, seguido de parênquima cortical. O feixe vascular possui o xilema de aspecto inteiro, com elementos de condução em fileiras, contando com separação dessas fileiras por células parenquimáticas. Uma bainha esclerenquimática circunda o feixe vascular, com disposição colateral em arco aberto. O floema se estende por fora do xilema, formando um arco. Nota-se 1-2 camadas de células parenquimáticas entre o floema e fibras esclerenquimáticas que

circundam o feixe vascular (Fig. 10). A nervura central tem sistema vascular do tipo sifonostelo.

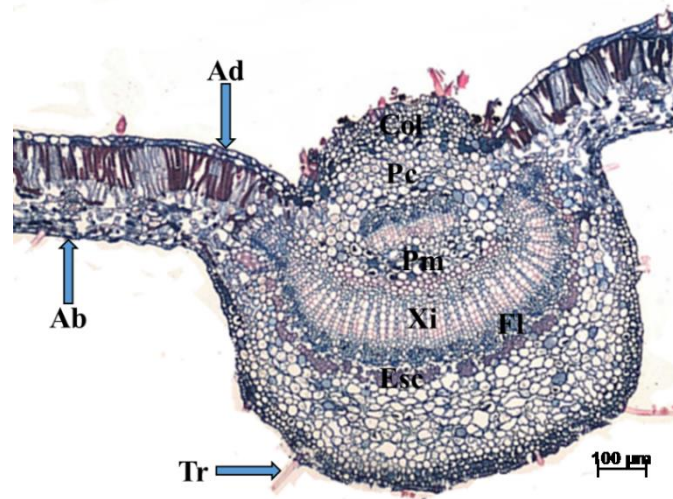


Figura 10: Corte transversal da nervura central da folha de *Abatia americana*. Ab: epiderme da face abaxial; Ad: epiderme da face adaxial; Col: colênquima; Esc: esclerênquima; Fl: floema; Pc: parênquima cortical; Pm: parênquima medular; Xi: xilema; Tr: tricoma (40x).

No ápice da folha, nota-se que a camada de fibras esclerenquimáticas que circundam o feixe vascular é a maior, em relação ao meio e à base da folha, com cerca de 3-4 camadas. O feixe vascular no meio da folha é maior, com a mesma disposição do ápice, mas possui um feixe vascular com formato de cilindro, onde, além do feixe vascular colateral em arco aberto, existe um menor com orientação inversa, circundado por 2-3 camadas de esclerênquima. Essa tendência é mais marcante na base da folha, onde o cilindro formado quase se completa, mas a camada de esclerênquima se interrompe na parte superior do arco (Fig. 11).

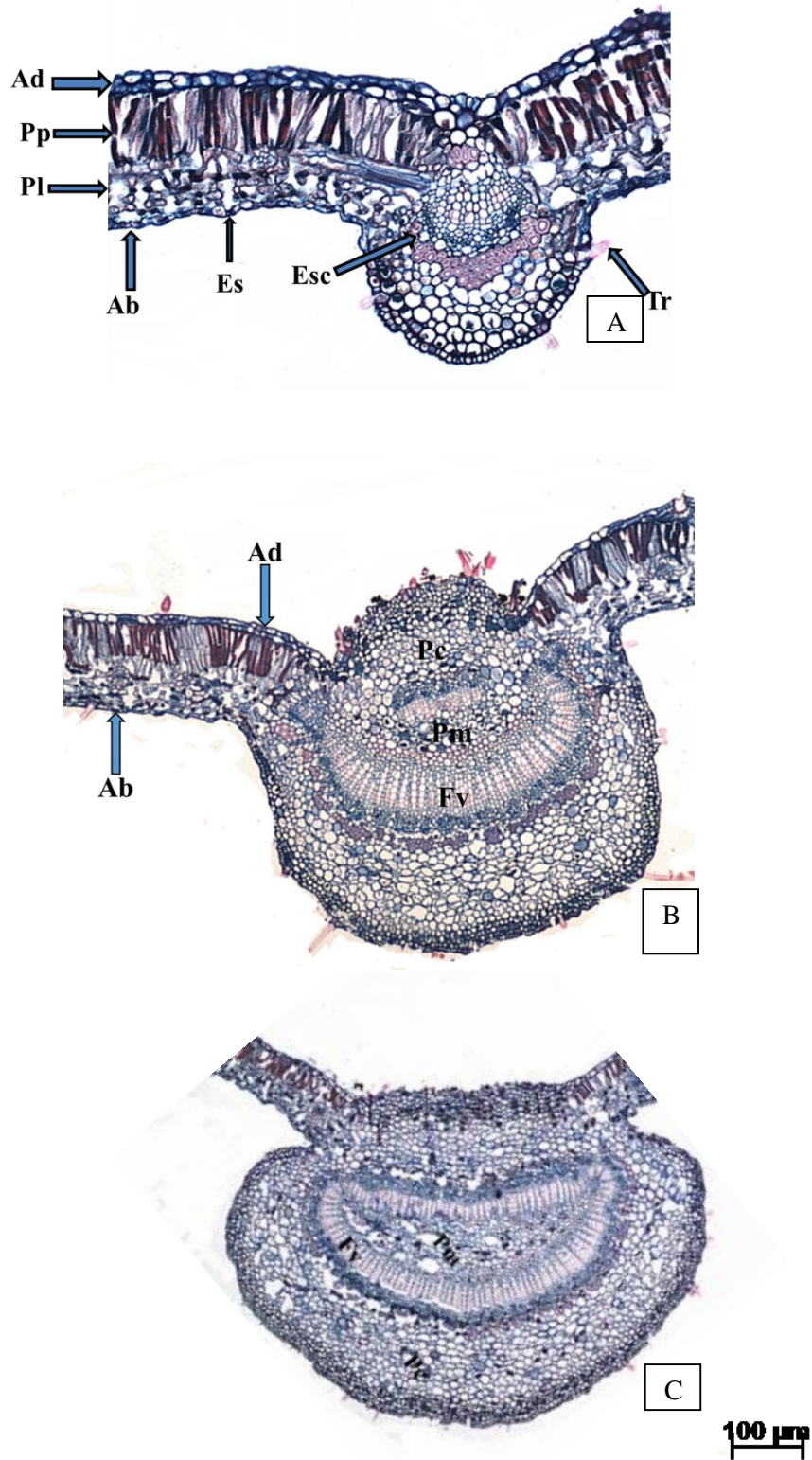


Figura 11: Cortes transversais da folha de *Abatia americana*. 11A: Ápice (400x); 11B: Meio (400x); 11C: Base (400x). Ab: epiderme abaxial; Ad: epiderme adaxial; Esc: esclerênquima; Es: estômato; Pl: parênquima lacunoso; Pp: parênquima paliçádico; Tr: tricoma; Fv: feixe vascular; Pm: parênquima medular; Pc: parênquima cortical.

A figura 12 mostra divisões periclinais de células da protoderme/epiderme jovem, originando uma epiderme pluriestratificada na face adaxial da folha.

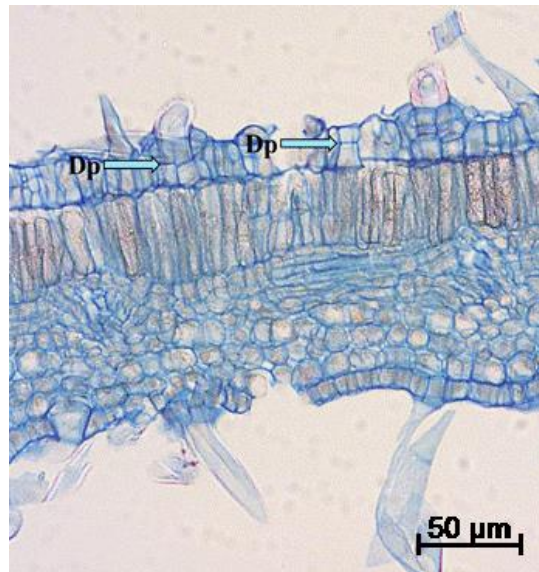


Figura 12: Corte transversal de folha do primeiro nó, não totalmente expandida de *Abatia americana*. Notar divisões periclinais das células, formando a epiderme multisseriada na face adaxial. Dp: divisão periclinal (200x).

O pecíolo possui uma camada de células epidérmicas, apresenta tricomas tectores ornamentados (Fig. 13) seguida de 3-4 camadas de parênquima colenquimatoso e mais de 20 camadas de parênquima cortical. O feixe vascular é colateral em arco aberto com as pontas levemente invaginadas. Assim como na nervura central, possui feixe vascular com xilema praticamente contínuo, com elementos de condução enfileirados e separados por fileiras também paralelas de células predominantemente parenquimáticas. Não possui tecido esclerenquimático na bainha do feixe vascular.

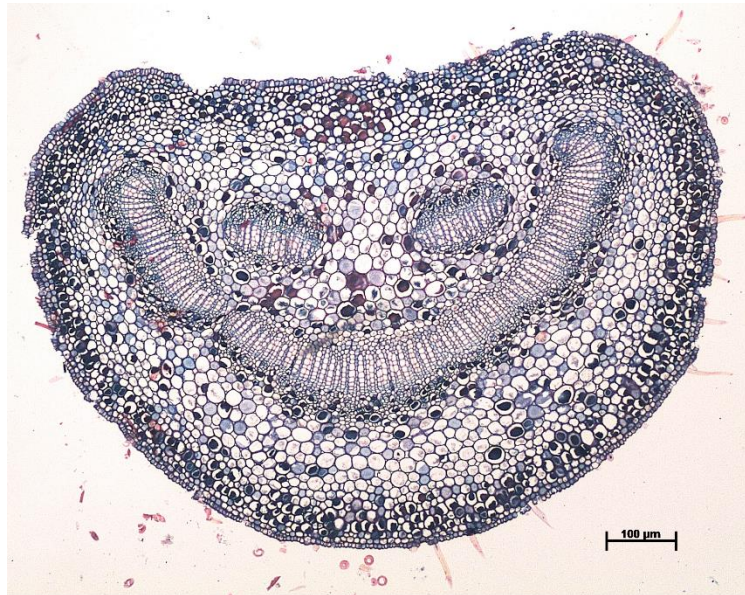


Figura 13: Corte transversal do pecíolo de *Abatia americana*. (40x).

5.1.1 – Estudos Histoquímicos:

Os corantes temporário utilizados forma preparados conforme técnica padrão, sendo eles:

- Cloreto Férrico Proquímios[®]: evidencia a região rica em compostos fenólicos, que se torna enegrecida (JOHANSEN, 1940), precipitando os compostos fenólicos, conforme reação abaixo (Fig. 14):

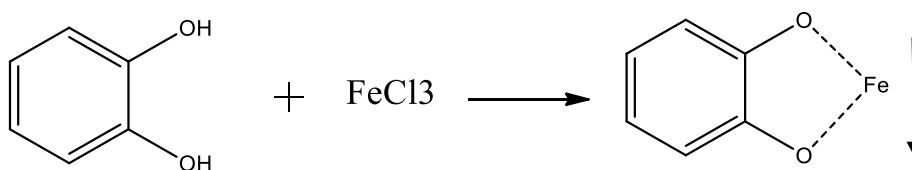


Figura 12: Reação de compostos fenólicos com cloreto férrico.

- Floroglucinol Acidificado Nuclear[®]: cora a lignina de vermelho (JOHANSEN, 1940), uma vez que o floroglucinol (Fig. 15) reage com o ácido coniferílico, dando um cromóforo vermelho em meio clorídrico.

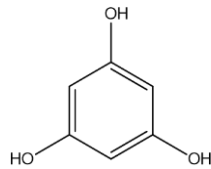


Figura 15: Estrutura química do Floroglucinol.

- Lugol Biotec[®]: cora o amido de roxo ou castanho (KRAUS & ARDUIN, 1997), pois é constituído por iodeto de potássio (KI), um sal iônico que provoca ruptura das pontes de hidrogênio e a consequente separação das várias unidades de glicose que constituem a molécula de amido. O KI permite dessa forma, que o iodo se acumule na molécula de amido.
- Vanilina sulfúrica Proquímios[®]: os taninos condensados coram de laranja vivo a castanho-avermelhado (FIGUEIREDO *et al.*, 2007), formando um produto de condensação resultante da reação dos grupos aldeídicos da vanilina com os fenóis (Fig. 6).

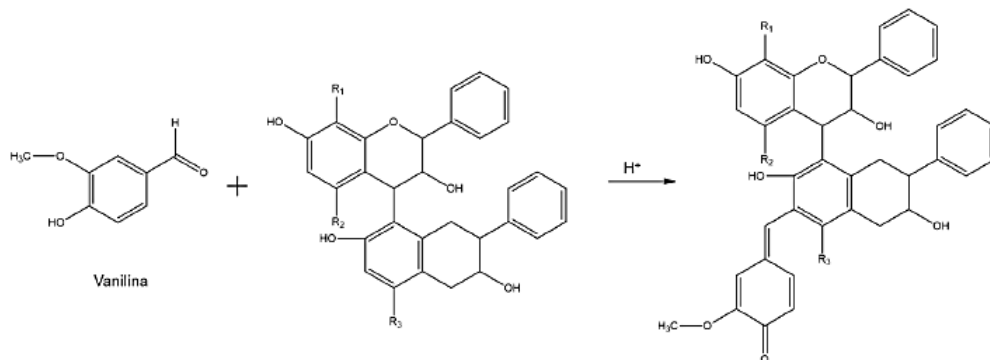


Figura 16: Reação de taninos condensados com a vanilina em meio ácido.

Foram realizadas fotomicrografias de material controle, sem coloração, demonstrado nas figuras 17A e 17B. O cloreto férrico demonstrou a presença de compostos fenólicos distribuídos nos parênquimas paliçádico e lacunoso do limbo foliar, e em algumas células do parênquima cortical e medular da nervura central (Fig. 17C e Fig. 17D) do limbo foliar, que se coraram de marrom a negro. A reação histoquímica com lugol foi negativa (Fig. 17E e Fig. 17F). O floroglucinol acidificado corou de rosa intenso a vermelho na região da nervura central, mais especificamente o xilema, revelando a presença de lignina nessa região e na

região das nervuras secundárias na região entre o meio e a margem (Fig. 17G e Fig. 17H (seta)). O esclerênquima da nervura central corou-se fracamente com esse reagente. A reação com vanilina sulfúrica foi positiva, evidenciando a presença de taninos no mesofilo foliar (Fig. 17I e Fig. 17J). Os resultados estão expressos na Tab. 5:

Tabela 5: Teste histoquímico em folhas de *Abatia americana*.

| Corante Histoquímico | Substância Evidenciada | Resultado |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Cloreto Férrico | Compostos Fenólicos | + |
| Lugol | Amido | - |
| Floroglucinol Acidificado | Lignina | + |
| Vanilina Sulfúrica | Tanino | + |

(+) Positivo; (-) Negativo.

Os resultados obtidos podem ser observados na figura 17:

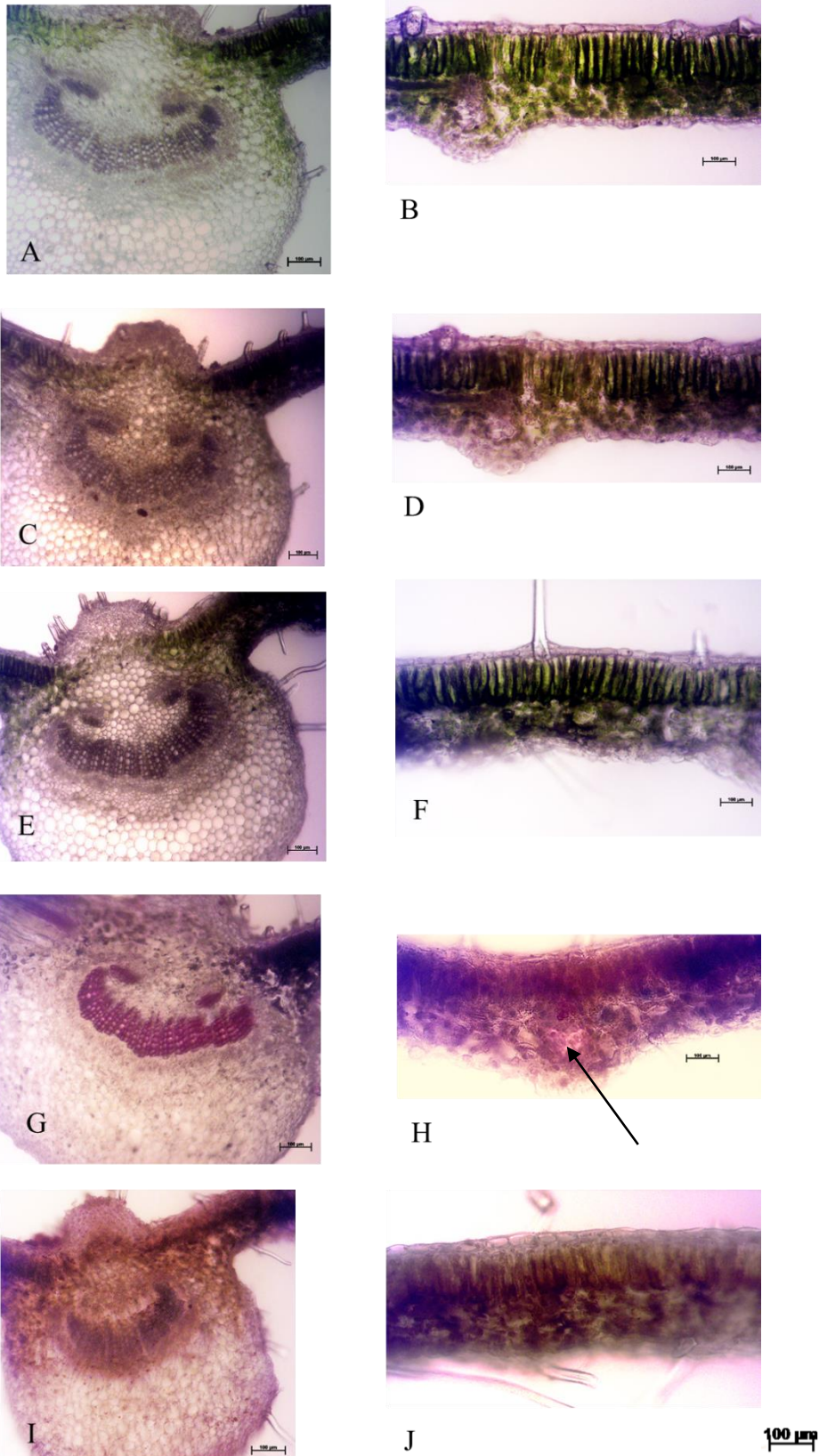


Figura17: Cortes transversais de *Abatia americana*. 17A) Controle, nervura central (10x); 17B) Controle, entremeio e margem (20x); 17C) Cloreto férrico, nervura central (10x); 17D) Cloreto férrico, entremeio e margem (20x); 17E) Lugol, nervura central (10x); 17F) Lugol, entremeio e margem (20x); 17G) Floroglucinol acidificado, nervura central (10x); 17H) Floroglucinol acidificado, entremeio e margem (20x); 17I) Vanilina sulfúrica, nervura central (10x); 17J) Vanilina sulfúrica, entremeio e margem (20x).

5.2 – Discussão- Estudos Botânicos:

De acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil (2015), as espécies de *Abatia americana* encontradas no sudeste brasileiro ocorrem em floresta ombrófila. Entretanto, os indivíduos de *A. americana* estudados foram encontrados em encostas, bordas das matas e matas de capoeira, mostrando que pode se tratar de uma espécie pioneira, segundo a Resolução 423, 12/04/2010, pertencendo à classe de espécies indicadoras da vegetação primária e dos estágios médio e avançado de regeneração.

As folhas de *A. americana* possuem dentes salicoides, corroborando com CHASE *et al.* (2002), que realocou *A. americana*, antes Flacourtiaceae, em Salicaceae utilizando esse caráter como um dos critérios, uma vez que os dentes salicoides são calosidades esféricas escuras que não são opacas nem decíduas e se encontram fusionadas ao ápice do dente (HICKEY, 1973), como foi possível observar em folhas diafanizadas dessa espécie.

Uma característica marcante das folhas de *A. americana* é a presença de epiderme multisseriada na face adaxial, embora THADEO *et al.* (2014) considere a existência de uma hipoderme adaxial em folhas dessa espécie. No acompanhamento da ontogenia da folha, foi possível perceber que células da protoderme/epiderme jovem sofrem divisão periclinal, formando, portanto, uma epiderme multisseriada na folha totalmente expandida ou adulta. Segundo APEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELO-GUERREIRO (2003), a diferenciação entre hipoderme e a epiderme multisseriada é difícil, pois se baseia na ontogênese desses tecidos. A epiderme múltipla origina-se da protoderme, enquanto que a hipoderme é oriunda do sistema fundamental.

Os tricomas tectores ornamentados encontrados em ambas as faces da folha conferem a elas uma estrutura pilosa, mas a maioria dos termos relacionados ao indumento são ambíguos, sendo os termos mais específicos utilizados em chaves de identificação botânica (JUDD *et al.*, 2009).

Quanto aos estudos histoquímicos, THADEO *et al.* (2014) relatam a presença de compostos fenólicos na nervura central de *A. americana*, mais especificamente na região do xilema e em alguns pontos no parênquima medular. Por outro lado, nesse estudo o teste foi positivo para compostos fenólicos também

na região do parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso (mesofilo foliar), não estando presente na epiderme. JUDD *et al.* (2009), também relatam a presença de taninos em outras espécies dessa família, indicando que a presença desses compostos é uma característica comum nas Salicaceae.

Dessa forma, acredita-se que esse estudo seja capaz de associar informações ao estudo anterior, realizado por THADEO *et al.* (2014), aprimorando a classificação dessa espécie, tão recentemente alocada nessa família.

5.3 – Resultados - Estudos Fitoquímicos

5.3.1 – Fração metanólica:

Após purificação dos extratos pelas metodologias descritas foi possível identificar algumas substâncias na fração metanólica. Essas substâncias foram selecionadas baseadas no seu espectro de UV. O espectro *full scan* está demonstrado abaixo (Figura 18).

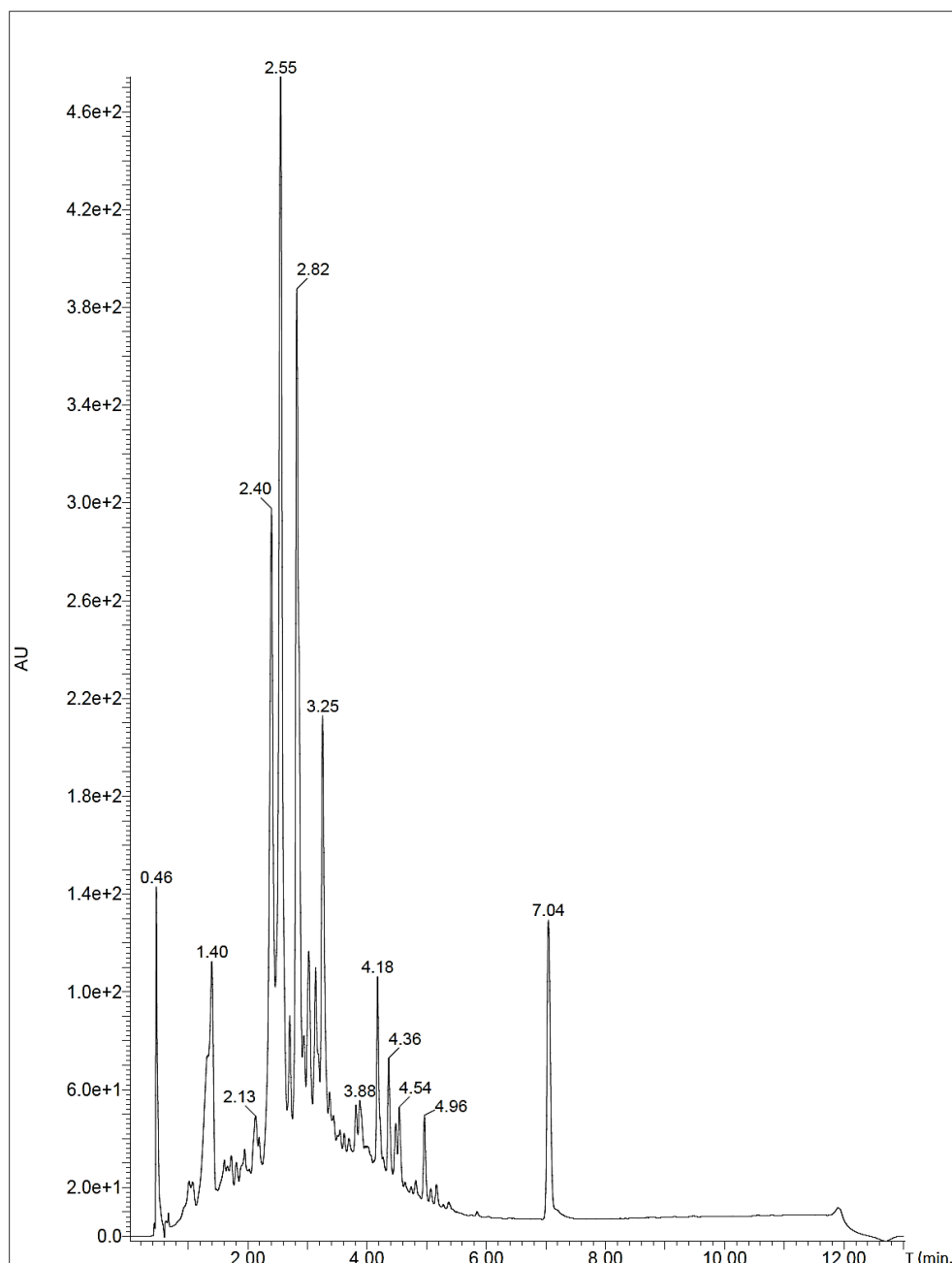


Figura 18: Espectro *full scan* da fração metanólica purificada de *Abatia americana*.

Os tempos de retenção (TR) selecionados para posterior análise foram 2.33, 2.40, 2.43 e 5.73min, uma vez que os espectros de UV extraídos desses picos apresentam-se característicos da classe de flavonoides. Segundo MABRY *et al.* (1970), os espectros de flavonas e flavonóis exibem dois picos de absorção máximos entre 240-300nm. Esses dois picos são comumente referidos como Banda I (300-380nm) e Banda II (240-280nm).

A substância 1 é aquela com menor tempo de retenção (2.33min.), de m/z 609 no espectro de massas no modo negativo. Foram encontrados dois isômeros, sendo que a substância 1 é aquela com espectro 609 e a substancia 1.1 é aquela com espectro de massas 609a.

O espectro de UV da substância 1 demonstrado abaixo (Figura 19), de onde sugere se tratar de uma flavona, uma vez que a banda I para flavonas ocorre entre 304-350nm, segundo MABRY *et al.* (1970).

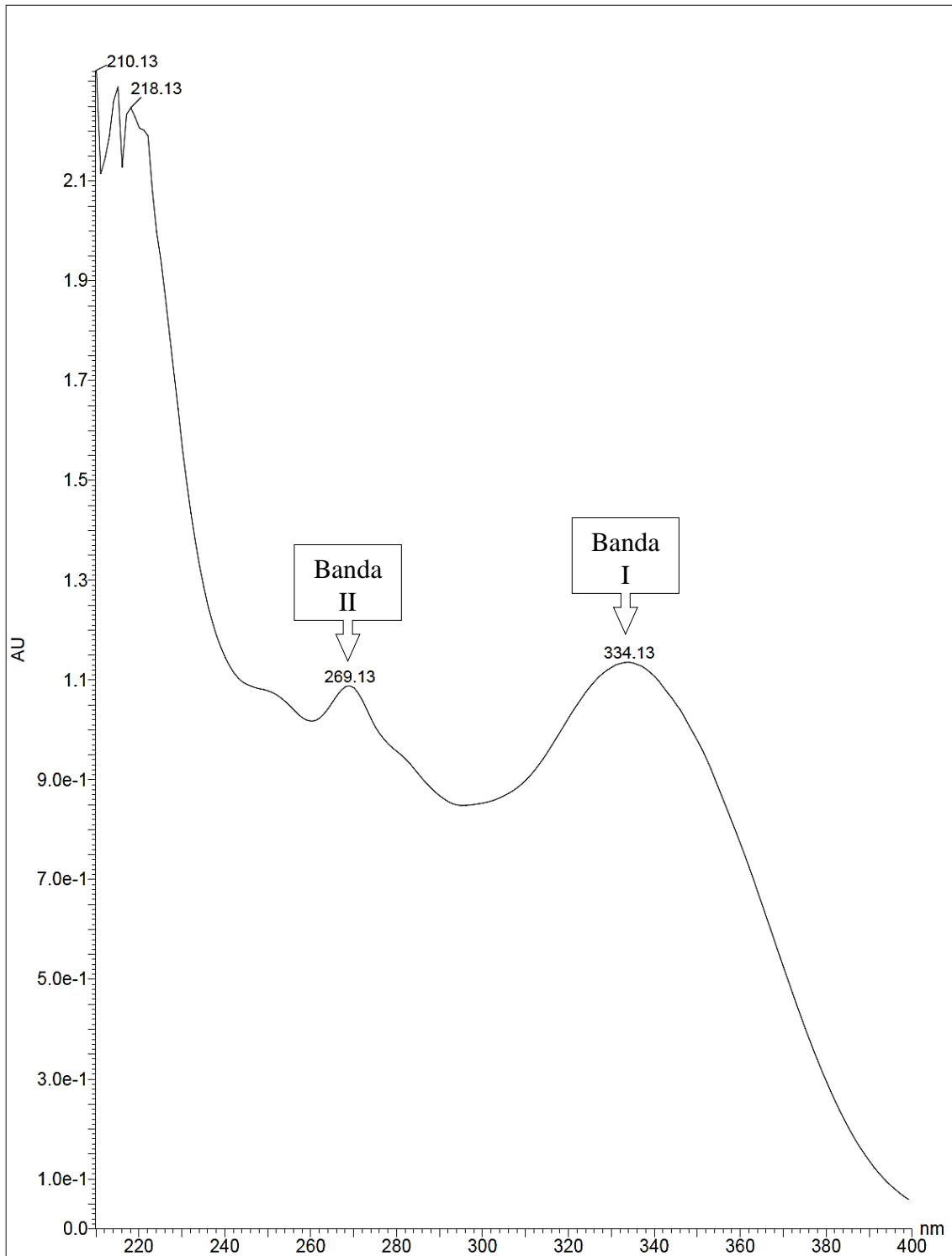


Figura 19: Espectro de UV da substância 1, com tempo de retenção 2.33min da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*.

O espectro de massas da substância 1 (Figura 20) sugere ser um C-heterosídeo, devido à sua fragmentação característica, sem perda de água e sem ocorrência de perda de açúcar em nenhum momento. Como sua fragmentação foi no modo negativo no espectrômetro de massas, e sua m/z foi 609, pode-se concluir que sua massa molecular é 610g/mol.

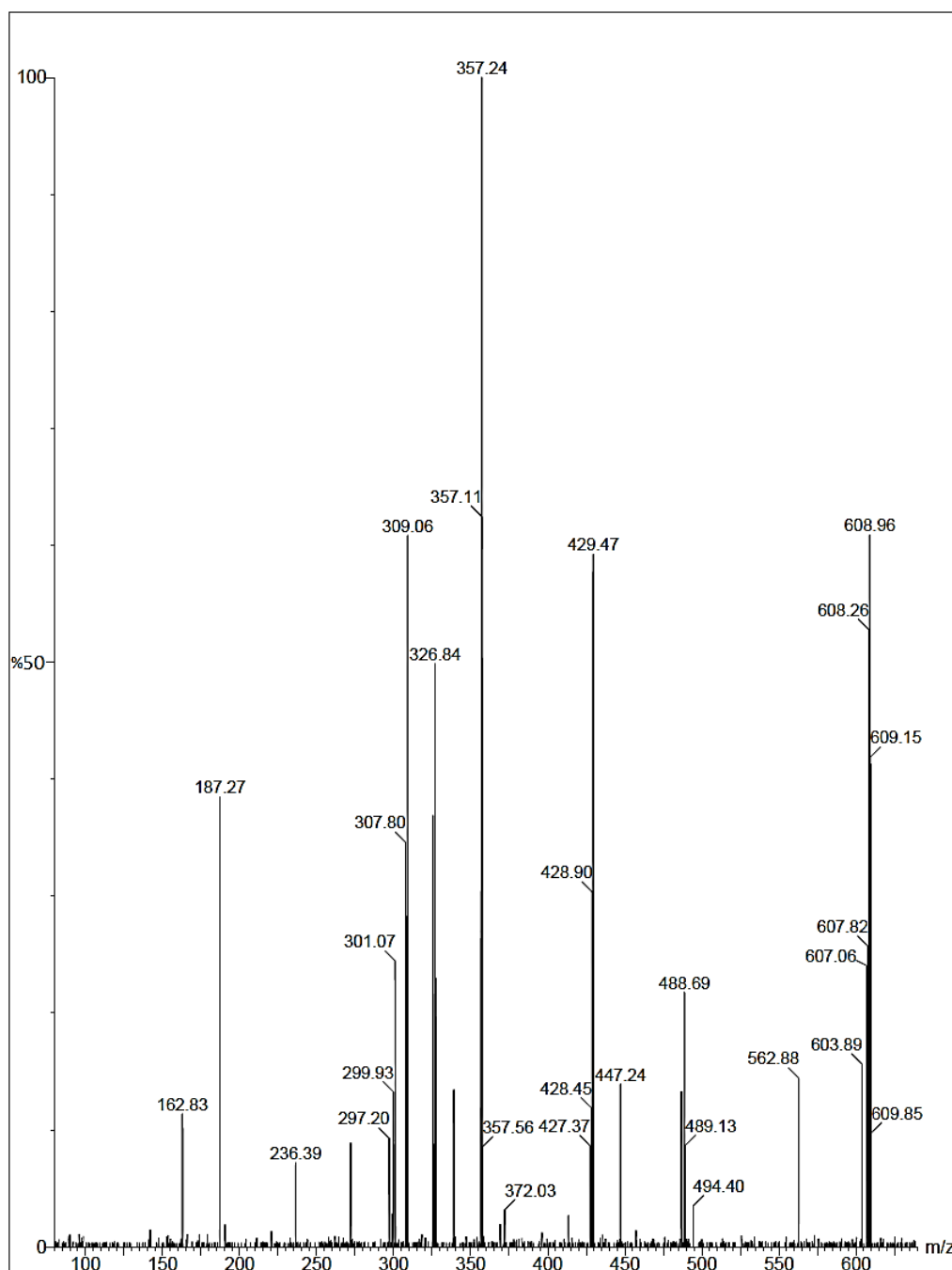


Figura 20: Espectro de massas, modo negativo, da substância 1 (TR: 2.33min) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*.

Dessa forma, segue uma proposta de fragmentação da substância com m/z 609. (Fig. 21):

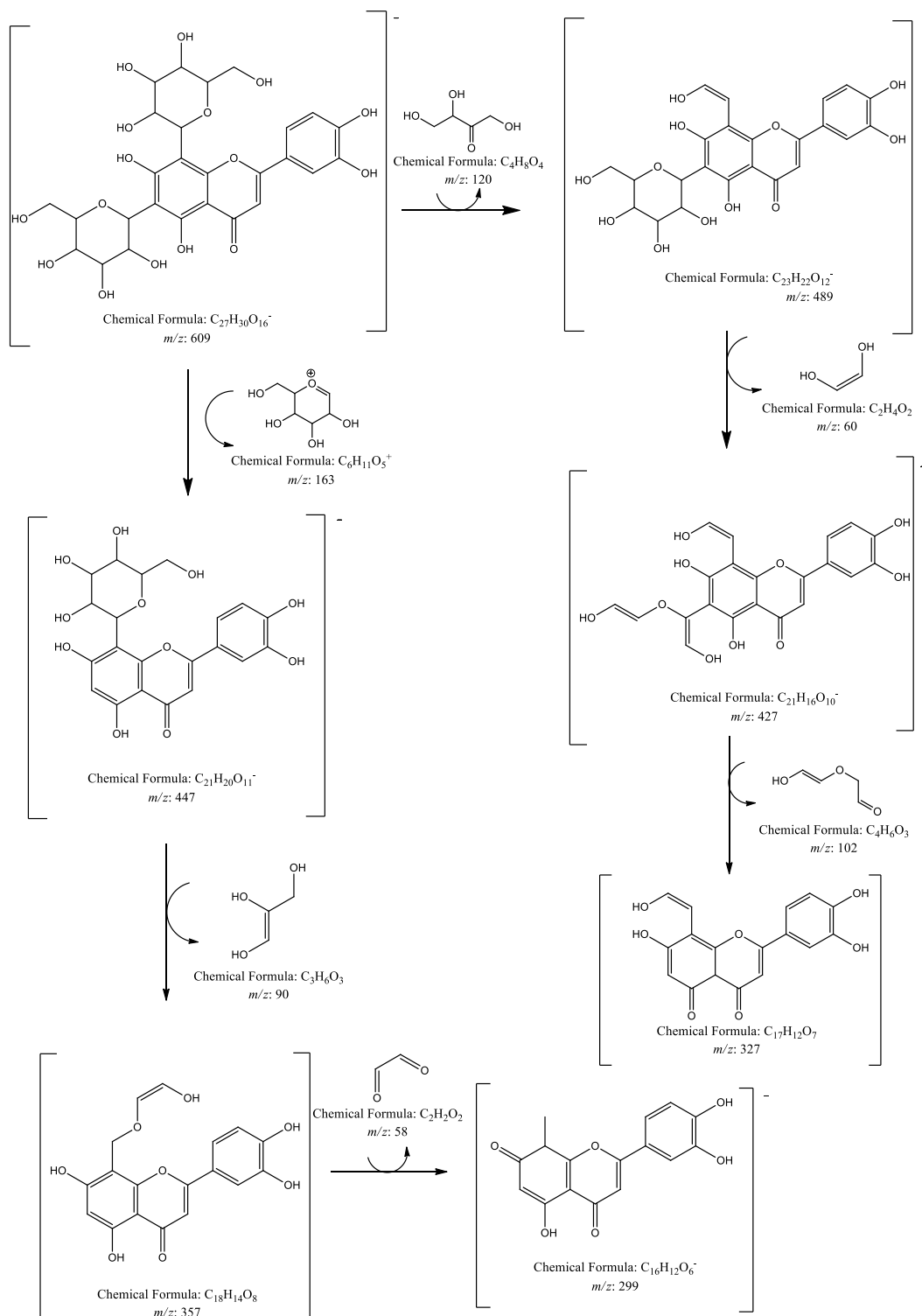


Figura 21: Proposta de fragmentação substância 1 (TR: 2.33min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*. (Adaptada de Colombo *et al.*, 2008; Gattuso *et al.*, 2006).

Como esta proposta está compatível com os fragmentos observados no espectro de massas, pode-se concluir que esta substância 1 se trata da flavona Lucenina-2, o que foi confirmado pela comparação com dados da literatura (Colombo *et al.*, 2008; Gattuso *et al.*, 2006).

A proposta de fragmentação da substância 1 é idêntica à proposta de fragmentação da substância 1.1, diferindo apenas na presença do açúcar na posição 6, onde na substância 1 são encontradas glicoses nas posições 6 e 8, tratando-se da 4-H-1-Benzopiran-4-ona-2-(3,4-dihidróxifenil)-6,8-β-D-diglicopiranosil-5-7-dihidróxi, de nome usual Lucenina-2 (Figura 22) e na substância 1.1 é encontrada uma galactose no lugar de uma das glicoses. De acordo com os dados da literatura (Colombo *et al.*, 2008; Gattuso *et al.*, 2006), pode-se propor que a substância 1.1 se trata da 4-H-1-Benzopiran-4-ona-2-(3,4-dihidróxifenil)-6-β-D-galactopiranosil-8-β-D-glicopiranosil-5-7-dihidróxi (Figura 23). Seu isômero apresenta tempo de retenção 2.68 min.

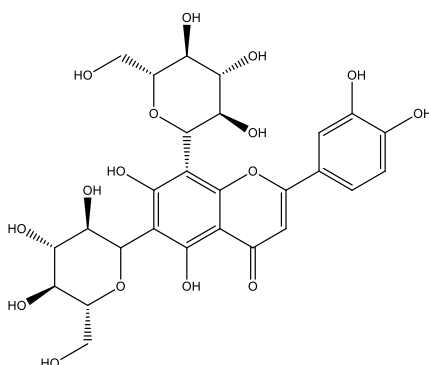


Figura 22: Lucenina-2: 4-H-1-Benzopiran-4-ona-2-(3,4-dihidróxifenil)-6,8-β-D-diglicopiranosil-5-7-dihidróxi.

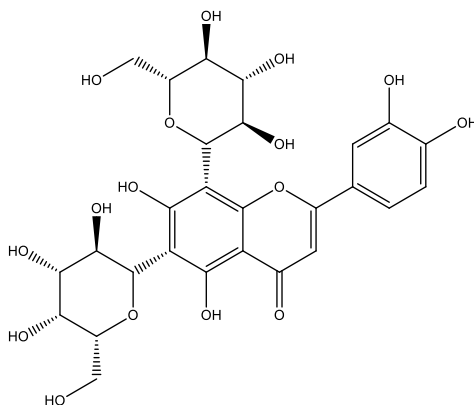


Figura 23: 4-H-1-Benzopiran-4-ona-2-(3,4-dihidróxifenil)-6-β-D-galactopiranosil-8-β-D-glicopiranosil-5-7-dihidróxi.

A substância de tempo de retenção 2.40 min. se trata da substância com m/z 579, da qual segue o espectro de UV, sendo chamada de substância 2. Por meio do espectro abaixo (Figura 24), pode-se concluir que se trata de uma flavona, uma vez que a banda I para flavonas ocorre entre 304-350nm, segundo MABRY *et al.* (1970).

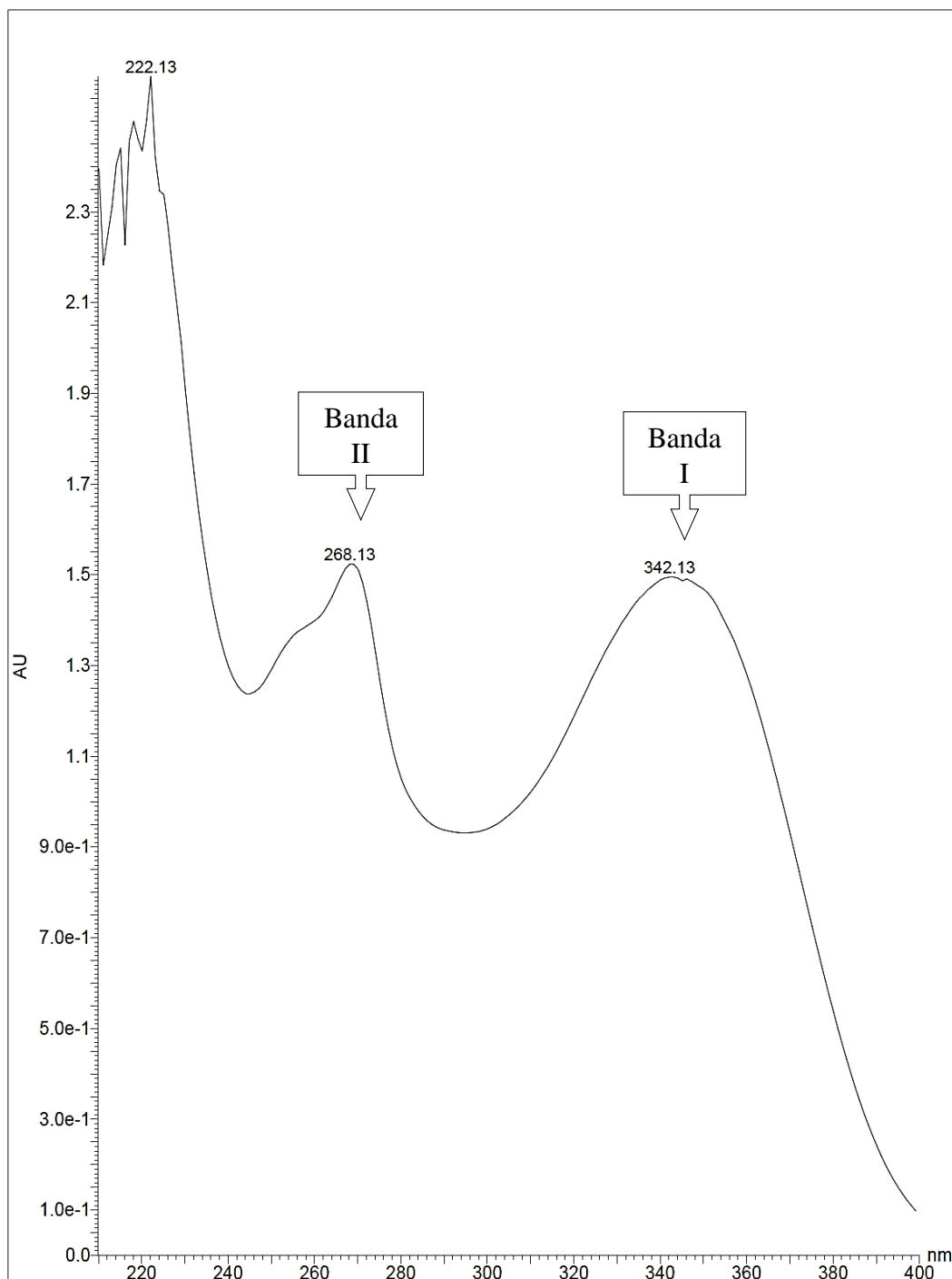


Figura 24: Espectro de UV da substância 2, com TR 2.40 min. da fração metanólica purificada de *Abatia americana*.

O espectro de massas está demonstrado abaixo (Figura 25):

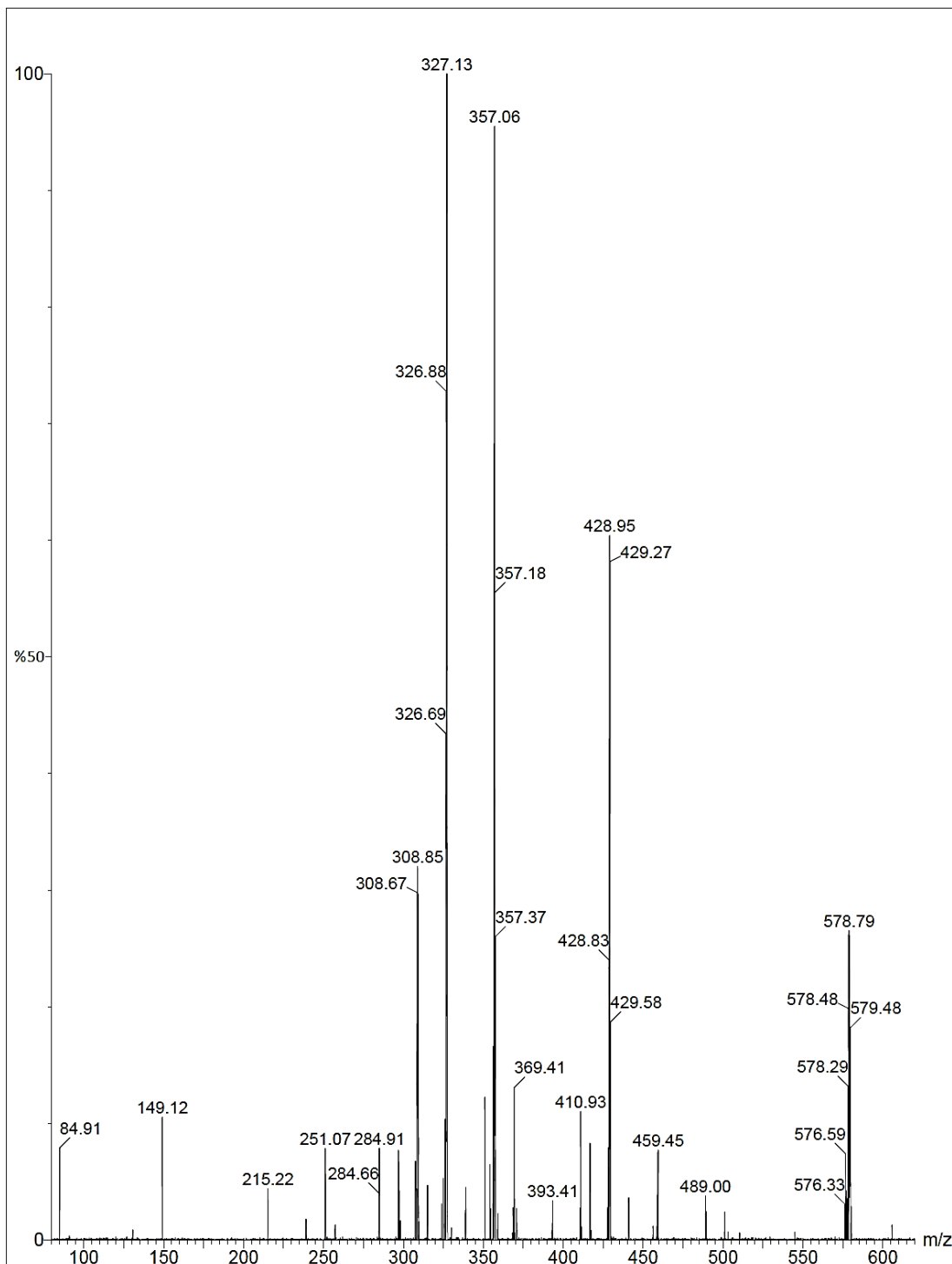


Figura 25: Espectro de massas, no modo negativo, da substância 2 (TR: 2.40 min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*.

Como é possível observar, não há perda de água ou de qualquer açúcar. Dessa forma, pode-se concluir que se trata de um C-heterosídeo, sendo uma proposta de fragmentação está demonstrada abaixo (Figura 26):

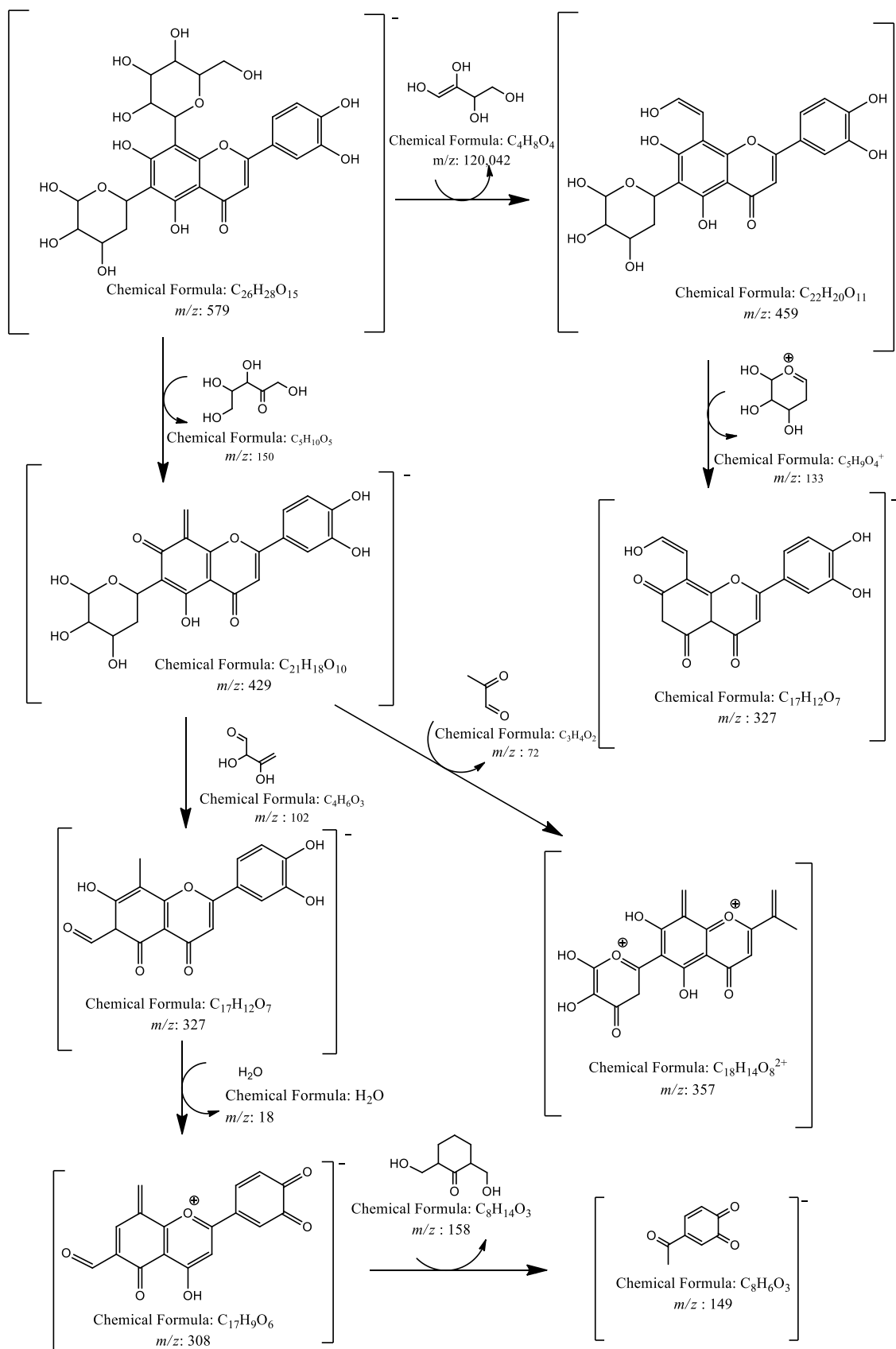


Figura 26: Proposta de fragmentação da substância 2 (TR: 2.40 min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*. (Adaptada de Colombo *et al.*, 2008; Gattuso *et al.*, 2006).

A proposta de fragmentação da substância 2, comparada com dados da literatura indica que esta se trata da Lucenina-1, ou Lucenina-3 ou Lucenina 5. O exemplo de fragmentação foi feito para a Lucenina-1. Suas estruturas são apresentadas abaixo (Figs. 27, 28 e 29). Os tempos de retenção dos isômeros são 5.47 min. e 6.12 min.

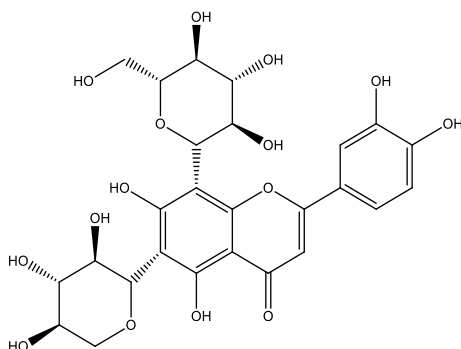


Figura 27: Lucenina-1: 4H-1-Benzopiran-4-one, 2-(3,4-dihidroxiifenil)-8-β-D-glicopiranosil-5,7-dihidroxi-6-β-D-xilopiranosil.

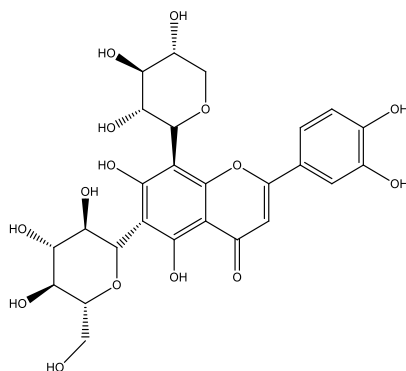


Figura 28: Lucenina-3: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 2-(3,4-dihidroxiifenil)-6-β-D-glicopiranosil-5,7-dihidroxi-8-β-D-xilopiranosil.

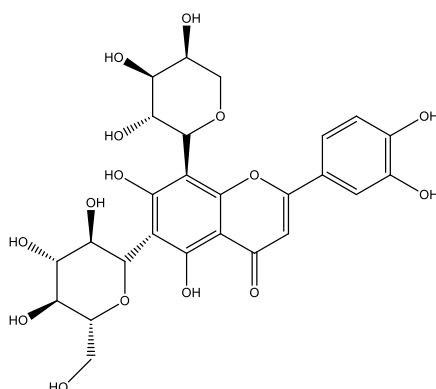
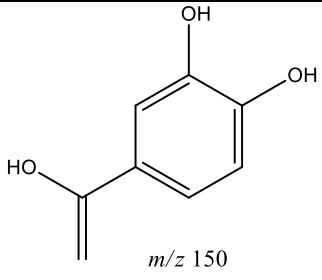
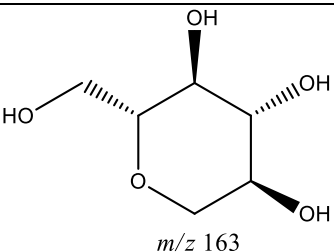
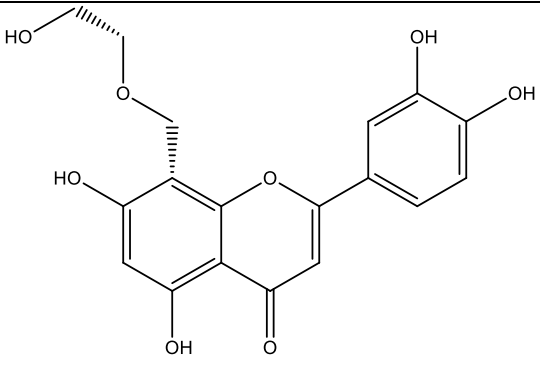
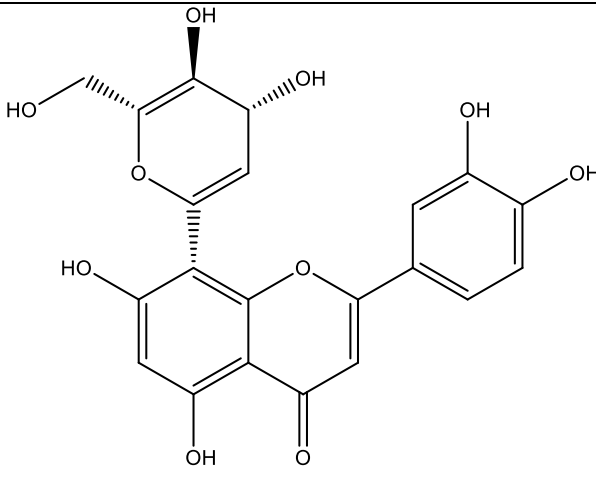


Figura 29: Lucenina-5: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 8-α-L-arabinopiranosil-2-(3,4-dihidroxiifenil)-6-β-D-glicopiranosil-5,7-dihidroxi.

Tabela 6: Exemplos de fragmentos encontrados nos espectros de massas dos três isômeros.

| Fragmento | Isômero A | Isômero B | Isômero C |
|---|--------------|--------------|--------------|
|  <p style="text-align: center;"><i>m/z</i> 150</p> | Sim | Sim | Sim |
|  <p style="text-align: center;"><i>m/z</i> 163</p> | Sim | Sim | Sim |
|  <p style="text-align: center;"><i>m/z</i> 357</p> | Sim | Sim | Sim |
|  <p style="text-align: center;"><i>m/z</i> 428</p> | Sim | Sim | Sim |

A substância 3 é aquela com TR 2.43min. e razão m/z 625g/mol. Seu espectro de UV é demonstrado abaixo (Fig. 30):

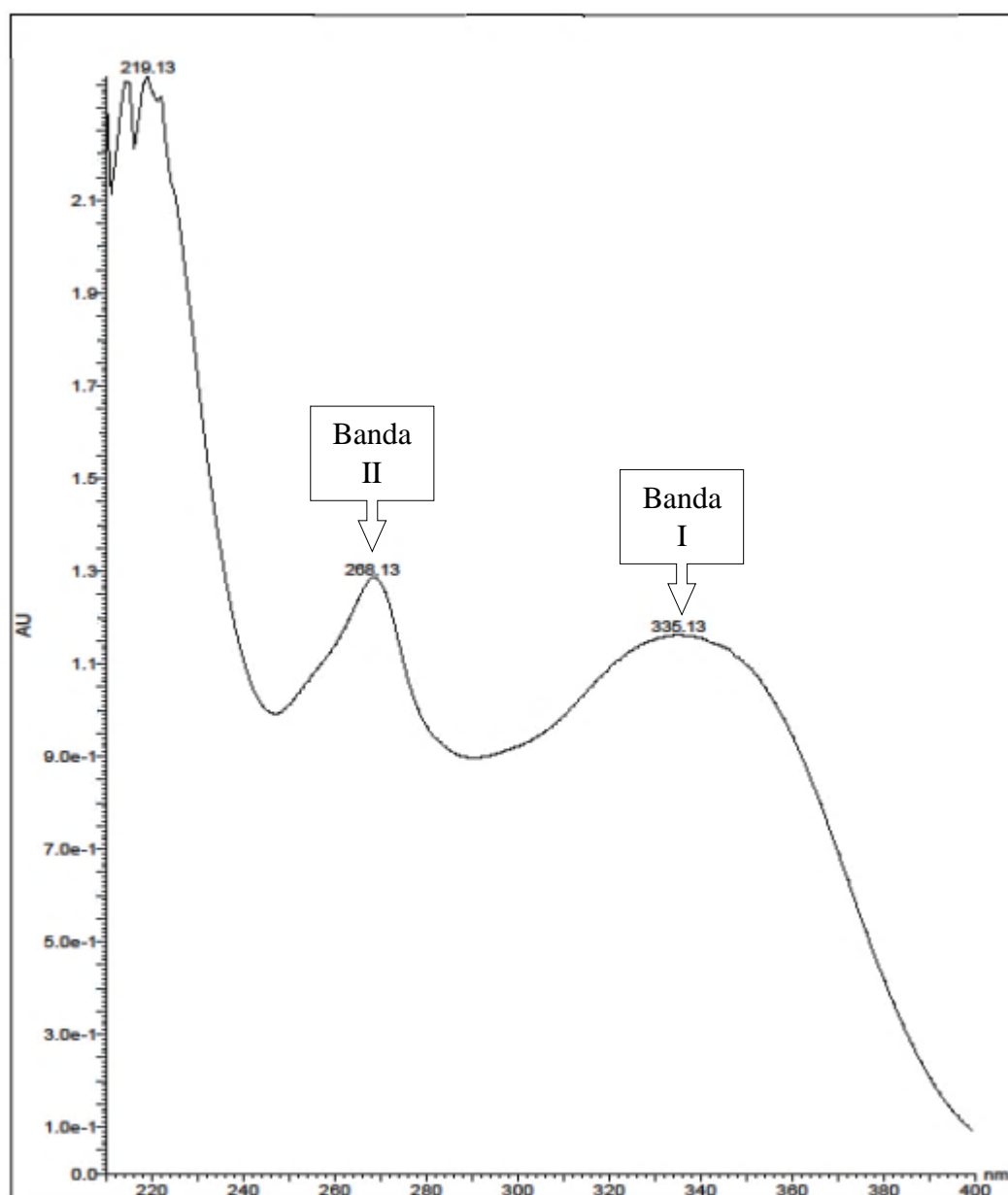


Figura 30: Espectro UV da substância 3 (TR 2.43 min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*.

O espectro de UV da substância 3, m/z 625 demonstra que pode se tratar de uma flavona, uma vez que a banda I para flavonas ocorre entre 304-350nm, segundo MABRY *et al.* (1970).

No espectro de massas da substância 3 (Fig. 31) é possível observar que se trata de um O-heterosídeo, devido a suas fragmentações características, como perda de água e de uma massa equivalente a uma molécula de açúcar. Como sua fragmentação foi no modo negativo no espectrômetro de massas, e sua m/z foi 625, pode-se concluir que sua massa molecular é 626 g/mol.

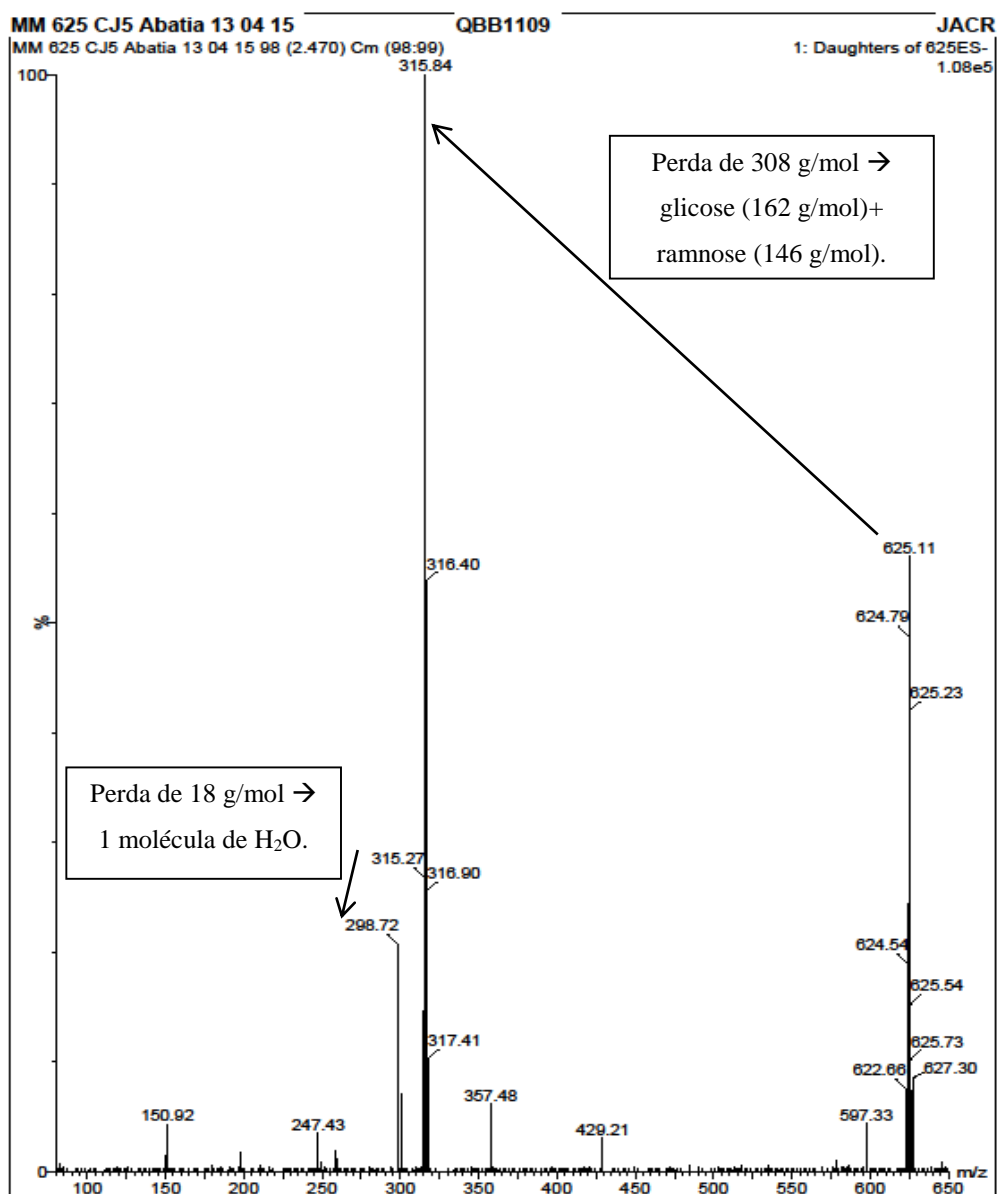


Figura 31: Espectro de massas, no modo negativo, da substância 3 (TR:2.43 min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*.

Sua proposta de fragmentação está demonstrada abaixo, de onde é possível concluir que se trata de uma flavona O-heterosídica não encontrada na literatura pesquisada (Figura 32).

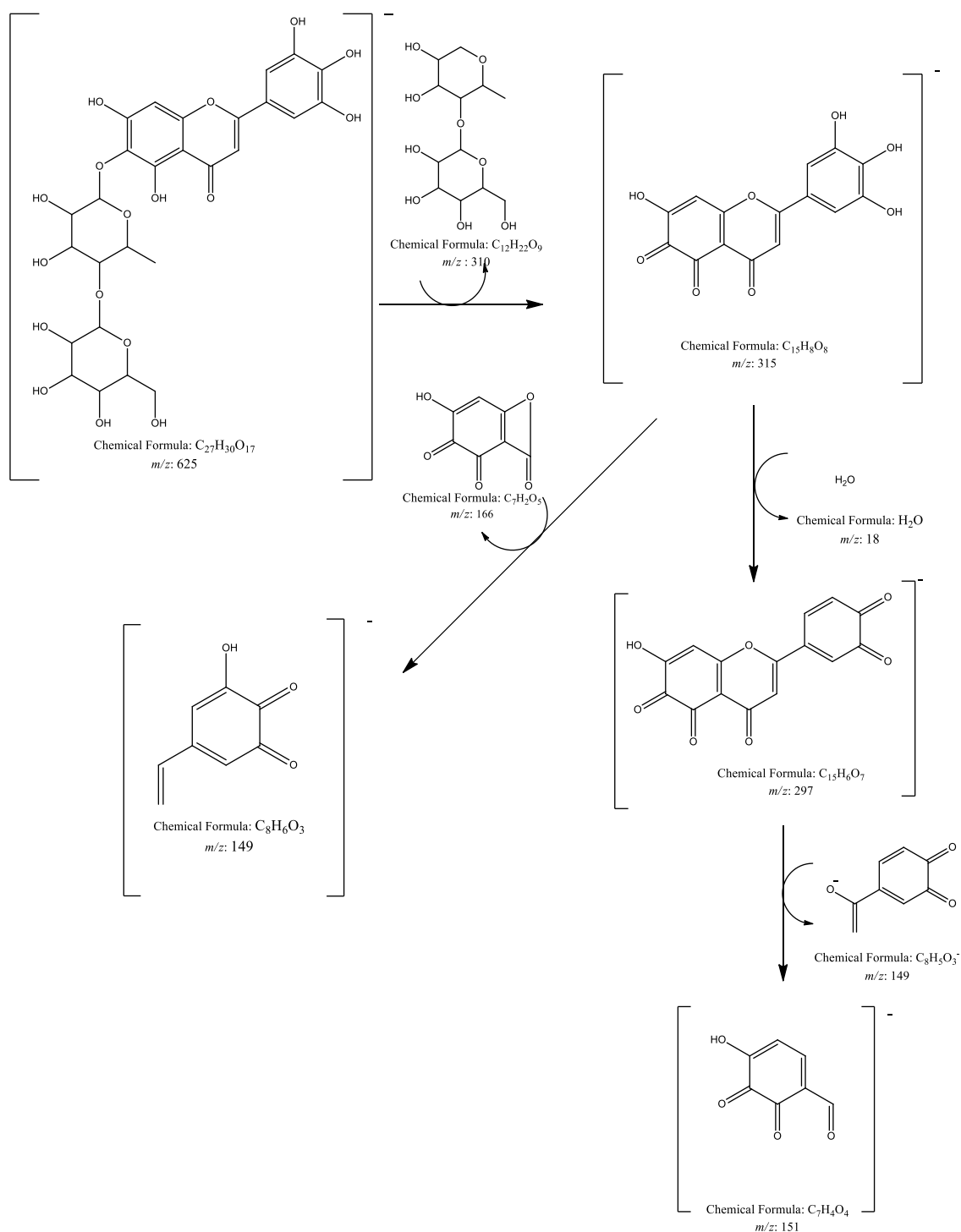


Figura 32: Proposta de fragmentação da substância 3 (TR: 2.43min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana* de folhas de *Abatia americana*. (Adaptada de Colombo *et al.*, 2008; Gattuso *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que a aglicona desse flavonoide foi encontrada na literatura pesquisada e se trata da 4H-1-Benzopiran-4-ona, 5,6,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil), com estrutura demonstrada abaixo (Figura 33):

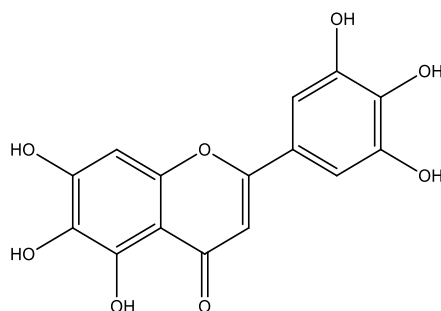


Figura 33: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 5,6,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil).

A substância 4 é aquela de TR 5.73 min. e m/z 577 g/mol. Seu espectro de UV é demonstrado abaixo (Fig. 34). Apesar da banda I ser de baixa intensidade, é possível perceber que ela ocorre em torno dos 280 nm. Portanto pode-se incluir a possibilidade da substância 4 se tratar de uma flavona, uma vez que a banda I para flavonas ocorre entre 304-350 nm, segundo MABRY *et al.* (1970).

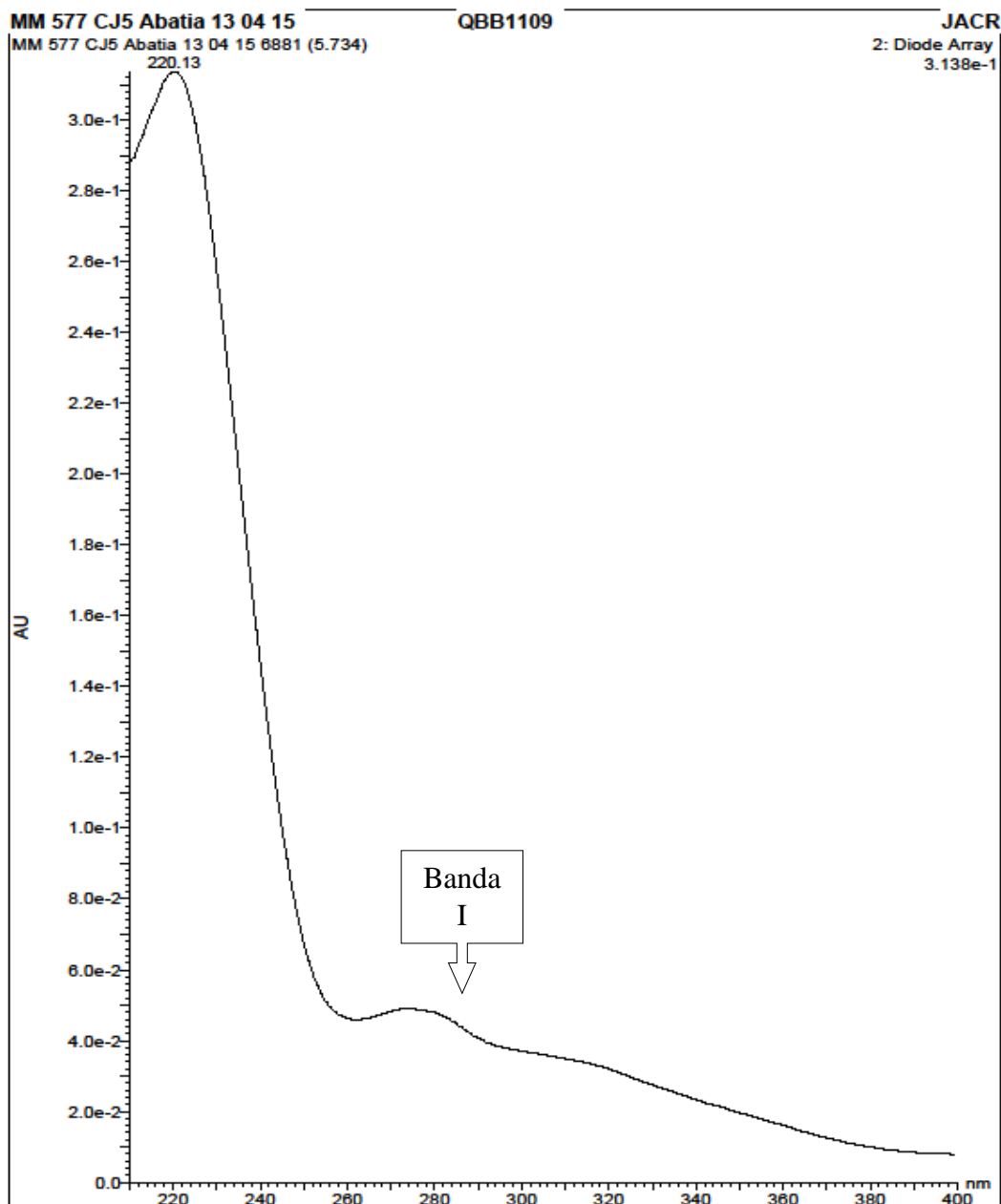


Figura 34: Espectro UV da substância 4, TR: 5,73 min. da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*.

No espectro de massas da substância 4 (Fig. 35) é possível observar que se trata de um O-heterosídeo, devido a suas fragmentações características, como perda de água e de uma massa equivalente a uma molécula de açúcar. Como sua fragmentação foi no modo negativo no espectrômetro de massas, e sua razão massa/carga foi 577, pode-se concluir que sua massa molecular é 578 g/mol.

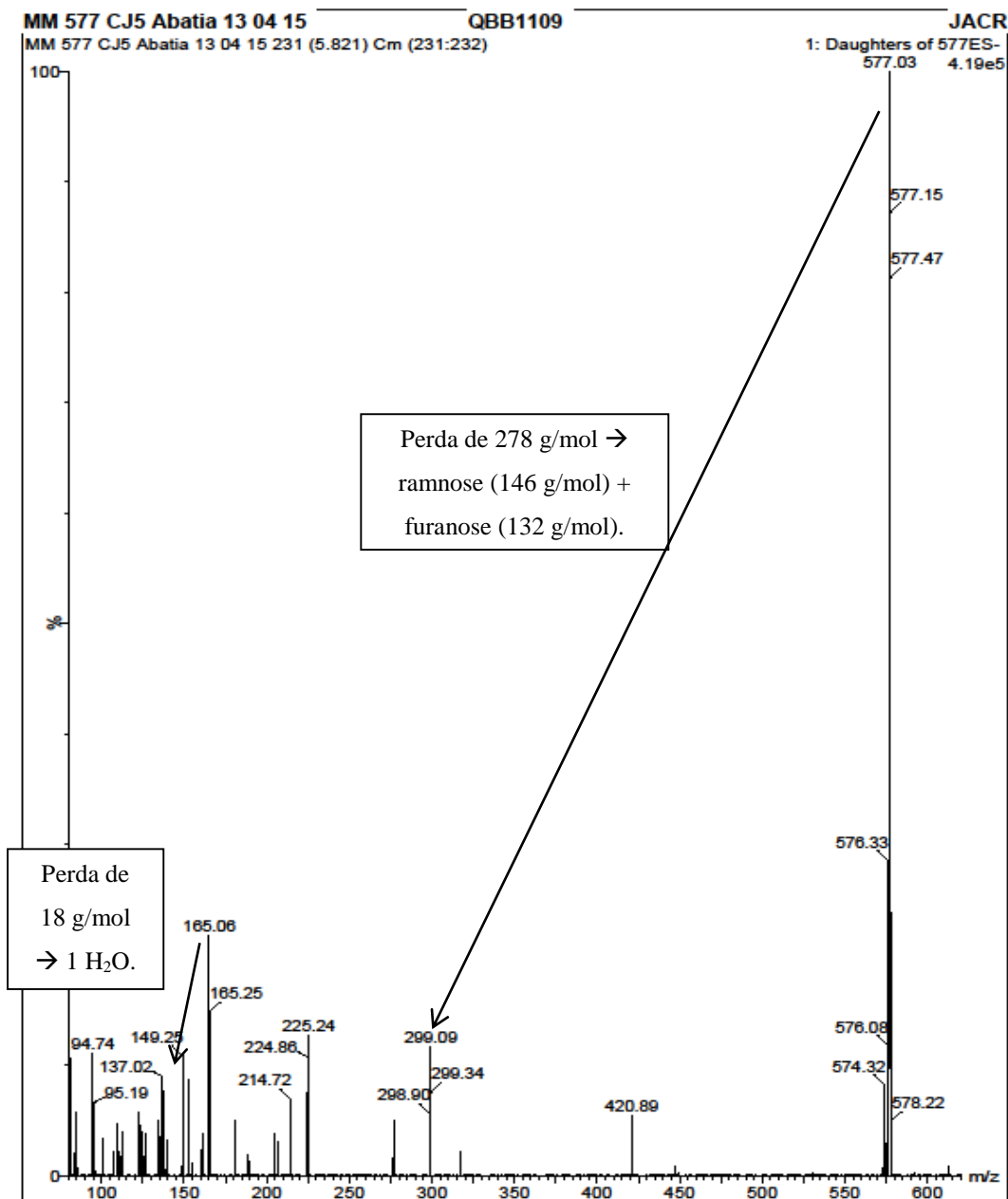


Figura 35: Espectro de massas, no modo negativo, da substância 4 (TR: 5.73 min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*.

A proposta de fragmentação dessa substância está demonstrada a seguir, com fragmentos compatíveis com uma flavona O-heterosídica não encontrada na literatura pesquisada, como ocorreu com a substância 3. A substância 4 também apresenta a genina conhecida, a 4H-1-Benzopirano-4-ona, 5,7-dihidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil), de nome usual diosmetina, conforme a figura 36:

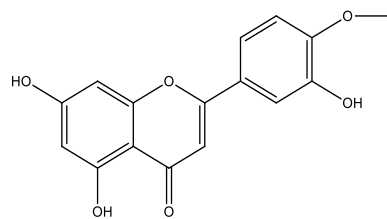


Figura 36: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 5,7-dihidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil).

Uma proposta de fragmentação da flavona com m/z 577 é apresentada a seguir (Fig. 37):

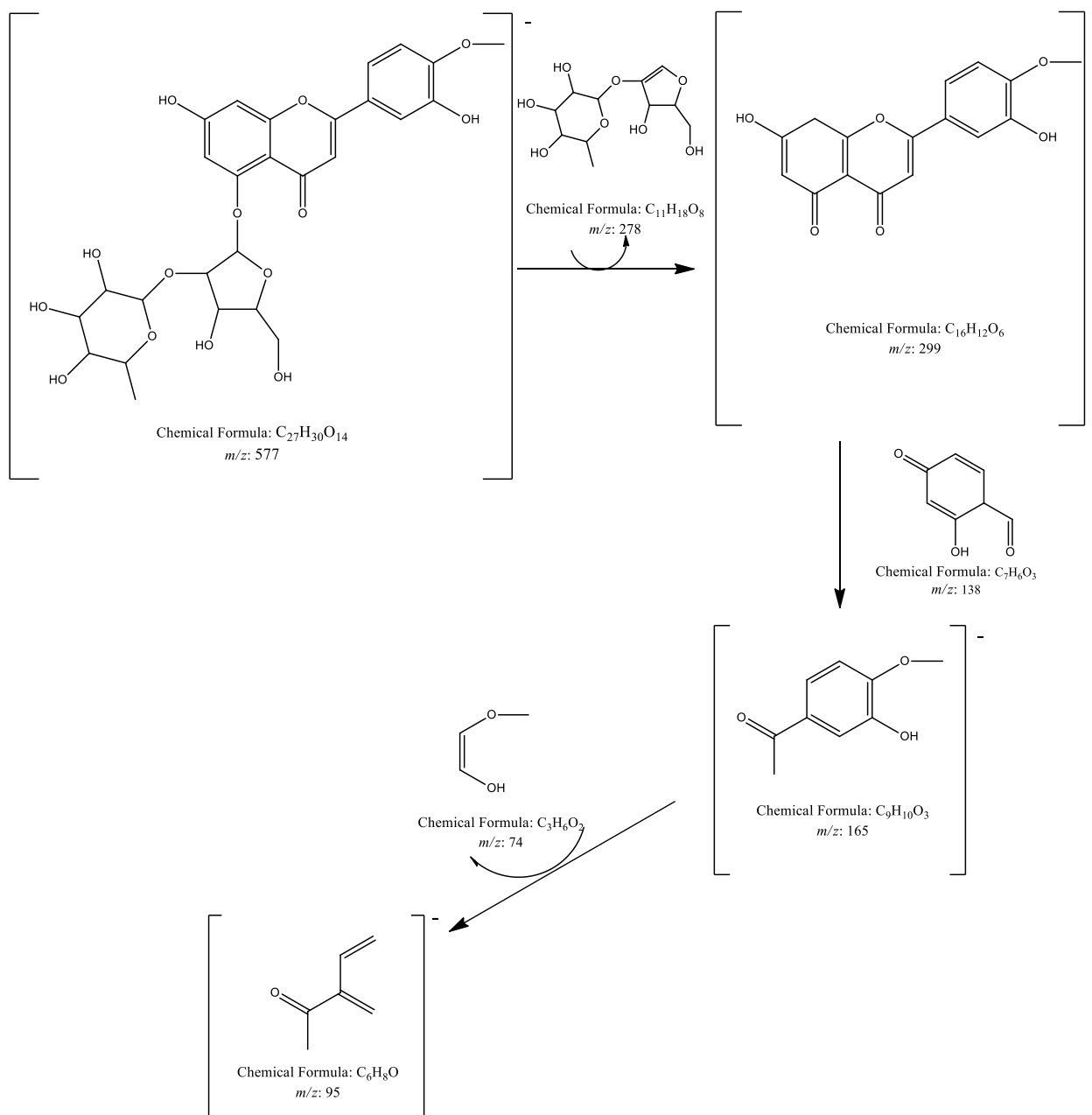


Figura 37: Proposta de fragmentação da substância 4 (TR: 5.73min.) da fração metanólica purificada de folhas de *Abatia americana*. (Adaptada de Colombo *et al.*, 2008; Gattuso *et al.*, 2006).

5.4 – Discussão – Estudos Fitoquímicos:

A percolação, metodologia de extração utilizada nesse estudo, é o processo extrativo que consiste na passagem de solvente através da droga previamente macerada, mantida em percolador, sob velocidade controlada (BRASIL, 2010). Com essa metodologia, foi possível obter um alto rendimento de extratos.

Em um estudo fitoquímico realizado anteriormente (JAMAL, 2002), foram feitos extratos de várias polaridades de folhas de *Abatia americana*, não havendo ainda outro registro de seu estudo fitoquímico na literatura. Esses extratos foram submetidos a processos de purificação e posterior isolamento, onde foram identificados os compostos fenólicos simples ácido vanílico e cinarina; os flavonoides 2-vicenina, hesperitina, hesperidina, rutina, 1-vicenina e fisetina; as naftoquinonas lapachol e tecomaquinona I; mistura de hidrocarbonetos; mistura de ésteres graxos; ácido graxo de cadeia longa, dentre eles, sete álcoois primários de cadeia longa: heptaicosanol, tetraicosanol, hexaicosanol, pentatriacontanol, octapentacontanol, hexatriacontanol e tetratriacontanol; mistura de triterpenos lupeol, α e β -amirinas; esteroides β -sitosterol e carboxilato de β -sitosterila; além de glicose e uma mistura de glicose, sacarose e frutose.

Todos os flavonoides heterosídicos encontrados nesse estudo são diferentes daqueles identificados por JAMAL (2002). Essa diferença pode ser explicada pela época e pelo local de coleta, forma de secagem do material vegetal, que foi espontânea no estudo realizado por JAMAL (2002) e não em estufa de ar circulante a 40°C, fatores ambientais, metodologia aplicada, uma vez que foi realizado neste estudo um *clean-up* em cartuchos C-18 da sub-fração obtida da coluna clássica sob pressão reduzida em fase normal, diferente do outro estudo, onde as frações analisadas foram provenientes de partições do extrato etanólico. Além disso, a metodologia de revelação das placas cromatográficas utilizou outros reveladores, como anisaldeído em ácido sulfúrico, NP/PEG, reagente Dragendorff, vanilina em ácido sulfúrico, Ninhidrina, difeniamina em ácido fosfórico, reagente de Liebermann-Bouchard e sulfato cérico, diferentemente desse estudo onde se focou em flavonoides, utilizando o revelador específico NP/PEG.

6 - CONCLUSÃO

Este estudo mostra que *Abatia americana* (Gardner) Eichler, apesar de não ser uma planta com relatos de utilização na medicina popular na literatura, é rica em compostos fenólicos, sobretudo na subclasse pesquisada, os flavonoides, incluindo alguns ainda não relatados no banco de dados pesquisado, o que é de suma importância para conhecimento de sua composição química.

A metodologia de percolação aqui utilizada, mostrou-se eficaz na extração de substâncias de interesse, possibilitando alto rendimento de extratos. O estudo botânico é importante para o controle de qualidade dessa planta como uma futura droga vegetal, tanto nos aspectos morfológicos quanto histoquímicos, tratando-se de uma metodologia rápida e eficaz.

No estudo realizado por JAMAL (2002), foram realizados testes biológicos com os extratos de *Abatia americana*. No teste de toxicidade frente as larvas de *Artemia salina*, foi detectada maior atividade para os extratos acetoneitrila/clorofórmio de *A. americana*, em relação aos extratos benzênico, diclorometânico e etanólico de galhos e aquoso de folhas, bem como em relação à substância pura lapachol. No testes algesimétrico, foram testados os extratos benzênico, hexânico, acetoneitrila:clorofórmio e aquoso e as seguintes substâncias puras: mistura de hidrocarbonetos, tetraicosanol, hexaicosanol, pentatriacontanol, octapentacontanol, hexatriacontanol e β -sitoesterol e esses não apresentaram atividade analgésica nas condições do experimento. Também realizou teste antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, onde foram testados os extratos benzênico, hexânico, acetoneitrila/clorofórmio e aquoso das folhas, além de extrato benzênico, diclorometânico e etanólico dos galhos e como resultado, nenhum extrato apresentou atividade inibitória considerável, mesmo quando testado em várias diluições.

Sugere-se, portanto, que sejam realizados estudos posteriores de atividades farmacológicas das substâncias encontradas na espécie estudada, uma vez que, segundo MATERSKA (2015), a luteolina e seus C6-hetrosídeos apresentam forte ação inibidora da enzima xantina-oxidase. Dessa forma, apesar de não possuir relatos na literatura sobre a sua utilização na medicina popular,

acredita-se no potencial dessa espécie, podendo ser considerada uma fonte de isolamento de moléculas bioativas.

7 – REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. **As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas.** Revista Brasileira de Farmacognosia- Brazilian Journal of Pharmacognosy 16(Supl.): 678-689, Dez. 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P. **Introdução à etnobotânica.** 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2005.
- ALBANO, M. N.; DA SILVEIRA, M. R.; DANIELSKI, L. G.; FLORENTINO, D. PETRONILHO, F.; PIOVEZAN, A. P. **Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae).** Journal of Ethnopharmacology, v. 147, n. 3, p. 612-617, 2013.
- ALENCAR, N. L. **Medicinal Plants Prescribed in the Hospital of the São Bento Monastery between 1823 and 1824 in Olinda – Northeastern Brazil.** The Open Complementary Medicine Journal, v.2, p. 74-79, 2010.
- ALLEN, G. M., BOND, M. D.; MAIN, M. B. **50 Common native important plants in Florida's ethnobotanical history.** University of Florida. Circular 1439, p. 1-21, 2012.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas Mediciniais.** 2 ed. Salvador: EDUFBA, 2003.
- ANDERSEN O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.** Flórida. Taylor & Francis, 2006.
- APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Anatomia Vegetal. Ed. UFV, Viçosa. 2003.
- BARNES, J., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D. **Herbal Medicines: A Guide for Healthcare Professionals.** Pharmaceutical Press, London. 2ª ed. 2002.
- BECHAM 2000
- BOECKLER, G. A.; GERSHENZON, J.; UNSICKER, S. B. **Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses.** Phytochemistry 72 1497–1509. 2011.
- BORRIS, R. P. **Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company.** Journal of Ethnopharmacology 51 (1/3), 29–38. 1996

- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira. 5ª ed.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 546 p. vol. 1, 2010.
- BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª ed.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 126 p. 2011.
- BRASIL. <http://www.mma.gov.br/mma-em-numeros/biodiversidade-flora>
Acesso em 19/12/2015. Ministério do Meio Ambiente, 2013.
- BRASIL. **Portaria MS/GM No. 971**, de 3 de maio de 2006.
- BRASIL. **Resolução 423**, 12 de abril de 2010.
- BECKHAM 2000.
- BORRIS, R. P. **Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company.** Journal of Ethnopharmacology. 51 (1/3), 29–38. 1996.
- BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde.** Ciência e Saúde coletiva, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.
- BUENZ, E. J. **Techniques: Bioprospecting historical herbal texts by hunting for new leads in old tomes.** Trends in Pharmacological Sciences, v. 25, n.9, p. 494-498, 2004.
- CARRAI, V.; BORGOGNINI-TARLI, S. M.; HUFFMAN, M. A., BARDI, M. **Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self medication in prosimians?** Primates 44:61-66. 2003
- CARVALHO, J. C. T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E. P., **Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos.** in: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P. C. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.

- CAVALCANTE, W. L.; CAMPOS, T. O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. **Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation.** Journal of Ethnopharmacology, v. 112, n. 3, p. 490-7, 2007.
- CHASE M. W.; ZMARZTY, S.; LLEDÓ M. D.; WURDACK, K. J., SWENSEN, S.M.; FAY, M.F. **When in Doubt, Put It in Flacourtiaceae: A Molecular Phylogenetic Analysis Based on Plastid rbcL DNA Sequences.** Kew Bulletin, Vol. 57, No. 1, pp. 141-181(2002).
- COLLINS, D. J.; CULVENOR, C. C. J.; LAMBERTON, J. A.; LODER, J. W; PRICE, J. R. **Plants for medicines.** Journal of Farmaceutical Science, v. 80, p.42-43, 1990.
- COLOMBO, R.; Yariwake, J. H; McCullagh, M. **Study of C- and O-glycosylflavones in Sugarcane Extracts using Liquid Chromatography - Exact Mass Measurement Mass Spectrometry.** Journal of the Brazilian Chemical Society. v. 19. n. 3. p. 483-490. 2008.
- CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia.** ESALQ/USP, 2005. Base de dados. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf>. Acesso em 09/03/2016.
- DE PASQUALE, A. **Pharmacognosy: the oldest modern science.** Journal of Ethnopharmacology 11, 1–16. 1984
- DE MATTOS, E. S.; FREDERICO, M. J.; COLLE, T. D.; DE PIERI, D. V.; PETERS, R. R.; PIOVEZAN, A. P. **Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action.** Journal of Ethnopharmacology, v. 112, n. 1, p. 1-6, 2007.
- DEWICK, PAUL M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** John Wiley & Sons Ltd, 2009.
- DIAS, J. P. S. **A Farmácia e a História: uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica.** Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2005. Disponível em: <<http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacia-e-Historia.pdf>>. Acesso em: 09/03/2016.

- FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. **Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica.** Revista Agro@ambiente On-line, v. 2, n. 2, p. 57-60 jul-dez, 2008.
- FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. G.; ASCENSÃO, L. **Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos.** Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Repto2000. Lisboa. 2007.
- FIGUEIREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JÚNIOR, G. D. **A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios.** Physis Revista de Saúde Coletiva, v.24, n. 2, p. 381-400, 2014.
- FRANÇA, S. C. Abordagens Biotecnológicas para a obtenção de substâncias bioativas. *in*: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P. C. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.
- GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 3, p. 491-494, 1995.
- GATTUSO, G.; CARISTI, C; GARGIULLI, C. BELLOCCO, E.; TOSCANO, G.; LEUZZI, U. **Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (*Citrus bergamia* Risso).** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 54. p. 3929-3935. 2006.
- HARBORNE, J. B. **The Flavonoids-Advances in Research since 1980.** London: Chapman and Hall, 1988.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. **Advances in Flavonoids Research since 1992.** Phytochemistry, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HUFFMAN, M. A. **Animal self-medication and ethnomedicine: exploration and exploitation of the medical properties of plants.** P Nutr Soc 63: 371-381. 2003.
- HICKEY, L.J. **A revised classification of the architecture of Dicotyledonous leaves.** Pp. 23-39. *In*: Metcalfe, C.R. & Chalk, L. Anatomy of the

Dicotyledons - Systematics anatomy of leaf, and stem, with a brief history of the subject. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press. 1973.

- IMATOMI M., PEREZ, S. C. J. G. A., FERREIRA, A. G. **Caracterização e comportamento germinativo de sementes de *Casearia sylvestris* Swartz (SALICACEAE)**. Rev. Bras. Sementes vol.31 no.2 Londrina. 2009.
- JAMAL, C. M. **Estudo fitoquímico de *Casearia sylvestris* Sw. e de *Abatia tomentosa* Mart. (Flacourtiaceae). Análise de derivados fenólicos, por CLAE**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2002.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book. 523p. 1940.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3ª ed. Editora Artmed. Porto Alegre, 2009.
- KRAUS J. E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**, Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro, 1997.
- KRIEF, S.; MARTIN, M.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SÉVENET, T. **Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda**. Antimicrob Agents Ch 48: 3196-3199. 2004.
- Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 02 Set. 2015.
- LIU, L., GUO, Z. CHAI, X., ZHAO, M., LU, Y., TU, P. **Phenolic glycosides from the stems of *Homalium ceylanicum* (Gardner) Bentham (Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato)**. Biochemical Systematics and Ecology 46. 55–58. 2013.
- LUZ, M. T. **Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX**. PHYSYS: Revista de Saúde Coletiva, v.15, p. 145-176, 2005.

- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova 25: 429-438. 2002.
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids.** Springer-Verlag, New York. 1970.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. **Separation and Quantification of Flavonoids** 2005 *in*: ANDERSEN O.M.; MARKHAM, K. R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Flórida. Taylor & Francis, 2006.
- MATERSKA, M. Flavone C-glycosides from *Capsicum annuum* L.: relationships between antioxidant activity and lipophilicity. **European Food Research and Technology.** v. 240. p.549–557. 2015.
- MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L.; ANDREATA, R.H.P. **Histórico e o uso da “salsa parrilha” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento.** Revista Brasileira de Biociências, v. 5, supl. 1, p. 27-29, 2007.
- MEDEIROS, M. F. T. **Etnobotânica histórica: princípios e procedimentos.** Recife: NUPEEA, 2009.
- MOSADDIK M. A., FORSTER, P. I., BOOTH, R., WATERMAN, P. G. **Phenolic glycosides from some Australian species of Flacourtiaceae (*Salicaceae sensu lato*).** Biochemical Systematics and Ecology 35. 166 e 168. 2007c.
- MOSADDIK M. A.,FORSTER, P. I., BOOTH, R., WATERMAN, P. G. **Clerodane diterpenes from the stems of *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides* (*Flacourtiaceae/Salicaceae sensu lato*).** Biochemical Systematics and Ecology 35. 631e 633. 2007b.
- MOSADDIK, A., FORSTER, P. I.; WATERMAN, P. G. **Three new 3-benzylbenzofuran-2-one derivates from *Homalium brachybotrys* (*Flacourtiaceae/Salicaceae s. l.*)** Natural Product Research, vol. 21, n. 13, p.1191-1198. 2007a.
- NACZK M., SHAHIDI F. **Extraction and analysis of phenolics in food.** Journal of Chromatography A, 2004.
- NIESSEN, W.M.A., TINKE, A.P. **Liquid chromatography–mass spectrometry. General principles and instrumentation.** J. Chromatogr. A 703, 37–57. 1995.

- NODARI, M. P. & GUERRA, R. O. **Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos.** in: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P. C. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.
- OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica.** São Paulo: Ateneu, 216p. 1993.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied.** 2 ed. Londres: J & A. Churchill, 1960.
- PELT, J. **Especiarias e ervas aromáticas: história, botânica e culinária.** Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 2004.
- PHILIPPSSEN, A. F. **Caracterização Fitoquímica e Atividades Biológicas de *Xylosma ciliatifolium* (Clos) Eichler, Flacourtiaceae (Salicaceae sensu lato).** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná CURITIBA, 2010.
- PINTO, A. C. **Alguns aspectos da história da Aspirina.** Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008. http://www.iflora.iq.ufrj.br/hist_interessantes/aspirina.pdf Acesso em 12/10/2015, às 10:00h.
- PIRES, M. J. P. **Aspectos históricos dos recursos genéticos de plantas medicinais.** Rodriguésia, v. 35, n. 59, p. 61-66, 1984.
- PRIETO, A. M.; DOS SANTOS, A. G.; OLIVEIRA, A. P.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; VARANDA, E. A.; SOARES, C. P. **Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae).** Food and Chemical Toxicology, v. 53, p. 153-9, 2013.
- POSER, G. L. von.; MENTZ, L. A. **Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação.** in: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P. C. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.
- RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs.** Toxicon 39. 603-613. 2001.

- ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. **O uso terapêutico da flora na história mundial.** Holos, 2015.
- RHODES, M. J. C. **Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems.** *Plant Molecular Biology*, v 24, n. 1, p. 1-20, 1994.
- SAAD, B. **Greco-arab and islamic herbal medicine: a review.** *European Journal of Medicinal Plants*, v. 4, n.3, p. 249-258, 2014.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. **A pesquisa e a produção de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária da interação da indústria da academia.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 12. n. 1. p. 35-40. 2002
- SYED, I. B. **Islamic medicine: 1.000 years ahead of its time.** *Journal of the International Society for the History of Islamic Medicine*, v.2, p. 2-9, 2002.
- SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PETROVICK, P. R. **Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos.** *in: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P. C. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 6ª ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P. C. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6ª ed. Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.
- SOUSA, V. C.; LORENZI, H.; **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII.** Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2005.
- THADEO, M.; AZEVEDO, A. A.; MEIRA, R. M. S. A. **Foliar anatomy of neotropical Salicaceae: potentially useful characters for taxonomy.** *Plant Syst Evol* 300:2073–2089. 2014.
- TURNER, D.M., **Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience.** *Journal of Ethnopharmacology* 51 (1/3), 39–44. 1996.

- VERPOORTE, R. **Some phytochemical aspects of medicinal plant research.**
Journal of Ethnopharmacology 25, 43–59. 1989.
- VLIETINCK, A. J. **Biologically Active Substances from Traditional Drugs.** *in:*
HOSTETTMANN, K. & LEA, P. J. Biologically Active Natural Products. Clarendon
Press, Oxford. 1987.
- WAGNER H.; BLADT. S. **Plant Drug Analyses.** Springer, 2^aed. 384p. Berlim,
1996.
- WILLIAMS, L. O. **The Story of Two Sterile Specimens Annals of the Missouri
Botanical Garden.** Vol. 52, No. 3, Robert E. Woodson, Jr. Memorial Issue,
pp. 485-486. 1965.
- WILLIAMSON, E.; OKPAKO, D.T.; EVANS, F.J. **Selection, Preparation and
Pharmacological Evaluation of Plant Material.** Wiley, Chichester. 1996
- WINK, M. **Physiology of secondary product formation in plants.** Oxford,
Clarendon, 1990.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonoides.** *in:* SIMÕES, C. M. O.,
SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P. C. DE, MENTZ, L. A.,
PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6^a ed.
Editora da UFSC/ Edit. UFRGS. Florianópolis, 2010.