

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIÁH BRANDALISE BARIL

CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA E FITOQUÍMICA DAS PARTES
AÉREAS E ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar*
styraciflua, L., ALTINGIACEAE

CURITIBA
2013

MARIÁH BRANDALISE BARIL

CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA E FITOQUÍMICA DAS PARTES
AÉREAS E ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar*
styraciflua, L., ALTINGIACEAE

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, no Curso de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Tomoe Nakashima

CURITIBA
2013

Baril, Mariáh Brandalise

Caracterização morfoanatômica e fitoquímica das partes aéreas e estudo do óleo essencial das folhas *Liquidambar styraciflua*, L., Altingiaceae / Mariáh Brandalise Baril – Curitiba, 2013.

134 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. *Liquidambar styraciflua*. 2. Altingiaceae. 3. Metabólitos vegetais. 4. Morfoanatomia. 5. Óleo essencial. I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

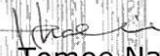
CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIAH BRANDALISE BARIL

Título: **CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA E FITOQUÍMICA DE PARTES AÉREAS E ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua* L., ALTINGIACEAE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Profª. Dra. Tomoe Nakashima
Orientadora


Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Universidade do Vale do Itajaí


Prof. Dr. Yedo Alquini
Centro Universitário Uninter

Curitiba, 25 de fevereiro de 2013.

Às três mulheres da minha vida, Maria
Antônia Brandalise, Marilene Brandalise Baril e Bianca
Brandalise Baril, a quem devo tudo que sou, e ao meu amor
Maurício David de Freitas Filho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a dádiva da vida, guiar meus passos e ouvir minhas preces.

À Família Brandalise, minha querida família, por todo incentivo, suporte, dedicação, paciência e compreensão, por estarem sempre ao meu lado.

À Família Freitas, minha segunda família, por todo apoio e acolhimento,

À minha orientadora, por me aceitar como orientada, acreditar em mim e dar os nortes à este trabalho. Por todos os momentos de conversa e amizade e por todos os conhecimentos transmitidos, serei sempre grata.

À amiga Grazielle Francine Franco Mancarz, minha companheira de ciência nestes 2 anos de estudos e à todos os meus queridos amigos da vida, que me apoiaram e compreenderam os esforços dispensados nesta etapa.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários do Laboratório de Fitoquímica da UFPR, pelos bons momentos compartilhados nestes anos.

Ao Programa de Pós Graduação em Botânica da UFPR e em especial às professoras Cleuza Bona, Érika Mano e Patrícia Soffiatti, por me aceitarem como aluna especial e me proporcionarem imenso conhecimento e encanto com o mundo da anatomia vegetal, em 120 horas de disciplinas, assim como aos amigos biólogos que fizeram parte dessa jornada. Ao senhor Nilson Belém Filho, pelo apoio e auxílio no laboratório de Botânica Estrutural, onde foram realizados os processamentos dos materiais botânicos utilizados neste trabalho.

Ao centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, por permitir a execução das análises ultra-estruturais dos materiais botânicos.

À Maria da Graça Teixeira de Toledo, pelo incentivo e auxílio nos estudos botânicos e químicos.

À Central Analítica do Departamento de Farmácia.

Ao Departamento de Química da UFPR, por realizarem as análises de CG/EM do óleo essencial.

Ao Programa Reuni, por financiar os estudos e proporcionar a vivência acadêmica com as práticas de docência. Aos alunos de graduação, que deram as honras de ouvir as aulas com carinho e dedicação preparadas, pela atenção, interesse e reconhecimento, fazendo com que todo o esforço valesse a pena.

Enfim, à todos aqueles, que, de alguma forma, me incentivaram e me deram forças para que este trabalho fosse realizado, meus mais sinceros agradecimentos.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4:13)

“ Existem apenas dois dias do ano em que não se pode fazer nada: o ontem e o amanhã. Portanto, aproveite o dia de hoje para amar, sentir, crescer e, principalmente, viver. “

(Dalai Lama)

RESUMO

Liquidambar styraciflua é árvore caducifólia, monóica, de tronco ereto, com altura de 20 a 25 metros. Trata-se de uma espécie aromática, originária da América do Norte, popularmente conhecida como “America sweet gum”, “Liquidâmbar”, “Liquidâmbrã” e “Árvore-de-jacaré”. A importância comercial das espécies do gênero *Liquidambar* está relacionada com a indústria do papel e madeira, além de possuírem um elevado potencial como plantas ornamentais. *Liquidambar styraciflua* foi introduzida e aclimatizada no Brasil, cultivada principalmente nas regiões de altitude do Sul e Sudeste do país, sendo considerada, neste sentido, como uma espécie exótica. Os estudos realizados neste trabalho contemplaram a caracterização fitoquímica de *Liquidambar styraciflua*, por meio da pesquisa de diferentes classes de metabólitos bioativos no extrato bruto e frações das folhas e das cascas do caule, a identificação das estruturas morfológicas e anatômicas e das características histoquímicas, bem como a caracterização e identificação de compostos presentes no óleo essencial das folhas e a determinação de parâmetros que permitam o seu controle de qualidade. Na análise fitoquímica preliminar foram identificadas as classes dos glicosídeos antociânicos e saponínicos, taninos hidrolisáveis e condensados, ácidos fixos e aminogrupos, nos extratos aquosos de folhas e cascas do caule. Já nos extratos hidroalcoólicos verificou-se a presença de flavonóides, cumarinas, esteróides e/ou triterpenóides, iridóides, taninos hidrolisáveis e condensados, saponinas e aminogrupos. Determinou-se também as características organolépticas (cor, odor e sabor) e o teor de sólidos dos extratos brutos. Na análise morfoanatômica, a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura dos materiais processados evidenciaram a presença de estômatos paracíticos e tetracíticos, tricomas tectores, presença de drusas na folha e caule, cavidades secretoras de óleo essencial nas folhas, ductos resiníferos e elementos de vaso com placas de perforação escalariforme no caule. A análise histoquímica, por sua vez, permitiu a confirmação de classes de metabólitos previamente verificados nos testes fitoquímicos, caracterizando-se como mais um método para identificação da composição química da espécie. Na extração do óleo essencial, obteve-se rendimento de 0,236 mL% e 0,119 mL% respectivamente, a partir de folhas frescas da primavera e verão, e 0,382 mL% a partir de folhas secas da primavera. Foram realizados, ainda, testes físico-químicos baseados em métodos farmacopeicos, bem como a separação e identificação de compostos presentes, por método cromatográfico. Os compostos majoritários encontrados foram: limoneno, α -terpineol, α -pineno, β -pineno, γ -terpineno, cariofileno, β -cariofileno, α -cariofileno, aromadendreno, α -amorfenol, e 2-careno, em um total de 21 compostos identificados.

Palavras-chave: metabólitos secundários, morfoanatomia, óleo essencial.

ABSTRACT

Liquidambar styraciflua tree is deciduous, monoecious, stem erect, height 20-25 meters. It is an aromatic species, native to North America, popularly known as "America sweet gum", "Liquidambar", "Liquidâmbra" and "Tree-of-alligator". The commercial importance of the genus *Liquidambar* is related to the paper industry and wood, besides having a high potential as ornamentals. *Liquidambar styraciflua* was introduced and acclimatized in Brazil, grown mainly in the altitude of the South and Southeast of the country, being considered, in this sense, as an exotic species. This study was conducted by the phytochemical characterization of *Liquidambar styraciflua*, through research of different classes of bioactive metabolites in the crude extract and fractions of leaves and stem bark, identification of morphological and anatomical structures and histochemical characteristics, as well as the characterization and identification of compounds present in the essential oil of the leaves and the determination of parameters for your quality control. Preliminary phytochemical analysis suggest the presence of anthocyanin glycosides and saponins, hydrolysable and condensed tannins, fixed acids and amino groups in aqueous extracts of leaves and stem bark. Already in the hydro alcoholic extracts, was verified the presence of flavonoids, coumarins, steroids and / or triterpenoids iridoides, hydrolyzable and condensed tannins, saponins and amino groups. It was also determined organoleptic characteristics (color, odor and flavor) and the solid content of the crude extracts. In morphoanatomical analysis, light microscopy and scanning electron microscopy of the processed materials showed the presence of stomata and paracytic tetracytic, trichomes, presence of drusen in the leaf and stem, secretory cavities of essential oil in the leaves, resiniferous ducts and vessel elements with scalariform perforation plates in the stem. The histochemical analysis, in turn, allowed confirmation of classes of metabolites previously checked in phytochemicals tests, being characterized as another method for identifying the chemical species. In the extraction of essential oil was obtained yield of 0.236% and 0.119 mL mL%, respectively, from fresh leaves of spring and summer, and 0.382 mL% from dried leaves of spring. Were performed also physico-chemical methods based on pharmacopeia methods, and the separation and identification of compounds by chromatographic method. The major compounds were: limonene, α -terpineol, α -pinene, beta-pinene, γ -terpinene, caryophyllene, β -caryophyllene, α -caryophyllene, aromadendrene, α -amorfenol, and 2-carene, in a total of 21 compounds identified.

Keywords: secondary metabolites, morphoanatomy, essential oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS GÊNEROS <i>Semiliquidambar, Liquidambar e Altingia</i>	26
FIGURA 2 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	30
FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>Liquidambar</i>	32
FIGURA 4 - ASPECTO DAS FOLHAS OUTONIAIS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	34
FIGURA 5 - ORIGEM DOS COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DO AMINOÁCIDO FENILALANINA.....	37
FIGURA 6 - ESTRUTURA BÁSICA DE UM FLAVONÓIDE	38
FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS TANINOS.....	40
FIGURA 8 - ESTRUTURA GERAL DAS CUMARINAS.....	40
FIGURA 9 - PRINCIPAIS RAMOS INDUSTRIAIS QUE UTILIZAM OS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	44
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DAS ETAPAS ANALÍTICAS DA PESQUISA.....	51
FIGURA 11 - ETAPAS DE PREPARO DAS LÂMINAS PERMANENTES E SEMI- PERMANENTES POR INFILTRAÇÃO E INCLUSÃO EM HISTORESINA E PEG 1500.....	54
FIGURA 12 - SUPORTES METÁLICOS COM AS AMOSTRAS PARA ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	56
FIGURA 13 - EXEMPLO DE MEDIDA DO COMPRIMENTO DE FOLHA UTILIZADA NO CÁLCULO DAS MÉDIAS DAS DIMENSÕES	77
FIGURA 14 - EXEMPLO DE MEDIDA DE LARGURA DE FOLHA UTILIZADA NO CÁLCULO DAS MÉDIAS DAS DIMENSÕES	77
FIGURA 15 - ASPECTO GERAL DA ÁRVORE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	78
FIGURA 16 - ASPECTO GERAL DO TRONCO DA ÁRVORE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	79
FIGURA 17 - DETALHE DAS CASCAS DO TRONCO DA ÁRVORE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	79
FIGURA 18 - DETALHE DA COPA E ASPECTO DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	80
FIGURA 19 - ASPECTO GERAL DA COPA DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	80
FIGURA 20 - ASPECTO DA FACE ABAXIAL DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i> , COLETADAS NO PERÍODO DO OUTONO.....	81
FIGURA 21 - EVIDÊNCIA MACROSCÓPICA DA PRESENÇA DE TRICOMAS NA FACE ABAXIAL DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	81
FIGURA 22 - ASPECTO DO FRUTO SECO DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	82
FIGURA 23 - ASPECTO DO FRUTO VERDE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	82
FIGURA 24 - CARACTERIZAÇÃO DA EPIDERME DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	88
FIGURA 25 - CARACTERIZAÇÃO DA FOLHA EM RELAÇÃO AOS ESTÔMATOS PRESENTES E CARACTERÍSTICAS DA CUTÍCULA.....	89
FIGURA 26 - CLASSIFICAÇÃO DOS TRICOMAS PRESENTES NA FOLHA DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	90

FIGURA 27 - CARACTERIZAÇÃO DO MESOFILO DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	91
FIGURA 28 - CARACTERIZAÇÃO DA NERVURA CENTRAL DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	92
FIGURA 29 - CARACTERIZAÇÃO DO CAULE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	99
FIGURA 30 - ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DO CAULE DE <i>Liquidambar styraciflua</i> POR MEV.....	100
FIGURA 31 - INFILTRAÇÃO E INCLUSÃO DE CAULE DE <i>Liquidambar styraciflua</i> EM PEG 1500.....	101
FIGURA 32 - TÉCNICA DE MACERAÇÃO APLICADA ÀS FOLHAS E CAULE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	102
FIGURA 33 - MODELO DE APARATO DE CLEVINGER MODIFICADO UTILIZADO PARA A HIDRODESTILAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	105
FIGURA 34 - OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E LEITURA NO TUBO DE GRADUAÇÃO EM APARATO DE CLEVINGER MODIFICADO.....	106
FIGURA 35 - ASPECTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	110
FIGURA 36 - CALIBRAÇÃO COM AMOSTRA DE ÁGUA PARA A DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i> POR PICNOMETRIA	112
FIGURA 37 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i> POR PICNOMETRIA.....	112
FIGURA 38 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	115
FIGURA 39 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÕES REAGENTES EMPREGADAS NOS TESTES HISTOQUÍMICOS	55
TABELA 2 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	65
TABELA 3 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	66
TABELA 4 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	67
TABELA 5 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	68
TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CAULE.	73
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FOLHAS E CAULE.....	73
TABELA 8 - TEOR DE SÓLIDOS DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FOLHAS E CAULE.....	74
TABELA 9 - RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	107
TABELA 10 - SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL	111
TABELA 11 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	112
TABELA 12 - DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	113
TABELA 13 - COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i> DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Percentual
$20d^{20}$	Razão entre a densidade do óleo a 20 °C e da água purificada a 20 °C
$20n_d$	Índice de Refração a 20 °C
a_d^{20}	Poder Rotatório a 20 °C
µg	Micrograma
µl	Microlitro
Mm	Micrômetro
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Gás Carbônico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAA	Fixador de tecidos vegetais constituído de formol, ácido acético e álcool etílico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
G	Grama
HCL	Ácido Clorídrico
IK	Índice de Kovats
LAPG	The Linear Angiosperm Phylogeny Group
m/m	Relação massa/massa
m	Metro
mg	Miligrama
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milimetro
nm	Nanômetro
N	Norte
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG 1500	Polietilenoglicol 1500
pH	Potencial Hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA)
Rf	Fator de Retenção
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UNIDO	United Nations Industrial Development Organization
v/v	Relação volume/volume
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 O CONTEXTO DO USO DE PLANTAS E A FITOTERAPIA	18
3.2 FAMÍLIA ALTINGIACEAE	26
3.3 GÊNERO <i>Liquidambar</i>	28
3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	35
3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	41
3.5.1 Métodos de Extração de Óleos Essenciais	45
3.5.2 Enfloração	46
3.5.3 Prensagem	47
3.5.4 Extração com Solvente Orgânico	47
3.5.5 Extração por Fluido Supercrítico	48
3.5.6 Hidrodestilação e Arraste por Vapor d'água	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DO MATERIAL.....	50
4.2 ANÁLISES MORFOANATÔMICAS	51
4.2.1 Preparo das Lâminas Permanentes e Semi-permanentes	52
4.2.2 Técnica de maceração	54
4.2.3 Testes Histoquímicos	55
4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	55
4.3 ANÁLISES FITOQUÍMICAS	57
4.3.1 Análise Fitoquímica Preliminar	57
4.3.2 Determinação do teor de umidade de folhas de <i>Liquidambar styraciflua</i>	60
4.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	60
4.4.1 Análise de dados	61
4.4.2 Análises físico-químicas do óleo essencial	61
4.4.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/EM)	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	64
5.1.1 Ensaio fitoquímico preliminares	64
5.1.2 Características Organolépticas e Teor de Sólidos (Resíduo Seco).....	72
5.1.3 Determinação do Teor de Umidade das folhas	75
5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	76
5.2.1 Descrição morfológica de <i>Liquidambar styraciflua</i> , L., Altingiaceae	76
5.2.2 Descrição anatômica das folhas de <i>Liquidambar styraciflua</i>	83
5.2.3 Descrição anatômica do caule de <i>Liquidambar styraciflua</i>	93
5.2.4 Técnicas complementares para descrição anatômica das partes aéreas de <i>Liquidambar styraciflua</i>	95
5.3 AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Liquidambar styraciflua</i>	103
5.3.1 Rendimento das extrações do óleo essencial	104

5.3.2 Determinações físico-químicas do óleo essencial.....	109
5.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	114
6 CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas envolvendo produtos naturais são extensamente realizadas no mundo todo, tendo em vista a importância das plantas em fornecerem muitos compostos com aplicações medicinais e a vários setores industriais, bem como devido a necessidade de comprovação de atividades biológicas e ausência de toxicidade de espécies popularmente utilizadas na cura de doenças.

As pesquisas com plantas medicinais possuem caráter multidisciplinar e os esforços estão centrados no desenvolvimento de novos medicamentos, os chamados fitoterápicos. É necessário que os estudos estejam bem integrados e padronizados na execução das pesquisas, de modo a conferir um resultado promissor e eficaz, com a obtenção de compostos com a composição química e atividade farmacológica determinada (DI STASI, 1996).

Os produtos naturais de origem vegetal são uma alternativa para a renovação farmacêutica, visando sua aplicação como fármaco e como protótipos moleculares para o desenvolvimento de novos medicamentos. Embora já sejam conhecidos um grande número de compostos vegetais, a possibilidade de se identificar e obter novos metabólitos bioativos a partir de material vegetal é crescente (OLIVEIRA; BRAGA, 2003). Desta forma, a grande diversidade dos metabólitos secundários vegetais tem despertado o interesse de vários pesquisadores, que os vêem como uma fonte promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SANTOS, 2010).

Dentre os possíveis compostos vegetais a serem isolados visando aplicação econômica, destacam-se os óleos essenciais, que podem ser extraídos por diferentes técnicas, estando presentes nas chamadas plantas aromáticas, caracterizando as essências ou odores destas plantas. Podem ser utilizados como agentes flavorizantes na perfumaria e cosmética, na indústria de medicamentos, principalmente como antimicrobianos, na indústria de alimentos como aromatizantes e conservantes, utilizados em produtos de higiene e limpeza e também na agricultura, para o controle biológico de doenças e pragas (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; BIASI; DESCHAMPS, 2009).

No Brasil, por exemplo, a produção de óleos essenciais é importante economicamente e é bastante favorável devido à sua grande diversidade em plantas aromáticas. No cenário mundial, apresenta-se principalmente como exportador de óleos essenciais de cítricos, como da laranja (*Citrus* sp), limão (*Citrus limon* L.) e lima (*Citrus* sp), mas também produz e exporta outros óleos como o de pau-rosa (*Aniba roseodora*), menta (*Mentha* sp), eucalipto (*Eucalyptus* sp), capim-limão (*Cymbopogon* sp), dentre outros. O Brasil está entre os principais fornecedores de óleos essenciais, assim como China, Índia e Indonésia (BIZZO *et al.*, 2009). Além das espécies aromáticas nativas, muitas espécies exóticas apresentam grande potencialidade para o cultivo, devido a elevada demanda mundial pelos seus óleos essenciais, o que é favorecido pelos diversos microclimas presentes em nosso território, como é o caso do Estado do Paraná, que possui condições para o cultivo de espécies de clima quente nas regiões norte, noroeste e litoral, até espécies de clima frio, nas regiões sul e sudeste (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Com este trabalho, objetivou-se investigar as características fitoquímicas preliminares das partes aéreas de *Liquidambar styraciflua* e obter informações quanto aos aspectos anatômicos da espécie vegetal em estudo, de forma a contribuir com sua identificação farmacognóstica e com dados relativos à família Altingiaceae, a que pertence. Além disto, serão realizados estudos com o óleo essencial quanto ao seu rendimento, composição química e aspectos físico-químicos. Diante ao exposto, será possível verificar características que possam agregar valor comercial a esta espécie, viabilizando a sua utilização para fins industriais diversos, com o possível emprego de seus constituintes, bem como estabelecer os parâmetros que permitam a sua identificação.

A relevância deste trabalho, portanto, se deve à obtenção de parâmetros que possam ser utilizados como ferramentas para reconhecimento da espécie, visando um possível emprego farmacêutico. Importante consideração, neste sentido, pode ser verificada no Decreto nº. 5.813 de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, ao dispor que,

[...] para o eixo agro/fito/industrial, as regulamentações devem assegurar a qualidade, eficácia e segurança do produto final através do cultivo, manejo, sistemas e técnicas de produção, considerando os aspectos botânicos, químicos e farmacológicos, visando à obtenção de princípios ativos quantificáveis e marcadores padronizados segundo as particularidades da agroindústria e indústria farmacêutica. (BRASIL, 2013a)

Portanto, o desenvolvimento deste trabalho, fundamentalmente, estará centrado em um enfoque dos aspectos fitoquímicos, preliminares, de *Liquidambar styraciflua*, além do estudo de aspectos botânicos do vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo a descrição morfoanatômica, análise fitoquímica preliminar de partes aéreas e avaliação do óleo essencial de folhas de *Liquidambar styraciflua* L., Altingiaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar botanicamente o material de estudo *Liquidambar styraciflua*;
- Realizar o estudo morfoanatômico de folhas, caule e cascas do caule;
- Realizar a caracterização fitoquímica de metabólitos bioativos nos extratos hidroalcoólico e suas frações, e no extrato aquoso de folhas e cascas do caule;
- Determinar os rendimentos das extrações, bem como as características organolépticas dos extratos;
- Extrair o óleo essencial a partir de folhas frescas e secas e determinar os respectivos rendimentos, bem como determinar o teor de umidade das folhas;
- Determinar as características físico-químicas do óleo essencial das folhas;
- Identificar os constituintes do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O CONTEXTO DO USO DE PLANTAS E A FITOTERAPIA

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a própria civilização. Relatos do seu uso são encontrados em documentos da população chinesa e indiana. Para a maioria da população mundial o uso de plantas medicinais é quase que a única fonte de fármacos e cura. Mais de 80% da população mundial utiliza as plantas no tratamento de doenças, sendo que, em muitos países, a medicina tradicional possui reconhecimento (CORDELL, 1995; YAMADA, 1998; PROENÇA DA CUNHA *et al.*, 2003; CARVALHO, 2004; 2005).

O potencial do uso das plantas como fonte de medicamentos, no geral, ainda é pouco explorado. Estima-se que haja cerca de 250.000 a 500.000 plantas no mundo, sendo o estudo fitoquímico realizado em uma parcela muito pequena (HAMBURGER, 1991). De aproximadamente 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas na medicina popular em todo o mundo, apenas o correspondente a cerca de 1% possuem seu valor terapêutico comprovado por estudos científicos quando administradas em seres humanos (PRIMACK, 1993).

Estima-se que aproximadamente um quarto de todos os fármacos aplicados na terapêutica atual foi obtido direta ou indiretamente da natureza, principalmente de vegetais superiores, fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamentos (DI STASI, 1996; YUNES; CALIXTO, 2001). Neste sentido, Di Stasi (1996), destaca que as plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima para a descoberta de novas substâncias, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz.

Embora seja importante o papel dos produtos sintéticos na terapêutica moderna, em função do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, existem substâncias medicamentosas naturais, usadas diariamente no tratamento de enfermidades, cuja síntese ainda não

foi alcançada ou é dificultada, como a obtenção de moléculas com a mesma estereoquímica, aliados ao alto custo sintético, em certos casos, justificando a importância da obtenção destas substâncias advindas dos vegetais (OLIVEIRA; AKISUE, 2000; SCHENKEL *et al*, 2010).

A trajetória de utilização de plantas medicinais é marcada por grandes e profundas mudanças, colocando os fitoterápicos ou fitomedicamentos como recursos disponíveis cada vez mais seguros e eficazes visando atender às demandas de saúde das populações e às legislações cada vez mais rigorosas. Com isso, os esforços estão cada vez mais centrados, por meio de estudos, em caráter multidisciplinar, que forneçam as evidências necessárias de ação terapêutica, efetividade, qualidade e segurança das espécies em estudo (CARVALHO, 2004; 2005).

O termo Fitoterapia, deriva das palavras gregas *phyton* (planta) e *therapeia* (tratamento), fazendo alusão a tratamento por intermédio das plantas (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

De acordo com Carvalho (2005), a fitoterapia é a ciência que estuda a utilização dos produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, quer seja para prevenir, atenuar ou curar um estado patológico. Como prática, é o método de tratamento de enfermidades que emprega vegetais frescos ou drogas vegetais ou, ainda, extratos vegetais obtidas destas matérias-primas. Os fitoterápicos, ferramentas desta prática, que têm como base o vegetal, são medicamentos obtidos e elaborados empregando-se exclusivamente matérias vegetais ativas, com finalidades curativas ou profiláticas.

A utilização de fitoterápicos é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com a finalidade de reduzir os custos para os programas de saúde pública e facilitar o acesso a medicamentos a populações pouco favorecidas, tanto de países em desenvolvimento como em subdesenvolvidos (SILVA, 2002).

A OMS define fitoterápicos ou fitomedicamentos como “produtos com fins medicinais que contém derivado ativo obtido das partes aéreas ou subterrâneas de vegetais ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em forma de derivados vegetais”. Como material vegetal entende-se sucos, resinas,

óleos voláteis e qualquer outro material de natureza semelhante (CARVALHO, 2005).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápicos são medicamentos obtidos através de plantas medicinais, utilizando unicamente derivados da droga vegetal como extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, entre outros. Assim como todo medicamento, os fitoterápicos devem ofertar garantia de qualidade, comprovação de seus efeitos terapêuticos, padronização da composição e ser seguro para o consumo da população (ANVISA, 2011). A segurança e eficácia devem ser legitimadas por meio de levantamentos bibliográficos e ensaios práticos que buscam resultados quanto a aspectos etnofarmacológicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacêuticos, além de ensaios biológicos pré-clínicos e clínicos, os quais avaliam a atividade biológica da espécie vegetal (MIGUEL, 1999).

De acordo com Carvalho (2005), os medicamentos fitoterápicos ou fitomedicamentos são obtidos por intermédio de tecnologias modernas de produção industrial, contendo um ou mais extratos ou derivados padronizados de determinadas espécies vegetais, e que constituem os seus componentes biologicamente ativos. Estes podem ser formulados sob várias formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, soluções, emulsões, dentre outras.

Estes medicamentos se caracterizam com uma mistura complexa de substâncias, entre as quais estão presentes as substâncias ativas. Além destas substâncias, os medicamentos fitoterápicos podem conter excipientes, porém é vedada a presença de substâncias ativas isoladas associadas, ainda que de origem vegetal, não sendo considerados fitoterápicos, portanto, os medicamentos que contenham substâncias isoladas (OLIVEIRA; AKISUE, 2000; CARVALHO, 2005).

A distinção de fitoterápicos de planta medicinal é fundamental e deve estar clara. Esta é caracterizada como qualquer planta que quando administrada sob alguma forma e via no organismo animal pode vir a desencadear um efeito biológico. Estas plantas, portanto, contém em um ou vários de seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com finalidades terapêuticas, ou como precursoras para a semi-síntese química. As partes do vegetal utilizadas no preparo dos medicamentos são aquelas em que as substâncias se encontram em maior quantidade (OLIVEIRA; AKISUE, 2000; CARVALHO, 2005). A fitoterapia, em essência, tem seu princípio

baseado na alopatia, distinguindo-se desta por utilizar preparados tradicionais padronizados, eficazes, com inocuidade e qualidade controladas, elaborados de plantas medicinais, não preconizando a utilização de substâncias quimicamente definidas, isoladas, purificadas e de estrutura molecular determinada (DI STASI, 1996).

O termo droga vegetal refere-se à planta ou suas partes, que, após sofrerem processo de coleta, preparo e conservação, incluindo secagem e estabilização, são empregadas no preparo dos medicamentos fitoterápicos e caracteriza-se por conter princípios ativos em sua constituição (OLIVEIRA; AKISUE, 2000; BRASIL, 2013b), ao passo que derivado vegetal refere-se a produto da extração da planta medicinal in natura ou da droga vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudato, entre outros (BRASIL, 2013b).

Os princípios ativos são substâncias quimicamente definidas presentes nas matérias-primas e nos fitoterápicos, responsáveis pela atividade farmacodinâmica, ou seja, pelos efeitos terapêuticos destes materiais. No caso dos fitoterápicos, em que não há a presença de ativos isolados, a atividade farmacodinâmica pode ser decorrente de sinergismos e antagonismos entre os componentes (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

A produção de fitoterápicos requer necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (PETROVICK *et al.*, 1997).

Carvalho (2005) ressalta que a utilização de plantas medicinais em épocas mais remotadas era feita sem qualquer padronização o que é inaceitável em termos atuais, em que órgãos reguladores estão instituídos, regulamentando e fiscalizando seu uso. Desta forma, os extratos devem ser padronizados, desde a coleta até a obtenção do produto final, assegurando a qualidade e segurança do produto, a concentração de princípio ativo e reprodução nos seus efeitos. Quando não se conhece exatamente a natureza dos compostos fitoquímicos responsáveis pela ação, deve-se determinar o grupo de princípios ativos e suas concentrações, que servirão como marcadores da qualidade para a padronização e no preparo dos extratos.

As informações sobre os usos das plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram sendo acumuladas durante séculos, permanecendo os conhecimentos empíricos, frutos de avaliações experimentais, a fim de atestar a veracidade das informações adquiridas e repassadas gerações após gerações (DI STASI, 1996).

A padronização do fitomedicamento se dará pela descrição rigorosa sob um grupo de substâncias de características controláveis, o que poderá constituir uma monografia oficial, proposta para o preparo de um determinado fitoterápico. Uma monografia deve reunir todas as características padrões para a preparação de uma droga ou deve descrever os seus perfis farmacognósticos específicos, de composição fitoquímica, aspectos farmacológicos e farmacêuticos (CARVALHO, 2005).

Neste sentido, os denominados fitofármacos, ou princípios ativos naturais, desempenham este papel na padronização, ao se tratarem de substância isolada de uma parte do vegetal, capaz de produzir uma resposta biológica, atuando como marcador farmacológico. Já quando apenas caracterizam fitoquimicamente a espécie vegetal são denominados marcadores fitoquímicos. Em certos casos, pode-se ter o mesmo marcador farmacológico e fitoquímico (ex: antraquinonas na Cáscara Sagrada) (CARVALHO, 2005).

Oliveira e Akisue (2000) destacam que o controle de qualidade dos fitoterápicos, somada a adequadas normatizações, podem contribuir para que a fitoterapia se firme como uma prática visando à atender às demandas de saúde. Para os autores o maior problema, ainda, refere-se à identificação da planta e da droga vegetal utilizada.

Para a correta utilização de extratos vegetais deve-se atestar a autenticidade da droga empregada, ou seja, verificar sua legitimidade, visando assegurar critérios de qualidade, segurança e eficácia. Desta forma, a identificação de drogas vegetais é fundamental e crucial para garantir que as substâncias presentes, que exercerão uma determinada atividade farmacodinâmica, sejam referentes à uma espécie e não à outra, impedindo equívocos quanto ao que está sendo utilizado e à atividade está sendo apresentada (OLIVEIRA; AKISUE, 2000). Desta forma, os autores ressaltam que antes de utilizar qualquer droga no preparo de medicamentos, a mesma deve

ser submetida à rigorosa análise, já que a identificação e a pureza da droga, assim como a avaliação de seus princípios ativos são indispensáveis visando à obtenção de produtos com qualidade.

A comprovação científica da eficácia e segurança na utilização de plantas medicinais levou a um aumento na prescrição médica destas. No entanto, embora reconhecidos os benefícios associados ao emprego de plantas medicinais no tratamento de doenças, seu uso é realizado, muitas vezes, de forma inadequada, de forma rotineira, negligente e sem as devidas recomendações médicas. Neste sentido, além dos pontos acima destacados, é importante que a utilização médica seja feita corretamente, assegurando-se o seu correto uso, desde a prescrição até a orientação final dada ao paciente, antes de sua administração. Além da importância de todos os atores envolvidos, verifica-se, em especial, na relação com o presente trabalho, a importante participação e atribuição do profissional farmacêutico, no âmbito da fitoterapia, como pesquisador, disseminador e orientador de conhecimentos adquiridos e dos já fundamentados, a favor de benefícios à população (PINTO, 2002; SOUZA, 2003; CARVALHO, 2005).

Os órgãos governamentais recomendam o estabelecimento da fitoterapia como um recurso terapêutico para atender as necessidades básicas dos serviços de saúde, desde que os parâmetros de eficácia e segurança sejam atendidos conforme preconiza a lei do país. Dessa forma, são necessários estudos científicos que analisem e assegurem a qualidade dos extratos, a segurança e eficácia, por meio de experimentos que comprovem sua ação farmacológica e toxicológica em animais, além da sua eficácia e segurança quando administrados em humanos (MELLO, 2000; SOUZA, 2003).

O emprego de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças encontra-se bem difundido em alguns países. Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que na China cerca de 30 a 50% de todos os medicamentos utilizados são obtidos a partir de drogas de origem vegetal, sendo que na Alemanha esse índice chega aos 90%. Cerca de 50% da população europeia e norte-americana já fizeram uso de medicamentos fitoterápicos (WHO, 2011).

O interesse pelos medicamentos fitoterápicos é crescente nas economias mundiais, movimentando cerca de 22 bilhões de dólares por ano nesse segmento.

Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos Estados Unidos, US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha o maior mercado mundial de produtos fitoterápicos. No Brasil, as pesquisas estão voltadas a investigação de novos princípios ativos derivados de produtos naturais, fator bastante importante em termos de exportação de produtos naturais de origem brasileira (PINTO, 2002).

São várias as exigências a serem cumpridas para que um derivado vegetal possa ser classificado como um medicamento fitoterápico. Neste sentido, Carvalho (2005) destaca os seguintes pontos a serem verificados:

- Autenticação botânica da espécie empregada: através da classificação da planta, em gênero e espécie, realizada por profissional especialista em botânica;
- Partes das plantas utilizadas: pela definição do órgão vegetal a ser utilizado (cascas do caule, raiz, folha ou flor), já que podem diferir em composição fitoquímica e conseqüentemente, farmacológica;
- Fatores ambientais: determinantes a qualidade do material coletado, em função de diversos variantes, como clima, altitude, fertilidade do solo, entre outros.
- Condição da colheita: pelo estabelecimento da época ideal de coleta, relacionados à composição fitoquímica da espécie vegetal. As condições de armazenamento e preparo adequados do extrato também devem ser observadas e atendidas.
- Contaminação por outros materiais: pela garantia de matéria-prima livre de contaminantes (insetos, micro-organismos, metais pesados, pesticidas, entre outros), atestando a qualidade da mesma na preparação do fitoterápico.
- Boas práticas de fabricação: visando a qualidade do produto final, por meio de procedimentos que assegurem sua estabilidade, composição e demais aspectos relacionados à sua especificação.

Lapa e colaboradores (2010) indicam a etapa botânica, relacionada à identificação do material de estudo, como a primeira das etapas sequenciais necessárias à obtenção de um novo medicamento fitoterápico, seguindo com a etapa farmacêutica, relacionada ao preparo da forma farmacêutica para administração, com a garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como com sua estabilidade durante os testes pré-clínicos e clínicos, seguida, finalmente

da etapa de ensaios biológicos pré-clínicos relacionada aos ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 48 de 2004 estabelece as exigências de controle de qualidade tanto para os precursores do fitoterápico quanto para os produtos acabados (BRASIL, 2013c)

De acordo com Farias (2010) entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. A autora destaca que os parâmetros de qualidade da matéria-prima vegetal devem ser precisamente pré-definidos e os procedimentos de preparação dos extratos devem ser padronizados. Os ensaios de qualidade têm por objetivo a verificação da identidade botânica do material, a pureza do material e a caracterização dos constituintes químicos da espécie, especialmente daqueles envolvidos na atividade terapêutica, bem como seus doseamentos.

A RDC 14 de 2010, por sua vez, trata da situação atual do registro de medicamentos fitoterápicos, estabelecendo os requisitos mínimos necessários e dispondo que estes medicamentos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância da sua qualidade. Devem ser realizados testes de autenticidade, de caracterização organoléptica e identificação macroscópica e microscópica da droga vegetal utilizada. Para o derivado vegetal deve-se proceder indicando os solventes, excipientes e/ou veículos utilizados na extração, relação aproximada droga vegetal:derivado vegetal, caracterização físico-química, organoléptica, resíduo seco, pH, teor alcoólico e densidade (para extratos líquidos), densidade, índice de refração, rotação óptica (para óleos essenciais). Ainda, para ambos, droga vegetal e derivado vegetal, devem ser realizados testes de pureza e integridade, método de estabilização, local de coleta, perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica e análise quantitativa dos marcadores ou controle biológico, dentre outros. Já para o produto acabado o laudo de análise deve conter os ensaios de perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica, análise quantitativa dos marcadores específicos de cada espécie, resultados de controle de qualidade de lote de medicamentos, entre outros (BRASIL, 2013b).

3.2 FAMÍLIA ALTINGIACEAE

A família Altingiaceae Horan. é constituída por cerca de quinze espécies, distribuídas em três gêneros: *Liquidambar* L., com quatro a cinco espécies, *Altingia* Noronha, com seis a oito espécies, e *Semiliquidambar* H-T. Chang, com aproximadamente três espécies. Esta família apresenta uma clássica disjunção biogeográfica intercontinental entre Ásia e América do Norte. As espécies dos gêneros *Altingia* e *Semiliquidambar* são encontradas na Ásia tropical e subtropical, enquanto as espécies do gênero *Liquidambar* apresentam uma disjunção em sua distribuição, estando presentes três espécies na Ásia, duas ao leste e uma ao oeste, e uma espécie na América do Norte e Central, conforme evidencia a Figura 1 (SHI *et al.*, 2001; ICKERT-BOND; WEN, 2006).

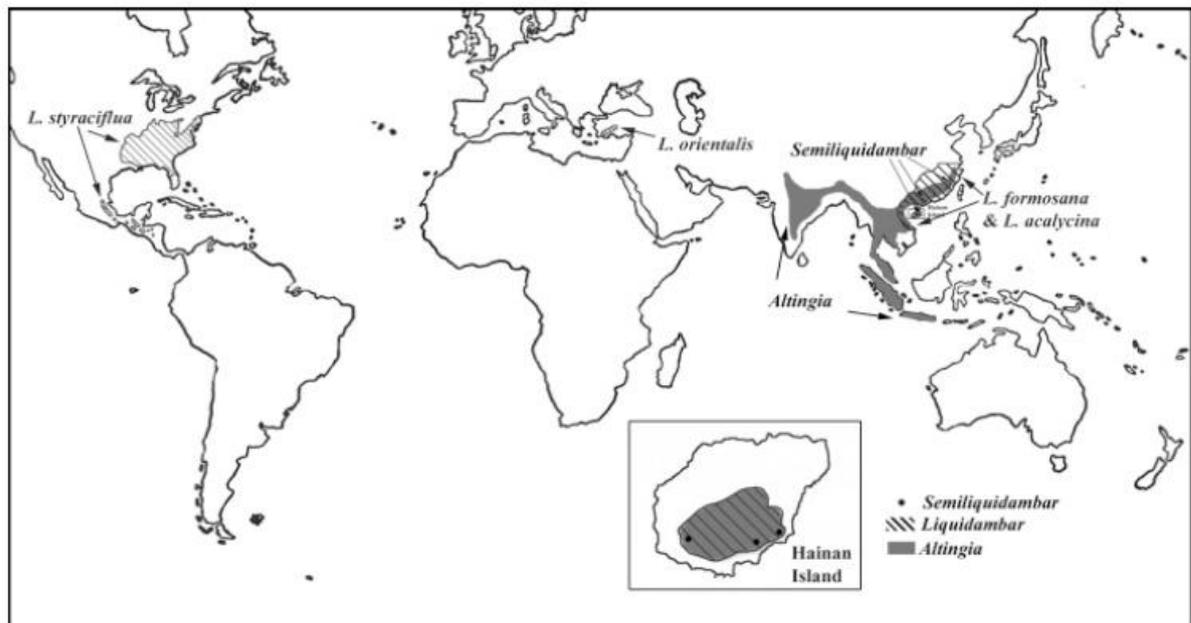


FIGURA 1 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS GÊNEROS SEMILIQUIDAMBAR, LIQUIDAMBAR E ALTINGIA

FONTE: Ickert-Bond, Pigg e Wen (2005)

Tradicionalmente, *Liquidambar*, *Altingia* e *Semiliquidambar* eram reconhecidos como subfamílias de Hamamelidaceae, tratadas como Altingioideae (WILLIAMS, 1855; REINSCH, 1890; CHANG, 1979; CRONQUIST, 1981; ENDRESS, 1989a; QUI *et al.*, 1998; LI; DONOGHUE, 1999), e, incorretamente, como Liquidambaroideae (HARMS, 1930; BOGLE, 1986; FERGUSON, 1989).

Entretando, estudos filogenéticos mais recentes propuseram uma mudança na classificação, com base em novas evidências a níveis moleculares. Em 2003, com publicação da Angiosperm Phylogeny Group (APG), foi reconhecido Altingiaceae e Hamamelidaceae como famílias distintas, ambas pertencentes a classe Saxifragales dentro da Super Ordem Rosídeo Maior (APG II, 2003, APG III, 2009).

Os três gêneros da família Altingiaceae apresentam importantes similaridades na morfologia de seus frutos, sementes, grãos de pólen, inflorescências, estípulas, e flores (BOGLE, 1986), mas diferem principalmente na morfologia das folhas. As espécies de *Liquidambar* são decíduas e as folhas apresentam de 3 a 5 ou 7 lobos, enquanto as espécies de *Altingia* possuem folhas persistentes em todas as estações e não apresentam lobos e, as espécies de *Semiliquidambar*, por sua vez, são decíduas ou persistentes com folhas trilobadas, lobadas em uma margem ou não apresentam lobos (WU *et al*, 2010).

As espécies desta família são plantas arborescentes e, em sua maioria, apresentam inflorescências unissexuais esféricas ou em forma de concha, cápsulas biloculares, muitas sementes por fruto, em que várias são abortivas, sementes maduras com um anel ou círculo de distância, e as inflorescências se transformam em infrutescências lenhosas (BOGLE, 1986; FERGUSON, 1989; ENDRESS e ITERSHEIM, 1999).

O gênero *Altingia* é composto por aproximadamente seis espécies morfologicamente diferentes, todas classificadas em duas seções: *Altingia* Noronha, que inclui as espécies *A. chinensis* Oliver ex Hance, *A. obovata* Merrill et Chun, *A. yunnanensis*, *A. poilanei* e *A. excelsa* Hemsley, espécies que possuem numerosos frutos, e a outra seção, nomeada Oligocarpa H.-T. Chang, é formada pelas espécies *A. gracilipes* Hemsley e *A. siamensis*, que possuem no máximo nove frutos por infrutescência, sendo que estes frutos são menores e hemiesferoidais (CHANG, 1979; FERGUSON, 1989). As folhas das espécies de *Altingia* estão sempre presentes sazonalmente (“evergreen”) e são não lobuladas (SHI *et al.*, 2001).

O gênero *Semiliquidambar* possui aproximadamente três espécies, localizadas no sul e leste da China, *S. cathayensis* H.-T. Chang, *S. caudata* H.-T. Chang e *S. chingii* (Metcalfe) H.-T. Chang (ICKERT-BOND; WEN, 2006). De acordo

com hipótese de Wu e colaboradores (2010), *Semiliquidambar* seria um híbrido de *Altingia* e *Liquidambar*, baseada em análises filogenéticas por sequenciamento genético de cloroplastos envolvendo as espécies *Semiliquidambar cathayensis*, *Liquidambar formosana*, *Liquidambar acalycina*, *Altingia obovata* e *Altingia chinensis*.

O gênero *Liquidambar*, por sua vez, contempla cerca de cinco espécies, sendo elas *L. acalycina* H.-T. Chang, *L. formosa* Hance, *L. orientalis* Mill., *L. styraciflua* L. , e uma espécie que é reconhecida como *L. styraciflua* var. *mexicana* Oerst. e *L. macrophylla* Oerst. (PIGG *et al.*, 2004). As folhas destas espécies são decíduas, possuindo cerca de três a cinco lóbulos, podendo ser encontradas folhas com até sete lóbulos (SHI *et al.*, 2001).

Trabalho de Ickert-Bond e Wen (2006) a respeito de investigação na filogenia e biogeografia da família Altingiaceae, pela análise de cinco regiões não codificadas do cloroplasto, indicou que Altingiaceae deveria ser constituída de somente um gênero, *Liquidambar*, que é parafilético e que tem uma prioridade sobre os outros dois gêneros, assim como estudos de Shi e colaboradores (2001), que já indicavam a classificação de todas as espécies da família em um único gênero, *Liquidambar*.

3.3 GÊNERO *Liquidambar*

O gênero *Liquidambar* é o mais conhecido da família Altingiaceae, sendo constituído por quatro espécies intercontinentais na zona temperada do Hemisfério Norte. Duas espécies são encontradas na Ásia oriental (*L. formosana* e *L. acalycina*), uma na Ásia ocidental (*L. orientalis*) e a outra é encontrada entre a América do Norte oriental e central (*L. styraciflua*) (ICKERT-BOND, PIGG; WEN, 2005).

Alguns autores classificam mais uma espécie como parte deste gênero por apresentar variantes morfológicas similares à *L. styraciflua*, sendo encontrada do México até Honduras, e, por isto, nomeada *L. styraciflua* var. *mexicana* Oerst. e *L.*

macrophylla Oerst, (ERNST, 1963; FERGUSON, 1989; ZHANG *et al.*, 2003). Morfologicamente, *L. macrophylla* possui folhas e frutos um pouco maiores que as demais espécies deste gênero, e ocorrem em florestas fechadas localizadas a altas altitudes (1000-2300m) no México, Belize, El Salvador, Honduras, Guatemala e Nicarágua, enquanto que outras espécies, como *L. styraciflua* do leste da América do Norte, estão localizadas no nível do mar até 300m de altitude (ICKERT-BOND; WEN, 2006).

Este gênero é formado por espécies arbustivas, com inflorescências esféricas que se transformam em infrutescências unissexuais e globulosas. Estas são constituídas por 25-50 cápsulas biloculares arranjadas helicoidalmente, que vão fornecer várias sementes por fruto, sendo estas viáveis ou abortivas. Uma característica deste gênero é a presença de estames, que vão produzir o pólen maduro, agrupados em inflorescências separadas, mas também podem ser encontrados vários estames separados com o pólen maduro junto de uma inflorescência pistilada (ICKERT-BOND, PIGG; WEN, 2005).

As principais características usadas para diferenciar as quatro espécies deste gênero são: o número de lóbulos e pubescência de suas folhas. As folhas de *L. formosana* e *L. acalycina* possuem usualmente três lóbulos, enquanto que as folhas de *L. styraciflua* possuem de cinco a sete e a espécie *L. orientalis* apresenta também cinco a sete lóbulos, mas com o número de lóbulos integrados (BOGLE, 1986).

Duas seções foram reconhecidas para o gênero: Seção *Euliquidambar* e Seção *Cathayambar* Harms (HARMS, 1930), sendo esta última formada por uma única espécie, *L. formosana* que apresenta como característica diferenciadora das demais espécies a presença de estruturas alongadas denominadas “borsten ou setae” nas suas inflorescências e infrutescências. As demais espécies, *L. orientalis*, *L. styraciflua* e *L. acalycina*, foram classificadas na seção *Euliquidambar*, por não apresentarem estas estruturas (ICKERT-BOND; WEN, 2006).

A espécie *L. acalycina*, diferentemente das demais, possui muitas características que são encontradas no gênero *Altingia*, principalmente a presença de um disco circular em volta da semente, enquanto que as demais espécies de

Liquidambar apresentam um anel distal entre suas sementes (PIGG *et al.*, 2004; ICKERT-BOND *et al.*, 2005).

A importância comercial destas espécies está relacionada com a indústria do papel, além de possuírem um elevado potencial como plantas ornamentais. A popularidade das espécies deste gênero deve-se, principalmente, à forma atraente das árvores, à coloração outonal, folhagem no verão, aspecto dos frutos, assim como a habilidade em fornecer sombra (DURKOVIC e LUX, 2010).

A espécie *Liquidambar styraciflua*, dicotiledônea, foi descrita por Carl Von Linnaeus, como pertencente à família Hamamelidaceae (SPECIES PLANTARUM, 1753). A classificação atual de *Liquidambar styraciflua* é como pertencente à classe Equisetopsida C. Agardh, subclasse Magnoliidae Novák ex Takht, superordem Myrothamnanae Takht, ordem Saxifragales Bercht. & J. Presl, família Altingiaceae Horan, gênero *Liquidambar* L (TROPICOS, 2013c).

Sua área de distribuição natural é ampla, estendendo-se desde o estado de Connecticut, nos Estados Unidos, latitude de aproximadamente 41° N, até a Flórida e mais ao sul, incluindo México, Guatemala, Belize, El Salvador, Honduras e Nicarágua (KORMANIK, 1990). A figura 2 demonstra as regiões de ocorrência naturais de espécies de *L. styraciflua*, na América do Norte e América Central.

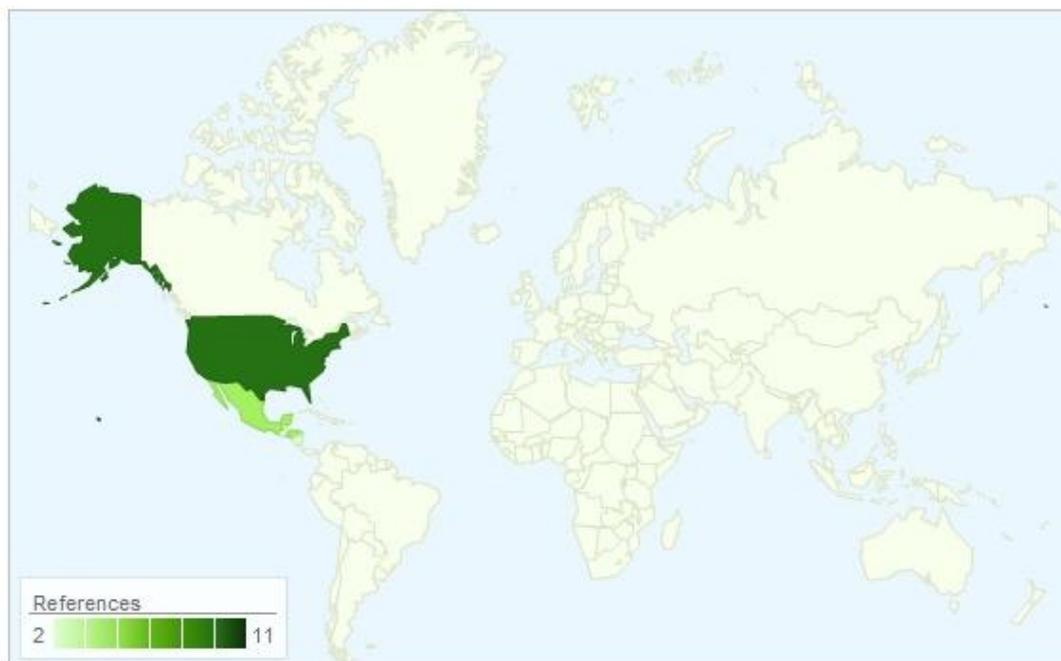


FIGURA 2 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Liquidambar styraciflua*
 FONTE: Trópicos, Missouri Botanical Garden (2013b).

No Brasil, *L. styraciflua* foi introduzida e aclimatizada para cultivo tratando-se, neste sentido, de uma espécie exótica. De acordo com Lorenzi (2003), “árvores exóticas são aquelas oriundas de outros países ou continentes que não pertencem à flora do País, não sendo, portanto, nativas ou indígenas”. As árvores exóticas no Brasil podem ser cultivadas para vários fins, como ornamental, sombreamento, quebravento, produtos extrativos, como obtenção de frutos, sementes oleaginosas ou comestíveis, madeira, resina e princípios medicinais, sendo que muitas espécies podem desempenhar mais de um tipo de uso. Devem ser advindas de regiões de climas tropicais, subtropicais e tropicais para que melhor possam se desenvolver no país. No caso de espécies de *Liquidambar* seus atributos referem-se às cores outonais ou ao colorido de suas folhas caducifólias (LORENZI, 2003). Esta espécie é reconhecidamente aromática, produzindo óleo essencial, além de uma resina balsâmica que é bastante utilizada (TATTJE *et al.*, 1980; GUENTHER, 1989; SHIMIZU, 2005, YANG *et al.*, 2011).

Os principais estudos realizados com a espécie *L. styraciflua* estão relacionados ao âmbito agrônomo, visando o beneficiamento da espécie para a obtenção de sua madeira de alta qualidade, assim como estudos morfológicos, principalmente em relação à morfologia dos frutos, inflorescências e folhas visando obter parâmetros para fins comparativos em relação à outras espécies dos gêneros relacionados, e, estudos mais recentes, relacionados à critérios de classificação filogenéticos, também vêm sendo realizados, culminando, inclusive, com a nova classificação da espécie.

Neste sentido, as recentes análises filogenômicas, por meio de dados de sequenciamento genômico de plastídeos, auxiliaram e culminaram com as classificações atuais de filogenia de angiospermas. A LAPG III, The Linear Angiosperm Phylogeny Group, (2011) classifica *Liquidambar* como gênero pertencente à Família Altingiaceae, conforme indica a Figura 3, sendo realocado da família Hamamelidaceae, a qual pertencia.

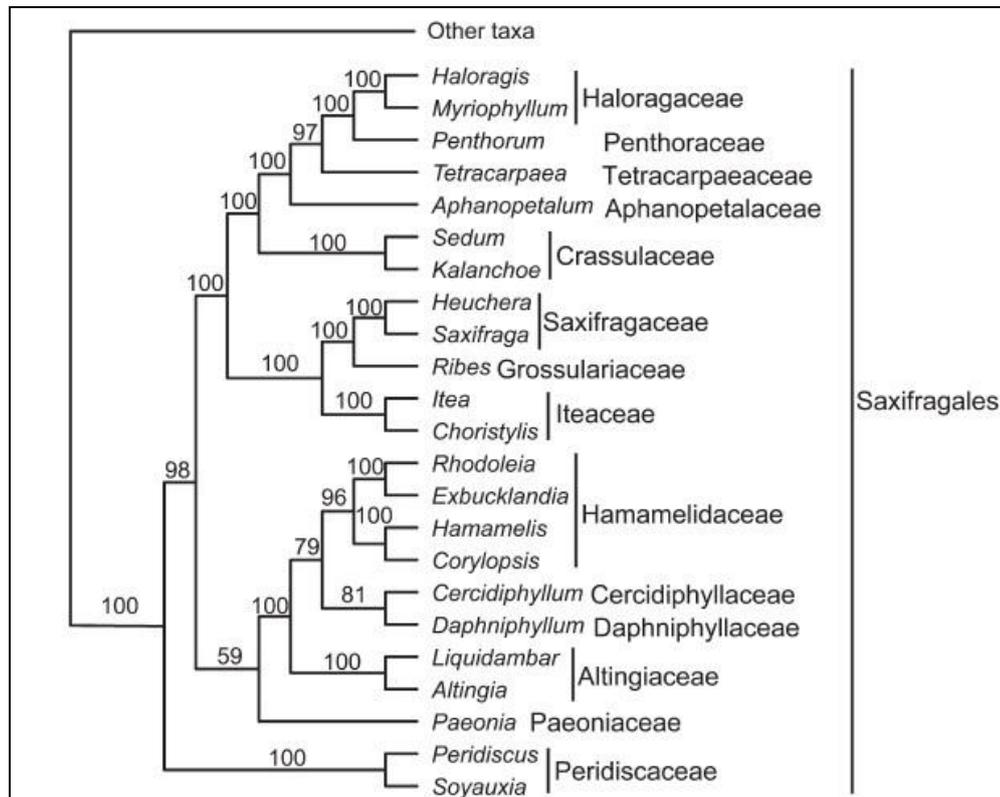


FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO *Liquidambar*
 FONTE: LAPG III (2011)

No Brasil, estudos combinados de diferentes procedências e progênies de liquidambar (*Liquidambar styraciflua*), oriundas da Guatemala, Nicarágua, México e Honduras, foram realizados em Quedas do Iguaçu, no sudoeste do Paraná, para verificar a produtividade de madeira na região, em função das suas condições climáticas e do solo, assim como a variabilidade genética dentro e entre de procedências, verificando oportunidades de melhoramento genético (SHIMIZU; SPIR, 2004). Dada a sua adaptabilidade aos diferentes tipos de solo, a espécie é indicada para produção de madeira de alta qualidade, nas regiões Sul e Sudeste, em pequenas propriedades rurais, aproveitando-se solos que sejam marginais para outras culturas (SHIMIZU; SPIR, 2004, SHIMIZU, 2005).

De acordo com Carpenter e Hopkins (1966), a madeira de liquidambar apresenta textura uniforme, dureza e densidade médias e facilidade de ser polida, sendo considerada de alta qualidade para uso em construções, marcenaria e industrialização. Não apresenta grande oscilação de peso específico, mesmo variando a posição no tronco. Esses atributos conferem à espécie uma posição relevante como alternativa para compor sistemas agroflorestais em pequenas e

médias propriedades rurais ou em reflorestamentos intensivos, para produção de madeira para fins industriais (GURGEL GARRIDO *et al.*, 1997; SHIMIZU; SPIR, 1999; SHIMIZU, 2005).

Segundo Metcalfe e Chalk (1950), a madeira de *L. styraciflua* é amplamente utilizada para diversos fins, mas, particularmente, em móveis e acabamentos de interiores.

Nos Estados Unidos, *L. styraciflua* é considerado de rápido crescimento e produtora de madeira de alto valor econômico, com múltiplos usos como matéria-prima para celulose, dormentes, madeira serrada para embalagens, estrados, móveis e até como lenha. A produção de lâminas para chapas compensadas, no entanto, é uma das atividades referentes à utilização, de maior valor comercial (SHIMIZU, 2005).

Lorenzi (2003) também destaca *L. styraciflua* como árvore adequada ao reflorestamento, devido a madeira retilínea, de boa qualidade e de cor marrom-avermelhada que produz. Além disso, a espécie possui grande efeito ornamental pelas cores outonais que as folhas adquirem, amarelas e vermelhas, antes de caírem (Figura 4). Segundo o autor, este efeito é mais pronunciado nas regiões de altitude do sul e sudeste do Brasil, onde é mais cultivada. O tronco da árvore exsuda uma goma de cor de âmbar que possui aplicações industriais, como a utilização no preparo de confeitos (LORENZI, 2003). Este bálsamo, conhecido como *American styrax* ou *sweet gum* (TATTJE *et al.*, 1980) é originado naturalmente como um produto patológico em reservatórios de secreção sob a casca de árvores mais antigas, sendo raramente encontrados nas árvores jovens, com menos de 10 anos (GUENTHER, 1989) e obtido após incisões cuidadosas realizadas na árvore (TATTJE *et al.*, 1980).

Devido à sua importância comercial, como na produção de papel e celulose (DURKOVIC; LUX, 2010) e também na produção de energia, como matéria-prima em biorefinarias (MARTIN *et al.*, 2010) foram realizados estudos de micropropagação com *L. styraciflua*, avaliando a influência de reguladores de crescimento na multiplicação de brotos, e *in vitro*, no enraizamento adventício (DURKOVIC; LUX, 2010). A propagação vegetativa pode ser altamente desejável a fim de clonar

genótipos, o que poderia ser realizado pela utilização de células e cultura de tecidos para multiplicar clones de membros de famílias superiores (KIM *et al*, 1997).



FIGURA 4 - ASPECTO DAS FOLHAS OUTONAIAS DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Trópicos, Missouri Botanical Garden (2013a)

Estudos alelopáticos com *L. styraciflua*, no sentido de verificar competitividade em relação a outras árvores semelhantemente importantes em relação à madeira, como *Pinus*, também foram realizados (BALANDIER *et al*, 2006).

Estudos ambientais também são descritos na literatura. Foi relatado que esta espécie emite tanto isopreno, quanto monoterpenos (RASMUSSEN, 1972; EVANS *et al*. 1982), dois hidrocarbonetos que influenciam a capacidade oxidativa e química da troposfera continental. Nas zonas rurais e áreas de floresta nativa, o isopreno contribui para a formação de névoa azul (WENT, 1960) e deposição ácida (JACOB; WOFYSY, 1988). Em áreas urbanas, a oxidação do isopreno, na presença de NOx pode levar à formação de ozônio troposférico, um poluente tóxico e gás de efeito estufa (CHAMEIDES *et al*. 1988).

Os principais estudos botânicos verificados com a presente espécie referem-se principalmente à morfologia das inflorescências, infrutescências e sementes, a fim de estabelecer critérios de aproximação e divergência em relação às demais

espécies do gênero *Liquidambar* e da família Altingiaceae (ICKERT-BOND, PIGG; WEN, 2005, 2007) e estudos de morfologia do pólen (CHANG, 1958, 1959, 1964; ZAVADA; DILCHER, 1986) da flor (WISNIEWSKI; BOGLE, 1982; BOGLE, 1986), anatomia da madeira (REINSCH, 1890; GREGUSS, 1959; METCALFE; CHALK, 1950; MOLL; JANSSONIUS, 1914; RAO; PURKAYASTHA, 1972; TANG, 1943; TIPPO, 1938; HUANG, 1986) e relações entre Hamamelidaceae (ENDRESS, 1989 a,b,c, 1993; ENDRESS; STUMPF, 1990; ENDRESS; IGERSEIM, 1999).

Neste sentido, é relevante verificar outras possibilidades de uso para esta espécie que se encontra amplamente difundida, como uma possível utilização para fins medicinais, na terapêutica, por meio do reconhecimento prévio de seus constituintes químicos, aliados ao importante conhecimento botânico, e posterior identificação de suas atividades biológicas, tendo em vista que estudos neste âmbito foram verificados como extremamente escassos. Além disto, pela elucidação de sua composição química, será possível verificar outras características que agreguem valor comercial à esta espécie.

Pode-se considerar, portanto, inéditos os estudos que vêm sendo realizados por Franco (2013) visando a determinação de atividades biológicas a partir de partes aéreas e óleo essencial das folhas de *Liquidambar styraciflua*, tendo sido obtidos resultados preliminares significativos frente à atividade antimicrobiana e antioxidante dos mesmos. Esta atividade se deve principalmente aos compostos fenólicos presentes em abundância neste vegetal.

3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

De acordo com Lapa e colaboradores (2010), a planta medicinal deve ser considerada como uma espécie vegetal definida por seu genoma, o qual direciona a formação das características morfológicas externas (fenótipo) e a síntese dos produtos químicos do metabolismo, tanto substâncias do metabolismo primário, como aquelas do metabolismo secundário, pouco ou nada utilizadas pelos vegetais, mais potencialmente ativas nos animais.

A caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais, desta forma, é realizada por intermédio de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (FALKENBERG *et al.*, 2010).

Segundo Taiz e Zeiger (2004) os compostos fenólicos, dentre os compostos advindos do metabolismo secundário dos vegetais, são produtos que contém um grupo fenol, ou seja, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático, constituindo um grupo bastante heterogêneo devido à sua diversidade química, o que reflete a variedade de funções por estes apresentadas. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. A maior parte dos compostos fenólicos, entretanto, não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares (CROFT, 1998; CARVALHO *et al.*, 2010).

Como compostos fenólicos, portanto, são encontradas estruturas dos ácidos fenólicos, derivados da cumarina, dos pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas. Incluem, ainda, as ligninas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais. Estruturas fenólicas também são encontradas fazendo parte de proteínas, alcalóides e terpenóides (NACZK; SHAHIDI, 2004; CARVALHO *et al.*, 2010).

Os mais importantes ácidos hidroxibenzóicos da dieta, relativos à ácidos fenólicos, são os ácido elágico e gálico, que normalmente ocorrem como taninos hidrolisáveis, ao passo que os principais ácidos hidroxicinâmicos são os ácido caféico e ferúlico (KING; YOUNG, 1999; SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos correspondem a um grupo diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina (Figura 5). Tratam-se da maior categoria de fito-produtos químicos e os mais amplamente distribuídos no reino das plantas. Os três mais importantes grupos de compostos fenólicos dietéticos são os flavonóides, os ácidos fenólicos, e os polifenóis (KING; YOUNG, 1999). Os fenólicos são encontrados geralmente em todo o reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Encontram-se divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (SOARES, 2002).

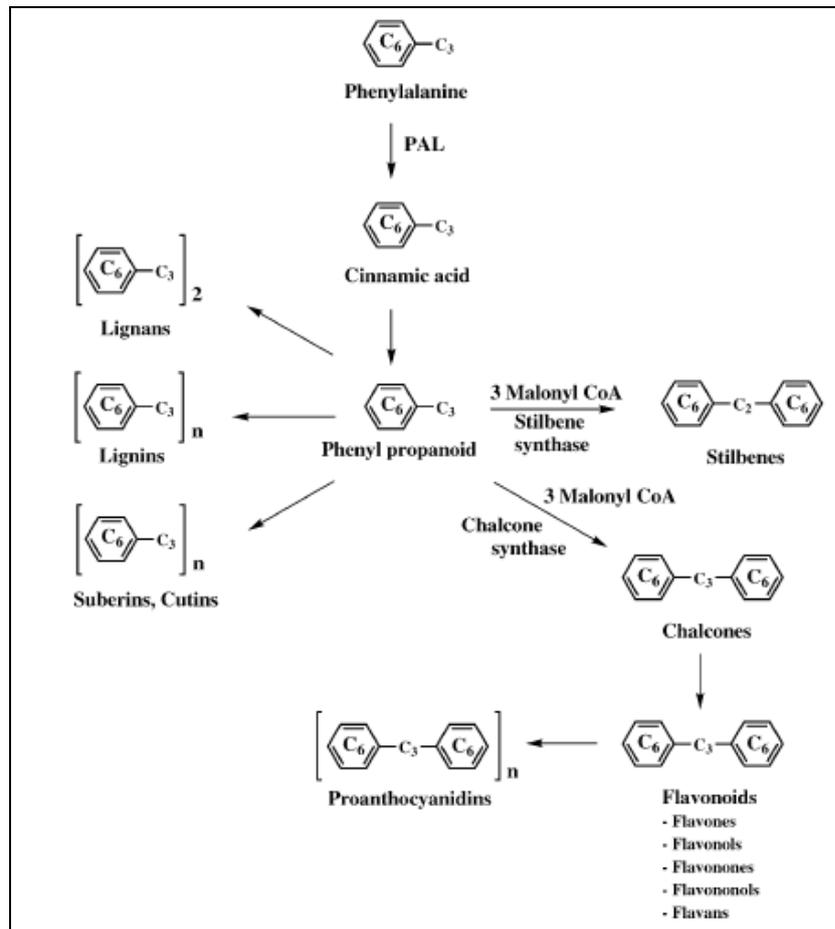


FIGURA 5 - ORIGEM DOS COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DO AMINOÁCIDO FENILALANINA

FONTE: Naczek e Shahidi (2004)

Compostos fenólicos são compostos biologicamente ativos, podendo atuar na prevenção de algumas doenças. Neste sentido, os efeitos de fenólicos, graças à sua ação antioxidante, assim como de compostos contendo enxofre e de terpenos, têm sido foco de grande atenção no câncer e doenças do coração (KAHKONEN *et al.*, 1999; KING; YOUNG, 1999).

Estes compostos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis e têm sido relatados vários efeitos biológicos para os mesmos, incluindo atividade antioxidante. Extratos de frutas, ervas, legumes, cereais e outros materiais vegetais ricos em fenólicos são cada vez mais de interesse na indústria de alimentos por retardarem a degradação oxidativa dos lipídios e, assim, melhorar a qualidade e o valor nutricional da alimentação (KAHKONEN *et al.*, 1999).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos se deve, principalmente, às suas propriedades redox, que lhes permitem agir como agentes redutores, doadores

de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete. Além disso, eles têm um potencial quelador de metais (RICE-EVANS *et al.*, 1995).

Neste sentido, constituindo a maior classe de compostos fenólicos têm-se os flavonóides, caracterizados por estrutura carbônica contendo 15 átomos de carbonos organizados em dois anéis aromáticos ligados à uma cadeia de três carbonos (C₆-C₃-C₆) (Figura 6) e classificados em diferentes grupos em função do grau de oxidação da cadeia de três carbonos (TAIZ; ZEIGER, 2004). A definição de compostos como pertencentes à classe dos flavonóides deve levar em consideração a sua estrutura química além de sua origem biossintética. Neste sentido, os flavonóides são biossintetizados a partir dos fenilpropanóides, e caracterizam-se por possuir um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

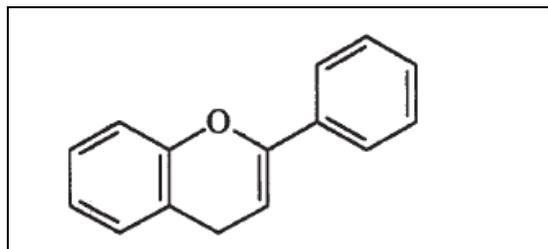


FIGURA 6 - ESTRUTURA BÁSICA DE UM FLAVONÓIDE
FONTE: King e Young (1999)

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular que normalmente ocorrem ligados a moléculas de açúcar, sendo agrupados em antocianinas e antoxantinas. As antocianinas são moléculas de pigmento vermelho, azul e roxo. As antoxantinas incluem flavonóis, flavonas, flavonóides e isoflavonas e são incolores ou branco a moléculas amarelas (KING; YOUNG, 1999; SOARES, 2002). Estes compostos desempenham importantes funções nas plantas, principalmente de pigmentação e defesa. Atuam protegendo contra raios UV, como é o caso das flavonas e flavonóis, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, devido à atividades antimicrobianas, como é o caso dos isoflavonóides. Auxiliam ainda a atração de animais com finalidade de polinização; atuam como antioxidantes; podem controlar a ação de hormônios vegetais e atuar como agentes aleopáticos (TAIZ; ZEIGER, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

Os flavonóides podem ainda ser utilizados como marcadores taxonômicos, devido, sobretudo a sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal, especificidade em algumas espécies, sua relativa facilidade de identificação, sua relativa estabilidade e seu acúmulo com menor influência do meio ambiente (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010).

As antocianinas, por sua vez, consistem no grupo mais comum de flavonóides pigmentados sendo responsáveis pela maioria das cores observadas nos vegetais (vermelha, rosa, roxa e azul). Dessa forma, são de importância vital como atrativo para polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os taninos, em contrapartida, são um grupo de polímeros fenólicos, de alto peso molecular, divididos em 2 classes: taninos hidrolisáveis e condensados. Os primeiros contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliídrico, esterificado com ácido gálico ou elágico e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzima (Figura 7). Já os taninos condensados são polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina (KING; YOUNG, 1999; SOARES, 2002). As funções que desempenham nos vegetais estão relacionadas à propriedades de defesa, protegendo contra o ataque de micro-organismos, como fungos e bactérias, atuando também como repelentes alimentares, contra ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados, devido ao seu caráter adstringente. Suas propriedades de defesa estão relacionadas à sua toxicidade, geralmente atribuída à capacidade de formar complexos com proteínas de modo não específico (TAIZ; ZEIGER, 2004; SANTOS; MELLO, 2010).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos, resultam, principalmente, da complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), de uma atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e da habilidade de complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (SANTOS; MELLO, 2010).

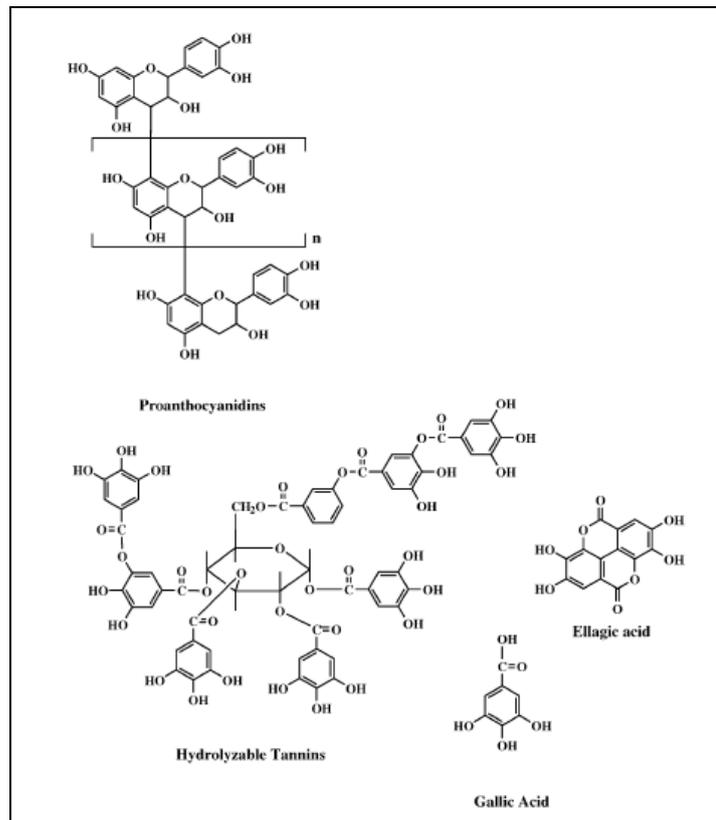


FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS TANINOS
 FONTE: NACZK e SHAHIDI (2004)

As cumarinas, como compostos fenólicos, são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico, representadas pela estrutura química geral evidenciada na Figura 8 (SOARES, 2002).

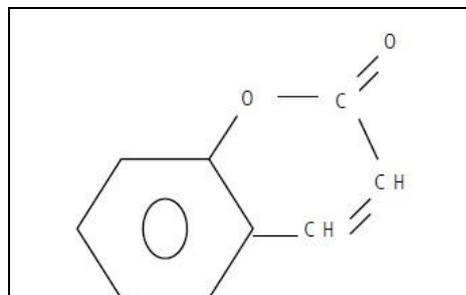


FIGURA 8 - ESTRUTURA GERAL DAS CUMARINAS
 FONTE: Soares (2002)

Finalmente, uma contextualização sobre os óleos essenciais, outra importante classe de metabólitos produzidos pela espécie vegetal em estudo, está

contemplada no item seguinte desta revisão, em relação às características gerais, distribuição no vegetal, processos extrativos e principais finalidades de uso.

3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas aromáticas definem-se pelos compostos particulares que contêm, quer dizer, pelos seus óleos essenciais, também denominados de essências. Estes se caracterizam, tipicamente, por serem constituídos por misturas de numerosos compostos voláteis, com tensões de vapor elevadas, mais ou menos odoríferos, insolúveis na água, mas solúveis em vários solventes imiscíveis nesta e, também, no álcool (COSTA, 1975; PROENÇA DA CUNHA, 2005).

Os óleos essenciais, desta forma, são também usualmente denominados de óleos etéreos (pela solubilidade em solventes orgânicos apolares) ou essências (pelo aroma normalmente agradável e intenso), contendo misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e com densidade menor do que a da água, formados pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas. Diferem-se dos óleos fixos, normalmente obtidos de sementes, devido a característica de volatilidade (COWAN, 1999; PINHEIRO, 2003; SIMÕES; SPITZER, 2010).

A ANVISA caracteriza e define os óleos essenciais como sendo,

[...] produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por desterpenados, aqueles que tenham sido submetidos a processo de desterpenação; e, por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados. (BRASIL, 1999).

As substâncias aromáticas produzidas, insolúveis na água e possuindo maiores tensões de vapor, destilam-se, como é próprio, em conjunto com o vapor de água; num caso particular, quando se localizam em glândulas secretoras subepidérmicas salientes à superfície dos hasperídeos, podem separar-se por

escoamento, habitualmente denominado processo de expressão, o que ocorre normalmente com pericarpos frescos de certos *Citrus* COSTA, 1975; BRUNETON, 1991; PROENÇA DA CUNHA, 2005).

O termo “Essência” é derivado do latim *essentia*, referindo-se o que faz com que uma coisa seja o que é: propriedade especial. Essências ou óleos essenciais são misturas complexas de substâncias de origem vegetal responsáveis pelo odor agradável ou mesmo desagradável das plantas. São produzidas dentro de estruturas secretoras especiais (pêlos glandulares, glândulas, canais secretores, bolsas secretoras) e podem ser obtidas por hidrodestilação com auxílio de aparelho de Clevenger (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

Segundo Costa (1975) os óleos essenciais encontram-se segregados em aparelhos glandulares particulares de cada grupo taxonômico vegetal, como células secretoras epidérmicas ou localizadas nos tecidos parenquimatosos, bolsas e canais de origem esquizogênica ou esquizolisígenica e glândulas externas, mais conhecidas por pêlos secretores. Caracterizam-se pelas gotas oleosas, refrigerantes, de aspecto particular. Localizam-se, ainda, em células epidérmicas e subepidérmicas não diferenciadas, mas nestas circunstâncias encontram-se solubilizadas no suco celular, em virtude das escassas percentagens em que se encontram; revelam-se pelo aroma que emprestam, por exemplo, aos frutos.

Todos os órgãos vegetais podem acumular óleos essenciais, como flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, porém, sua composição pode variar de acordo com sua localização, assim como seu odor e caracteres físico-químicos (BRUNETON, 1991; BIASI; DESCHAMPS, 2009; SIMÕES; SPITZER, 2010).

Os óleos essenciais estão presentes com maior frequência nas fanerógamas, localizados em células secretoras. Foram reconhecidos em diversas gimnospermas e em angiospermas monocotiledôneas, mas ocorrem principalmente nas angiospermas, particularmente nas dicotiledôneas. Neste sentido, há o predomínio de espécies aromáticas em famílias como lauráceas, mirtáceas, rosáceas, leguminosas, geraniáceas, rutáceas, hipericáceas, umbelíferas, verbenáceas, labiadas, compostas e outras. Não foram reconhecidos nas briófitas, raramente aparecem nas pteridófitas e de modo geral as talófitas também não os

contêm (COSTA, 1975; SIMÕES; SPITZER, 2010). Esses compostos são importantes para os vegetais por desempenharem funções como atração de polinizadores, proteção contra predadores, efeito alelopático de inibição da germinação e de outras plantas vizinhas, evitar a perda excessiva de água e a elevação da temperatura (BRUNETON, 1991; SIMÕES; SPITZER, 2010).

Os óleos são misturas de 20 a 60 componentes, com concentrações variadas, caracterizados por dois ou três compostos principais de concentração entre 20 a 70%, denominados majoritários e outros elementos, em menores teores, podendo existir aqueles em baixíssimas concentrações, conhecidos como traços. Estes compostos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (BAKKALI *et al.*, 2008; SIMÕES; SPITZER, 2010).

Essas substâncias quase sempre possuem poder rotatório e apresentam índice de refração elevado. A extração normalmente é feita por arraste por vapor d'água (BRUNETON, 1991).

Estima-se que três mil óleos essenciais sejam conhecidos, sendo que aproximadamente 300 desses produtos voláteis são comercialmente importantes, destinados para a indústria de fragrâncias e de aromas (BURT, 2004).

As plantas aromáticas e seus óleos essenciais têm sido utilizados desde a antiguidade, como temperos, fragrâncias, e como agentes antimicrobianos na medicina. Também são aplicados em plantações no controle de pragas e de espécies daninhas, já que são biodegradáveis e apresentam pouca ou nenhuma toxicidade aos vertebrados (BATISH *et al.*, 2008).

Numerosas indústrias consomem os óleos essenciais. De acordo com Costa (1975) e Proença da Cunha (2005), em primeiro lugar destaca-se o grupo da perfumaria e cosmética, em virtude de constituir a sua principal matéria-prima. Dentre os usos o autor destaca a utilização na manufatura de perfumes propriamente ditos, mas também em detergentes e outros aromatizadores, assim como em cosméticos como em cremes diversos, loções, desodorantes corporais, entre outros. Em segundo lugar destaca-se a sua utilização na indústria alimentícia, utilizados em certos tipos de preparações alimentícias, e em bebidas alcoólicas e

não alcoólicas. Já no âmbito da terapêutica, representam uma menor parcela de utilização, sendo utilizados os que apresentam propriedades medicinais reveladas ou ainda como adjuvantes em formulações farmacêutica (corretivos de sabor e aromas de medicamentos). Além destas aplicações, os óleos essenciais podem ser empregados em outras áreas industriais pelas suas propriedades desinfetantes, inseticidas, na fabricação de ceras, polimentos, secantes, impermeabilizantes, molhantes, detergentes, solventes, entre outros. A Figura 9 apresenta os principais setores industriais que fazem uso dos óleos essenciais.

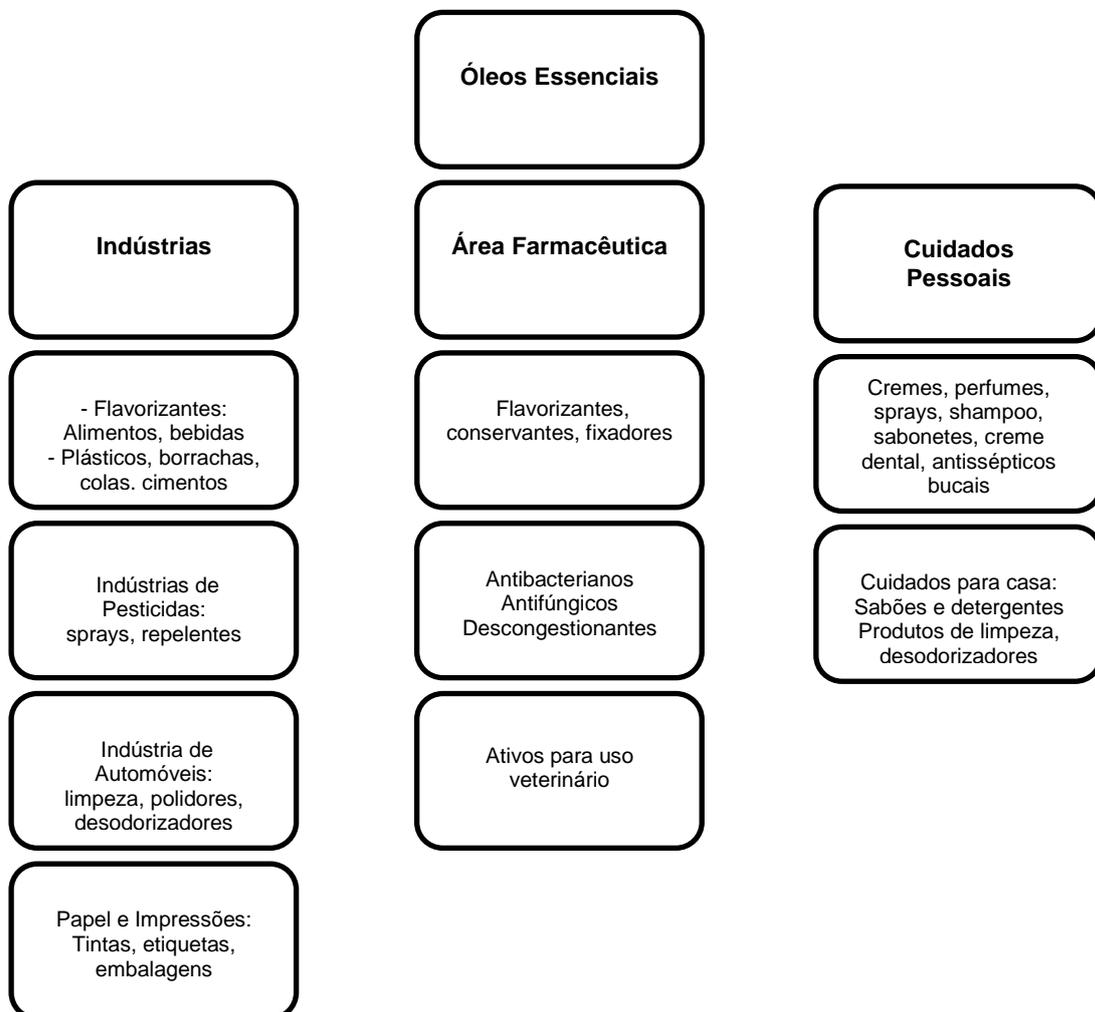


FIGURA 9 - PRINCIPAIS RAMOS INDUSTRIAIS QUE UTILIZAM OS ÓLEOS ESSENCIAIS
 FONTE: Adaptado de UNIDO e FAO (2005)

A partir de essências podem ser obtidos, ainda, os denominados hidrolatos ou pseudo-hidrolatos, que consistem de soluções aquosas saturadas de essências ou de outras substâncias aromáticas, resultantes de processo de destilação ou

simples dissolução de substâncias aromáticas em água destilada, que tornam estas soluções aromatizadas, sendo, desta forma, também conhecidas como “águas aromáticas” (OLIVEIRA; AKISUE, 2000; SIMÕES; SPITZER, 2010).

O Brasil encontra-se entre os quatro principais países responsáveis pela produção de óleo essencial, ao lado da Índia, da China e da Indonésia. Essa colocação está relacionada aos óleos de frutos cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos, principalmente das laranjas (BIZZO *et al.*, 2009).

3.5.1 Métodos de Extração de Óleos Essenciais

De acordo a normas da ISO 9235 (1997) da ISO/TC 54, a destilação e a expressão são os processos de obtenção industrial de óleos essenciais (destilação pelo vapor de água e expressão dos hesperídios) (COSTA, 1975; PROENÇA DA CUNHA, 2005). No entanto, os autores destacam que o método mais comum de isolamento baseia-se na destilação conjunta com vapor de água, pois é mais econômico, mais rápido e requer condições operacionais mais simples.

Segundo as revisões, existem diversos métodos para a extração dos óleos essenciais, selecionados, principalmente, de acordo com o valor comercial do produto e da região em que o óleo está concentrado na planta. Neste sentido, estão disponíveis também os métodos de enfloração, utilizado principalmente para extração do óleo essencial de flores, a prensagem à frio para extração dos óleos contidos em cítricos, além do método de extração com fluido supercrítico, que apresenta como vantagem a obtenção de produto isento de solvente e por manter a integridade dos constituintes do óleo, já que é realizado em condições mais brandas.

Os métodos de isolamento, porém, podem modificar a composição química das essências. Como exemplo cita-se as essências ricas em compostos terpênicos que separam-se rapidamente quando destiladas pelo vapor de água, porém aquelas que contém predominantemente compostos sesquiterpênicos e aromáticos, possuindo tensões de vapor muito mais baixas, só são isoladas após longas horas de processo. Além disto, a época da colheita e a maneira de efetuá-la podem

representar diferenças no rendimento do óleo essencial (COSTA, 1975; PROENÇA DA CUNHA, 2005). Desta forma, o melhor método deve ser escolhido a fim de permitir uma extração que reflita ao máximo a composição química do óleo presente na espécie aromática.

De acordo com UNIDO (United Nations Industrial Development Organization) e FAO (Food And Agriculture Organization Of The United Nations) (2005), existem 5 principais métodos de extração de óleos essenciais, a saber:

- Expressão
- Hidrodestilação
- Destilação pela água e vapor
- Destilação pelo vapor
- Extração com solventes.

Segundo estas organizações, o método de escolha dependerá da natureza do material, da estabilidade dos componentes químicos e da especificação do produto visado (UNIDO; FAO, 2005).

Nos itens seguintes desta leitura encontram-se os principais métodos disponíveis para que se realize a extração do óleos essenciais de espécies vegetais.

3.5.2 Enfloração

As flores, de forma geral, são extraídas por solvente e não destiladas ao vapor, com exceção da rosa (PROENÇA DA CUNHA, 2005; UNIDO; FAO, 2005).

Também conhecido como “enfleurage”, este método, que costumava ser bastante utilizado, tem aplicação atual apenas na indústria de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial, como na extração do óleo essencial de pétalas de flores. Isto é possível já que algumas flores, como o jasmim, continuam suas atividades fisiológicas, com produção de óleo essencial, por certo período após serem coletadas. O método consiste no depósito das pétalas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo período de tempo. Em seguida, essas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a

saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura, baixa pressão e o produto assim obtido possuem alto valor comercial (BRUNETON, 1991; PROENÇA DA CUNHA, 2005; SIMÕES; SPITZER, 2010).

3.5.3 Prensagem

Também denominado expressão, emprega-se este método, realizado à frio, para a extração dos óleos essenciais de frutos cítricos, que consiste em prensar os pericarpos desses frutos, sendo a camada que contém o óleo essencial então separada. Posteriormente, o óleo essencial é obtido através de sua separação da emulsão formada com água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada. (BRUNETON, 1991; PROENÇA DA CUNHA, 2005; SIMÕES; SPITZER, 2010).

3.5.4 Extração com Solvente Orgânico

Este tipo de extração permite que se extraiam os óleos essenciais, porém, também extrai outros componentes lipofílicos. Dessa forma, os produtos obtidos por este método raramente possuem valor comercial. Empregam-se solventes como éter, éter de petróleo e diclorometano (PROENÇA DA CUNHA, 2005; SIMÕES; SPITZER, 2010).

O método dos solventes voláteis, portanto, permite isolar todos os constituintes solúveis no solvente em questão, não sendo, desta forma, um método específico, porém permite o isolamento dos chamados óleos essenciais, se posteriormente os extratos obtidos forem destilados pelo vapor de água (COSTA, 1975; BRUNETON, 1991; PROENÇA DA CUNHA, 2005).

São características necessárias para um solvente a ser utilizado neste método apresentar seletividade, a fim de remover de forma rápida e eficiente os

constituintes do óleo da espécie aromática; apresentar baixo ponto de ebulição para que possa ser facilmente removido, sem a necessidade de altas temperaturas; ser quimicamente inerte, de forma a não reagir com outros componentes do óleo; após evaporação, conferir ausência de resíduos e ser de baixo custo e não inflamável (BRUNETON, 1991; PROENÇA DA CUNHA, 2005; BIASI; DESCHAMPS, 2009).

3.5.5 Extração por Fluido Supercrítico

Este método permite recuperar de modo bastante eficiente não somente os óleos essenciais, mas também os aromas naturais de vários tipos, sendo atualmente um dos principais métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o gás carbônico utilizado (CO_2) é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31 °C. Nesta temperatura, o CO_2 atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO_2 retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (CHAAR, 2000; SIMÕES; SPITZER, 2010).

Como vantagem do método, ressalta-se sua alta eficiência e rapidez e a obtenção de um produto livre de solventes, sendo também uma alternativa à extração com solventes, em que outros compostos lipofílicos como ceras e pigmentos são juntamente extraídos (PROENÇA DA CUNHA, 2005).

3.5.6 Hidrodestilação e Arraste por Vapor d'água

Este método caracteriza-se pela separação dos componentes de uma mistura devido à diferença de pressão de vapor. Substâncias voláteis, com

determinado ponto de ebulição possuem determinado valor de pressão de vapor, que é função da temperatura. Os constituintes do óleo, portanto, presentes no material vegetal em contato com a água aquecida irão receber pressão das moléculas de vapor d'água, entrando em ebulição. No estado volátil, os componentes são arrastados pelas moléculas de água alcançando o resfriado, quando são então condensados e separados da água. Pelo arraste por vapor d'água, em pequena escala, emprega-se o sistema de Clevenger. Com uma variação deste método, inclusive no sistema de Clevenger, faz-se a extração do óleo volátil pela mistura do material vegetal à água. Chamada de hidrodestilação, obtém-se também o hidrolato, que é a parte aquosa com a presença de uma porcentagem do óleo essencial que é solúvel. O óleo coletado deve ser seco com sulfato de sódio anidro (COSTA, 1994; INNOCENTINI, 2000; SIMÕES; SPITZER, 2010).

De acordo Proença da Cunha (2005), o termo hidrodestilação tem sido empregado para extrações utilizando água, e arraste por vapor para extrações utilizando água e vapor, ou apenas vapor. No primeiro caso, o material vegetal fica em contato com a água que é aquecida com diferentes fontes de calor. No segundo caso, o material vegetal é colocado em um cesto metálico perfurado que é mantido acima da lâmina de água. Nesta situação, não há contato direto do material com a água, apenas o vapor de baixa pressão produzido atinge o tecido vegetal. Já na extração apenas com vapor, o material vegetal também entra em contato por um vapor, que, no entanto, é produzido em separado e transferido em pressão normalmente superior à atmosférica para a estrutura de destilação.

O arraste por vapor de água é preferencialmente o método utilizado para extrair óleo de plantas frescas e para a sua realização a Farmacopéia Brasileira preconiza o uso de um aparelho de Clevenger, com modificações (SIMÕES; SPITZER, 2010).

A principal vantagem deste método é que ele pode ser conduzido, de forma geral, com equipamento simples, próximo ao local de produção da planta, podendo ser processada grande quantidade do material em um espaço relativamente curto de tempo (UNIDO; FAO, 2005; PROENÇA DA CUNHA, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DO MATERIAL

Foram coletados exemplares de *Liquidambar styraciflua* L. cultivados e localizados no campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Florestas, que fica localizada no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná.

Foram coletadas as folhas, caules e cascas de *L. styraciflua*, durante o período de outono, primavera e verão de 2011/2012, não sendo realizadas coletas no período de inverno em virtude da ausência de folhas nesta estação do ano, característica da espécie em estudo.

Após a coleta do material botânico foi preparada uma exsicata que foi encaminhada ao Herbário da Universidade Federal do Paraná (UFPR), para a identificação da espécie e receber o número de tombamento. O restante do material foi utilizado para extração (folhas, cascas e caules secos) e obtenção do óleo essencial (folhas secas e frescas).

Inicialmente foram separadas as diferentes partes aéreas do vegetal, tendo sido as folhas destacadas e as cascas dos ramos maiores do caule retiradas. Os ramos menores do caule não foram descascados, mas apenas fragmentados em tamanhos menores. Procedeu-se à secagem das folhas à temperatura ambiente, ao passo que as cascas foram secas em estufa a 50°C, por 2 horas. Parte das folhas coletadas foi armazenada em refrigerador para a realização da extração do óleo essencial a partir de folhas frescas e outra parcela recém-coletada foi reservada para a execução das análises morfoanatômicas.

A Figura 10 apresenta as etapas de pesquisa realizadas com as partes aéreas de *L. styraciflua*, através de um fluxograma esquemático.

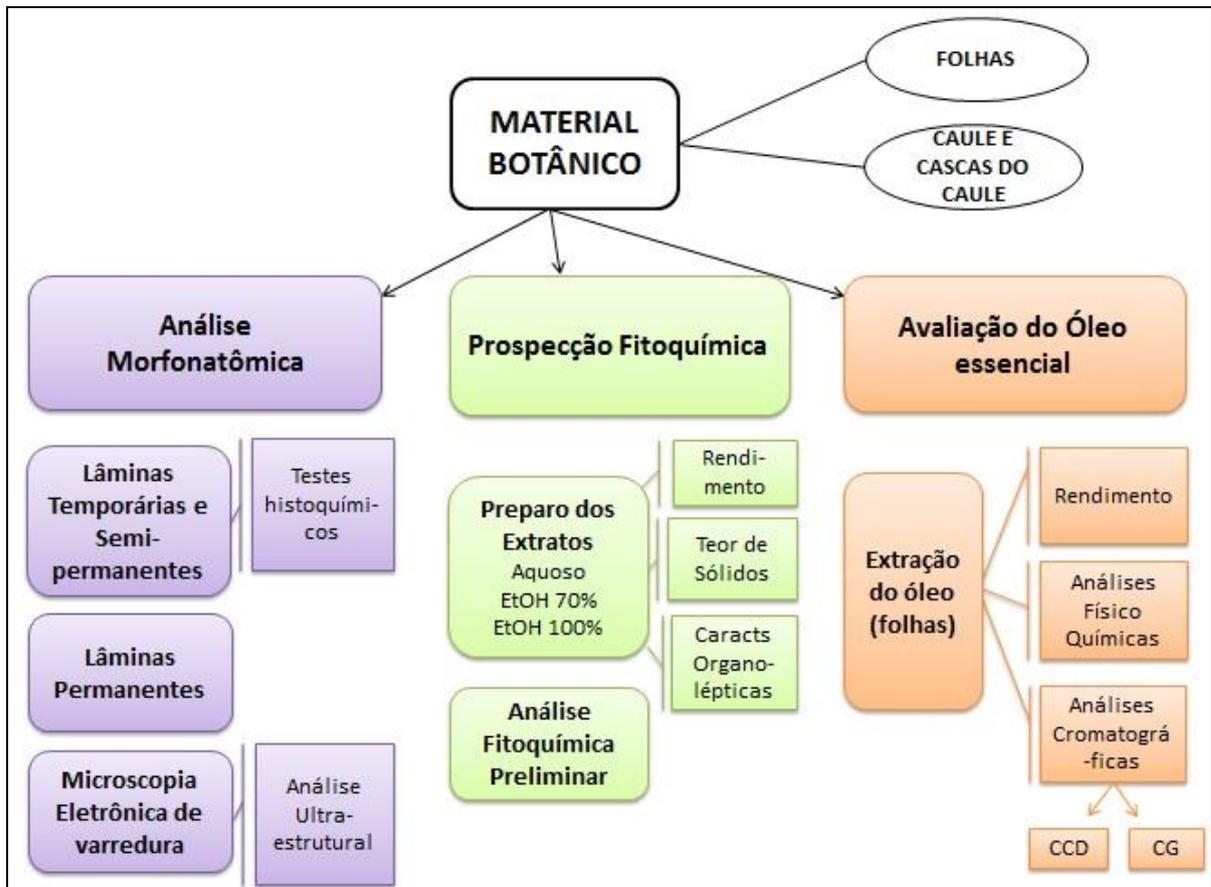


FIGURA 10 - FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DAS ETAPAS ANALÍTICAS DA PESQUISA
 FONTE: O Autor (2011)

4.2 ANÁLISES MORFOANATÔMICAS

O trabalho compreende a análise morfoanatômica de folhas, caule e cascas do caule, correspondentes à partes aéreas de *L. styraciflua*.

Para a análise das dimensões do comprimento e da largura do limbo foliar foram mensuradas 42 folhas e obtida a média. As demais análises morfológicas foram realizadas através da visualização macroscópica dos materiais botânicos, procedendo-se à comparação com descrições verificadas em literaturas científicas.

O estudo anatômico foi realizado a partir de materiais frescos e materiais fixados em FAA 50¹ (JOHANSEN, 1940) por 48 horas, posteriormente conservados em solução etanólica a 70%.

Para o processamento dos materiais botânicos foram utilizadas as técnicas de infiltração e inclusão em historesina e em polietilenoglicol 1500 (PEG 1500), além da técnica de maceração e da execução de testes histoquímicos, a fim de se obter marcadores que permitam a identificação botânica da espécie vegetal em estudo. As fotomicrografias foram obtidas a partir do manuseio de câmera digital (SONY® CYBER-SHOT DSC-P200) acoplada à microscópio óptico.

O processamento dos materiais para as análises anatômicas foi realizado no Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Botânica da UFPR e o processamento das amostras para as análises ultra-estruturais, por Microscopia Eletrônica de Varredura, foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM – 6360LV Scanning Electron Microscope.

4.2.1 Preparo das Lâminas Permanentes e Semi-permanentes

A confecção das lâminas semi-permanentes foi realizada segundo as técnicas convencionais de cortes à mão livre (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

A partir da secção de pequenos pedaços de materiais frescos de folhas, cascas do caule e caule, posteriormente fixados em FAA 50 e estocados em solução de etanol a 70%, foi realizada a infiltração e inclusão dos materiais botânicos em historesina, utilizando kit Leica®, para confecção de lâminas permanentes. Para isto, primeiramente folhas, cascas e caule foram desidratados até etanol a 95%, partindo dos materiais estocados em etanol a 70%. A desidratação em série crescente foi realizada sob vácuo a fim de permitir melhor fixação dos materiais. O processo de infiltração ocorreu em duas etapas:

¹ Solução composta por formaldeído, ácido acético e álcool etílico a 50% (JOHANSEN, 1940).

- Para-infiltração ou Pré-infiltração: após a desidratação, o material foi submetido à mistura de resina: álcool (1:1) de um dia para o outro, sob vácuo.

- Infiltração propriamente dita: retirou-se o meio de pré-infiltração e foi adicionado ao material o meio de infiltração, composto por resina pura, mantido em contato por 4 horas.

Decorrido o tempo de infiltração, removeu-se o meio e o material foi então incluído em meio composto por resina e endurecedor, que permite a polimerização da resina, previamente adicionado aos moldes plásticos, permitindo o emblocamento dos materiais. Após o desemblocamento, os blocos foram colados em suporte de madeira, para permitir o seccionamento dos materiais em micrótomo Leica®. Os cortes foram realizados a 7-10 μm , sendo então dispostos nas lâminas e distendidos em manta aquecedora. A coloração foi realizada utilizando-se solução de azul de toluidina (O'BRIEN *et al*, 1965) e as lâminas montadas com água destilada entre lamínula, no momento de observação.

Realizou-se também a infiltração e inclusão do material em PEG 1500, a partir de material fixado. Primeiramente realizou-se a infiltração do material em mistura de água destilada e PEG 1500 sólido (1:1). O frasco contendo os materiais em contato com estes meio de infiltração foram devidamente tampados e levados à estufa a 60°C, por 2 horas. Decorrido este tempo, os frascos foram destampados para concentrar o PEG. No dia seguinte realizou-se a troca total do meio, adicionando PEG puro líquido (mantido em estufa a 55-56°C) em contato com o material, por 2 horas. Foram montadas caixas de papel para incluir o material. Despejou-se PEG líquido no suporte e então o material foi colocado em contato com o meio, a fim de permitir o emblocamento dos mesmos, levando-os, posteriormente, à geladeira até solidificação. Os cortes foram realizados em micrótomo de rotação, obtendo-se secções de cerca de 20 a 25 μm . Foram realizadas colorações semi-permanentes dos cortes dispostos em lâminas, como a dupla coloração com azul de astra e fucsina básica (BRITO; ALQUINI, 1996) e ou azul de astra e safranina (BUKATSCH, 1972 apud KRAUS e ARDUIN, 1997). As lâminas foram montadas em gelatina glicerinada e vedadas com esmalte de unha incolor.

A figura 11 é esquemática das etapas de inclusão e infiltração dos materiais botânicos, em historesina e PEG 1500.



FIGURA 11 - ETAPAS DE PREPARO DAS LÂMINAS PERMANENTES E SEMI-PERMANENTES POR INFILTRAÇÃO E INCLUSÃO EM HISTORESINA E PEG 1500
 FONTE: O Autor (2011)

4.2.2 Técnica de maceração

A técnica de maceração foi realizada de acordo com Franklin (1945) modificado por Kraus e Arduin (1997) através do contato do material fixado com solução de peróxido de hidrogênio 30% : ácido acético (1:1), recém preparada.

O material, em cortes finos, foi disposto em frasco de vidro com tampa de rosca e levado à estufa a 60°C, sendo bem vedado devido à pressão interna a ser submetido. Realizou-se o acompanhamento do andamento da maceração, visualizando a mudança de cor e aspecto do material. O final da maceração foi indicado quando o material encontrava-se amolecido e esbranquiçado. Procedeu-se retirando a solução e lavando o material muitas vezes com água destilada até que todo o odor tivesse sido eliminado.

O material macerado foi distribuído em lâmina e corado com safranina 1% diluída em água e montado com gelatina, de forma semi-permanente. Também foi realizado o preparo de lâminas permanentes, em que, após a lavagem do material,

subiu-se a série etanólica (50% e 70%), em centrífuga, a 3000 rotações por 1 minuto, para evitar a perda das células, corando então o material com safranina em álcool a 70%. Subiu-se a série até acetato de butila puro, em centrífuga e montou-se com Permout®. Foi realizada também uma dupla coloração com safranina e azul de astra (BUKATSCH, 1972 modificado por KRAUS E ARDUIN 1997).

4.2.3 Testes Histoquímicos

Os testes foram realizados segundo técnica descrita por Berlyn e Mikshe (1976), a fim de evidenciar classes de compostos químicos presentes, utilizando-se os reagentes da Tabela 1, sendo conduzidos a partir de materiais frescos, seccionados à mão livre, e partir de materiais infiltrados e incluídos em PEG 1500, seccionados em micrótomo rotatório, procedendo-se com a montagem de lâminas temporárias e semi-permanentes.

TABELA 1 - SOLUÇÕES REAGENTES EMPREGADAS NOS TESTES HISTOQUÍMICOS

Soluções Reagentes	Compostos químicos
Azul de Toluidina (O'BRIEN <i>et al.</i> , 1965)	Celulose, lignina, compostos fenólicos, taninos, mucilagens
Cloreto férrico (JOHANSEN, 1940)	Compostos fenólicos
Lugol (BERLYN; MIKSHE, 1976)	Amidos
SUDAM III (SASS, 1951)	Compostos graxos (lipídios, cutina, suberina)

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Esta técnica foi empregada a fim de realizar a descrição da morfologia dos estômatos, tricomas e cutícula, pela análise da superfície da folha. No estudo do caule, por sua vez, foram realizadas análises a partir de cortes transversais dos mesmos.

Para o processamento dos materiais foram utilizadas folhas e caule estocados em etanol a 70%, previamente fixados em FAA 50%, submetidos então à série etanólica de concentrações crescentes, por transferência, a cada 10 minutos, à soluções a 80, 90 e 100% de etanol.

As amostras foram então levadas à desidratação pelo ponto crítico com CO₂, em equipamento SCD 030 Balzers Union FL 9496, por um período de 1 hora e 30 minutos, a fim de propiciar a retirada de toda a água interna e externa possivelmente ainda presente nestes materiais. Após este processo, realizou-se a disposição e fixação dos materiais com fita adesiva de cobre em suporte metálico, procedendo-se à metalização com ouro (Figura 12), sendo as fotomicrografias dos materiais para análise ultraestrutural realizada por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura.



FIGURA 12 - SUPORTES METÁLICOS COM AS AMOSTRAS PARA ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.
FONTE: O Autor (2011)

4.3 ANÁLISES FITOQUÍMICAS

4.3.1 Análise Fitoquímica Preliminar

A análise fitoquímica preliminar foi realizada a partir do preparo de extratos aquoso e hidroalcoólico de folhas e cascas do caule de *L. styraciflua*, segundo metodologia de Moreira (1979) modificada por Nakashima (1993).

No extrato hidroalcoólico foram pesquisadas as seguintes classes de metabólitos secundários: alcalóides, aminogrupos, glicosídeos flavônicos, leucoantocianidinas, glicosídeos antraquinônicos, cumarinas, saponinas, taninos e esteróides e/ou triterpenos e iridóides.

No extrato aquoso foi realizada a pesquisa de glicosídeos antociânicos, glicosídeos saponínicos, glicosídeos cianogenéticos, ácidos voláteis, ácidos fixos, taninos (hidrolisáveis e condensados), iridóides e aminogrupos.

Para isto, foram realizadas as seguintes reações qualitativas, de acordo com a classe de metabólitos pesquisada:

- a) Pesquisa de flavonóides: Reação de Shinoda, Reação de Pacheco, Reação Oxalo-bórica ou Reação de Taubock, Ensaio com Zn em HCl e Pesquisa de Leucoantocianidina, pela redução em presença de HCl;
- b) Pesquisa de alcalóides: Reações gerais utilizando os reativos Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat;
- c) Pesquisa de Cumarinas: Método do ultravioleta (360 nm) para detecção de fluorescência azul-brilhante ou verde;
- d) Pesquisa de Antraquinonas: Reação de Bornträger
- e) Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos: Reação de Liebermann-Burchard, Keller Kelliani, Xantidrol, Baljet e Tollens;
- f) Pesquisa de Saponinas: Teste da formação de espuma (Afrosométrico) e Teste de hemólise;
- g) Pesquisa de taninos: Reações utilizando as soluções reagentes de cloreto férrico 1%, sulfato de ferro amoniacal 5%, cloridrato de emetina,

gelatina 2,5% a 0,9% em NaCl, cianeto de potássio, ácido nitroso, dicromato de potássio e reação com formol-clorídrico

- h) Pesquisa de aminogrupos: Reação de ninhidrina;
- i) Pesquisa de ácidos fixos: Reação com reativo de Nessler;
- j) Pesquisa de ácidos voláteis: Reação utilizando papel indicador de pH em tubo de ensaio;
- k) Pesquisa de iridóides: Reações com cristais de fluoroglucinol e HCl, reações com ácido sulfúrico reagente e reação com vanilina e ácido sulfúrico;
- l) Pesquisa de antocianinas: detecção de compostos anfóteros, detectados pela mudança de coloração em função dos meios ácido, neutro e alcalino.
- m) Pesquisa de glicosídeos cianogênicos: Reação de isopurpurato de sódio, (papel picro-sódico) e reação de Schoenbainn.

Além destes ensaios, foram determinadas as características organolépticas (cor, odor e sabor), o pH e o teor de sólidos% (resíduo seco%) dos extratos, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010).

4.3.1.1 Preparo dos extratos hidroalcoólico e aquoso

Os extratos hidroalcoólico e aquoso das folhas e cascas do caule de *L. styraciflua* foram preparados de acordo com a metodologia proposta por Moreira (1979) e Nakashima (1993). Foi realizada a técnica de maceração à temperatura moderada a partir de 40 g dos materiais botânicos, devidamente triturados a pó grosso (FARMACOPÉIA, 2010), que foram avolumados em 200 mL de solução etanólica a 70% em água destilada (v/v), para o extrato hidroalcoólico, e em 200 mL de água destilada, para o extrato aquoso, sendo os mesmos levados ao banho-maria à 60 °C por um período de duas horas.

Após este tempo, os extratos foram filtrados através de funil de vidro, com papel filtro, tiveram seus volumes completados para 200 mL e foram então acondicionados em frasco rotulado e devidamente fechado, mantendo-os sob refrigeração até o momento de sua utilização.

As análises fitoquímicas com o extrato aquoso foram realizadas no mesmo dia de seu preparo, tendo em vista as alterações químicas (reações de hidrólise, por exemplo) e microbiológicas (contaminação por micro-organismos) que podem ocorrer durante o armazenamento do material extraído em meio totalmente aquoso.

O extrato hidroalcólico obtido foi concentrado em rotaevaporador, com temperatura mantida em 60 °C, até redução a cerca de 1/3 do volume total, sendo posteriormente fracionado por extração líquido-líquido, em funil de separação, com solventes de polaridades crescentes. As análises fitoquímicas foram realizadas a partir de suas frações, o que conduz à resultados mais nítidos e elucidativos em comparação à pesquisa direta de classes de metabólitos secundários no extrato bruto etanólico.

No fracionamento do extrato concentrado utilizou-se como solventes extratores o n-hexano (F1), clorofórmio (F2), acetato de etila (F3), butanol saturado em água (F4) e obteve-se a fração remanescente ressuspendendo o resíduo das extrações em etanol a 70 % em água (F5). A fração 1 (F1) foi obtida realizando-se 5 extrações com 20 mL a cada vez com o n-hexano, solvente mais apolar, sendo a fração hexânica reunida e reservada em frasco previamente identificado e o restante do extrato levado à banho-maria a 60 °C, até completa evaporação do solvente extrator. A partir do extrato isento de n-hexano prosseguiu-se a extração com o segundo solvente de características apolares, o clorofórmio (F2), procedendo-se de igual modo à partição anteriormente realizada com o n-hexano, obtendo-se a F2. Após a evaporação do solvente realizou-se a partição do extrato com acetato de etila, de polaridade intermediária, obtendo-se a F3. Após a remoção do solvente em banho-maria, o restante do extrato foi particionado com butanol, de forma a obter a F4. O resíduo das extrações foi novamente levado à banho-maria para completa evaporação do solvente e foi então reconstituído com solução etanólica a 70% em água, originando a F5, sendo estas duas frações de características mais polares.

4.3.2 Determinação do teor de umidade de folhas de *Liquidambar styraciflua*

O método para a determinação da umidade das folhas realizado para a extração do óleo essencial foi o ensaio gravimétrico de perda por dessecação (FARMACOPÉIA, 2000). Neste procedimento, partiu-se de uma massa conhecida de 10 g do material cortado, não excedendo 3 mm para cada aresta e desconsiderando a espessura, que foi colocada em estufa a 105 °C, até que duas pesagens consecutivas não indicassem uma diferença maior do que 5 mg, tendo sido as análises realizadas em triplicatas.

4.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua*

Utilizou-se como método para a extração e obtenção do óleo essencial das folhas de *L. styraciflua* a hidrodestilação por arraste de vapor de água, realizado em Aparato de Clevenger modificado (F. Bras., 2010). Foram realizadas extrações de folhas frescas e folhas secas à temperatura ambiente, para a determinação do rendimento do óleo essencial.

No procedimento, as folhas foram trituradas e acondicionadas em balão de fundo redondo de 3000 mL, adicionando-se quantidades suficientes de água destilada (5 a 10 vezes o seu peso) para cobrir o material e permitir o andamento da extração, sendo este então conectado ao aparato do equipamento e submetido à uma temperatura de cerca de 100 °C, tempo de extração de 6 horas. Decorrido este tempo, foi anotado o volume de óleo obtido pela leitura no tubo com escala de graduação. Uma alíquota do óleo essencial foi então armazenada em frasco apropriado, reservado para análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG/EM), e os demais volumes, obtidos das extrações subsequentes, reservados em frasco âmbar e mantidos em congelador para as demais análises.

O rendimento foi calculado em mililitros de óleo essencial por 100 g do vegetal (mL%), conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira (2010).

O conjunto de análises realizadas com o óleo essencial de *L. styraciflua* incluiu, além da determinação do rendimento, a caracterização cromatográfica, por meio de cromatografia gasosa e cromatografia em camada delgada, e caracterizações físico-químicas, com a determinação da solubilidade em álcool, do poder rotatório, do índice de refração e da densidade relativa do óleo essencial.

4.4.1 Análise de dados

Os dados dos rendimentos das extrações das amostras foram analisados a partir de cinco repetições, realizando-se as médias e os respectivos desvios padrões.

4.4.2 Análises físico-químicas do óleo essencial

4.4.2.1 Determinação da solubilidade em álcool

Seguindo metodologia da Pharmacopea Helvetica VII (1990), foi determinada a solubilidade do óleo essencial em álcool etílico a 70%, 80%, 90% e em álcool etílico absoluto. Para esta determinação, empregou-se bureta de 25 mL, contendo, separadamente as concentrações a serem testadas, e no tubo de ensaio 0,1 ml de óleo essencial. Os solventes foram liberados gota a gota lentamente, até completa solubilização da amostra. Pela leitura do volume de etanol gasto na bureta foi obtida a proporção de solubilidade do óleo frente às diferentes concentrações de álcool etílico.

4.4.2.2 Determinação da densidade relativa ${}_{20}d^{20}$

A determinação da densidade relativa foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), por picnometria. A densidade relativa foi obtida pela relação entre a massa da amostra e a massa da água, nas mesmas condições de temperatura (20 °C) e a partir de iguais volumes dessas substâncias. Previamente à execução do procedimento foi realizada a calibração do picnômetro, pela determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida, a 20 °C.

4.4.2.3 Determinação do índice de refração ${}^{20}n_D$

O índice de refração foi determinado em função da luz de sódio no comprimento de onda 589,3 nm (raia D) e a $20 \pm 0,5$ °C, em refratômetro ABBÉ, previamente calibrado, segundo a Farmacopéia Brasileira (2010).

4.4.2.4 Determinação do Poder rotatório α_D^{20}

O poder rotatório α_D^{20} foi determinado de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), utilizando-se polarímetro e as medições realizadas a 589 nm a $20 \pm 0,5$ °C, pela média de pelo menos cinco determinações corrigidas pelo branco, utilizando-se o mesmo solvente utilizado para o preparo da solução da amostra. Especificação do Polarímetro: JADSCO P-2000.

4.4.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/EM)

As amostras para a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foram diluídas na proporção de 1 µL/mL em n-hexano. Foi utilizado o cromatógrafo gasoso VARIAN® 3800 acoplado ao espectrômetro de massa SATURN® 200, equipado com uma coluna apolar CP-Sil 8 low bleeding (30 m x 0,25 µm). Utilizou-se como gás de arraste o hélio, a uma pressão constante de 59 kPa e vazão constante de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi de 280 °C, sendo a temperatura inicial de 60 °C, com rampa de aquecimento de 3 °C/min, elevando até a temperatura final de 280 °C por 10 min.

A identificação dos compostos foi efetuada por comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2007) e com os espectros da biblioteca NIST 2008 – banco de dados do sistema.

Foram realizados os cálculos do Índice de Kovats (IK) para auxiliar na identificação de cada composto através da comparação do tempo de retenção da amostra em relação a padrões de uma série de n-alcenos. Este índice de retenção foi proposto por Kovats em 1958, como parâmetros de identificação (SKOOG *et al.*, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DAS PARTES AÉREAS DE *Liquidambar styraciflua*

5.1.1 Ensaio fitoquímico preliminar

Os ensaios fitoquímicos preliminares, realizados a partir dos extratos aquosos e das frações n-hexano (F1), clorofórmio (F2), acetato de etila (F3), butanol (F4) e etanol a 70% (F5), de folhas e cascas do caule, revelaram uma ampla gama de classes de metabólitos secundários que são produzidos pela espécie vegetal *L. styraciflua*. Nas frações, a pesquisa foi direcionada levando-se em consideração a probabilidade de encontrar determinada classe de compostos. Desta forma, por exemplo, a classe dos flavonóides foi pesquisada nas frações F3, F4 e F5 do extrato hidroalcoólico fracionado, tendo em vista suas características mais intermediárias de polaridade, em função de sua estrutura química.

De acordo com Farias (2010), a identidade baseada nos constituintes químicos exige conhecimentos fitoquímicos prévios, por intermédio de reações químicas de caracterização ou de um perfil cromatográfico, bem como o isolamento, a purificação e a elucidação estrutural das principais substâncias. As reações químicas permitem verificar a presença de grupos de substâncias, por exemplo, flavonóides, alcalóides, esteróides, entre outros, sendo método simples, de rápida execução e baixo custo. Estas reações são, geralmente, inespecíficas, ocorrendo através de grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias. Algumas reações, entretanto, são consideradas específicas, ocorrendo somente com algumas estruturas típicas de uma única classe de substâncias.

Por meio dos ensaios preliminares com a espécie *L. styraciflua* foi evidenciada a presença de glicosídeos antociânicos e saponínicos, taninos hidrolisáveis e condensados, ácidos fixos e aminogrupos no extrato aquoso a 20%

de folhas, assim como no extrato aquoso das cascas do caule da espécie em questão, de acordo com os dados das Tabelas 2 e 4.

No extrato hidroalcoólico de folhas, posteriormente fracionado, verificou-se a presença de flavonóides na fração acetato de etila, butanólica e etanólica a 70%; cumarinas na fração etanólica; esteróides e/ou triterpenóides na fração clorofórmica; presença de iriídes em todas as frações, com exceção da fração hexânica; presença de taninos e saponinas nas frações butanólica e etanólica e aminogrupe na fração etanólica. Nas frações das cascas do caule foram obtidos os mesmos resultados, sendo, porém, as cumarinas evidenciadas também na fração clorofórmica e os iridóides presentes em todas as frações de pesquisa, conforme dados das Tabelas 3 e 5.

TABELA 2 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO A 20% DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	RESULTADOS
GLICOSÍDEOS ANTOCIÂNICOS	+
GLICOSÍDEOS CIANOGENÍCOS	-
ÁCIDOS VOLÁTEIS	-
ÁCIDOS FIXOS	+
GLICOSÍDEOS SAPONÍNICOS	
Teste da Espuma	+
TANINOS	
Solução de gelatina	+
Cloridrato de emetina	+
Cloreto férrico 1%	+
Sulfato de ferro amoniacal 5%	+
Formol clorídrico	+
AMINOGRUPO	+

+: REAÇÕES POSITIVAS
- : REAÇÕES NEGATIVAS

TABELA 3 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	RESULTADOS				
	F1	F2	F3	F4	F5
ALCALÓIDES	-	-	-	-	-
GLICOSÍDEOS FLAVÔNICOS					
Reação de Shinoda	x	x	+	-	-
Reação Oxálo-bórica	x	x	+	*	*
Reação de Pacheco	x	x	-	-	-
Reação de Zinco	x	x	-	-	-
Leucoantocianidinas	x	x	-	+	+
GLICOSÍDEOS ANTRAQUINÔNICOS	-	-	-	-	-
CUMARINAS					
UV	x	-	X	x	+
ESTERÓIDES E/OU TRITERPENÓIDES					
Reação de Liebermann Bouchard	x	+	X	x	X
Reação de Baljet	x	-	X	x	X
Reação de Xantidrol	x	-	X	x	X
Reação de Tollens	x	+	X	x	X
Reação de Keller-Killiani	x	+	X	x	X
IRIDÓIDES					
Reação com cristais de fluoroglucinol e HCl	-	+	-	-	-
Reação com ácido sulfúrico R	-	-	-	-	-
Reação com vanilina e ácido sulfúrico	-	-	+	+	+
AMINOGRUPOS	x	x	X	x	+
GLICOSÍDEOS SAPONÍNICOS					
Teste da Hemólise	x	x	-	+	-
Teste da Espuma	x	x	X	+	+
TANINOS	x	x	X	+	+

* : VESTÍGIOS

x: FRAÇÕES NÃO AVALIADAS

+: REAÇÕES POSITIVAS

- : REAÇÕES NEGATIVAS

TABELA 4 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO A 20% DAS CASCAS DO CAULE DE *Liquidambar styraciflua*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	RESULTADOS
GLICOSÍDEOS ANTOCIÂNICOS	+
GLICOSÍDEOS CIANOGENÍCOS	-
ÁCIDOS VOLÁTEIS	-
ÁCIDOS FIXOS	+
GLICOSÍDEOS SAPONÍNICOS	
Teste da Espuma	+
TANINOS	
Solução de gelatina	-
Cloridrato de emetina	+
Cloreto férrico 1%	+
Sulfato de ferro amoniacal 5%	+
Formol clorídrico	+
AMINOGRUPO	+

+: REAÇÕES POSITIVAS
 -: REAÇÕES NEGATIVAS

TABELA 5 - CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS DO CAULE DE *Liquidambar styraciflua*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	RESULTADOS				
	F1	F2	F3	F4	F5
ALCALÓIDES	-	-	-	-	-
GLICOSÍDEOS FLAVÓNICOS					
Reação de Shinoda	x	x	-	-	-
Reação Oxálo-bórica	x	x	+	+	-
Reação de Pacheco	x	x	-	-	+
Reação de Zinco	x	x	-	-	-
Leucoantocianidinas	x	x	-	-	-
GLICOSÍDEOS ANTRAQUINÔNICOS	-	-	-	-	-
CUMARINAS					
UV	x	+	x	x	+
ESTERÓIDES E/OU TRITERPENÓIDES					
Reação de Liebermann Bouchard	x	+	x	x	x
Reação de Baljet	x	-	x	x	x
Reação de Xantidrol	x	-	x	x	x
Reação de Tollens	x	+	x	x	x
Reação de Keller-Killiani	x	+	x	x	x
IRIDÓIDES					
Reação com cristais de fluoroglucinol e HCl	+	-	-	+	-
Reação com ácido sulfúrico R	-	-	-	-	-
Reação com vanilina e ácido sulfúrico	-	+	+	+	+
AMINOGRUPOS	x	x	x	x	+
GLICOSÍDEOS SAPONÍNICOS					
Teste da Hemólise	x	x	-	-	-
Teste da Espuma	x	x	x	+	-
TANINOS	x	x	x	+	+

x: FRAÇÕES NÃO AVALIADAS

+: REAÇÕES POSITIVAS

-: REAÇÕES NEGATIVAS

Dentre as classes de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas estudadas do vegetal, identificados nas reações acima apresentadas, estão os flavonóides, taninos, as antocianinas e as cumarinas, caracterizados como compostos fenólicos.

A presença de glicosídeos flavônicos, neste trabalho, foi determinada pelas reações características, apresentando nas reações testadas, pelo menos um resultado positivo que indicasse sua presença, o que foi constatado nas frações F3, F4 e F5 das folhas e cascas do caule.

As cores outonais, de amarelo a vermelho, apresentadas pela espécie em estudo, provavelmente se devem a presença das antocianinas, compostos detectados no vegetal.

A presença de taninos hidrolisáveis e condensados foi relatada em estudo verificando a relação entre a herbivoria e a presença de taninos, em árvores de baixas e altas latitudes, comparativamente, utilizando a espécie *L. styraciflua* e outras que também apresentam esta classe de compostos (ADAMS *et al.*, 2009). Em conformidade, as análises qualitativas com cloridrato de emetina, gelatina, sais de ferro III, sulfato de ferro amoniacal e formol clorídrico, realizadas com as folhas e cascas do caule, neste trabalho, revelaram a presença das duas classes de taninos, condensados e hidrolisáveis.

Já a presença de cumarinas pôde ser constatada pelo desenvolvimento de fluorescência na câmara de ultravioleta (365 nm), após os tratamentos necessários com as amostras testadas.

Outra classe de compostos identificados nas partes aéreas do vegetal em estudo foram as saponinas. De acordo com (SCHENKEL *et al.*, 2010) a detecção de saponinas no vegetal é realizada a partir de suas propriedades químicas e físico-químicas, através da reação com ácidos minerais, aldeídos aromáticos ou sais de metais, ou ainda, pela diminuição da tensão superficial e/ou pela ação hemolítica.

As propriedades biológicas das saponinas são determinadas pelo seu comportamento anfílico e pela habilidade em formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípídeos de membrana (SCHENKEL *et al.*, 2010). O teste da espuma apresentou resultado positivo em ambos os extratos de folhas e caule, porém o teste de hemólise apresentou resultado positivo apenas para a fração

butanólica das folhas. Diante disto, acredita-se que estejam presentes saponinas de ambas as classes, esteroidais e/ou triterpênicas, na folha, e no caule apenas saponinas triterpênicas.

A fração apolar (F2), submetida à reação de Lieberman-Burchard para esteróides e/ou triterpenos demonstrou resultado positivo, em ambas as partes aéreas, com o desenvolvimento de uma coloração rosada. Para esta classe de compostos, também resultaram positivos os testes de Keller-Killiani e Tollens.

Na pesquisa de aminogrupos, houve o desenvolvimento de coloração azulviolácea resultante da reação desenvolvida com a ninhidrina, indicando a presença de aminogrupos nos extratos aquosos analisados e na fração F5, de características polares. Os iridóides também são um grupo de compostos que se encontra presente nas folhas e cascas do caule de *L. styraciflua*, conforme observado em frações do extrato hidroalcoólico fracionado, por meio de pelo menos uma reação positiva dentre os três testes realizados para esta pesquisa.

No entanto, as reações para identificação de alcalóides, em todas as frações pesquisadas, resultaram negativas, não ocorrendo reações de precipitação características frente aos reativos gerais utilizados. A reação de Bornträger para glicosídeos antraquinônicos não revelou a formação da coloração avermelhada. Não foi verificada a presença de ácidos voláteis, avaliada nos extratos aquosos de folhas e cascas do caule de *L. styraciflua*, assim como não foi verificada a presença de glicosídeos cianogênicos.

A presença de taninos, proantocianidinas e flavonóides, está de acordo com o verificado para a subclasse Hamamelididae, que está relacionada à Magnoliidae via Trochodendrales (recordar, se necessário, a classificação da espécie no item 3.3 – 8º parágrafo) compostos comumente encontrados na subclasse em questão. Em conformidade também está a presença de iridóides, relatados como rara nesta subclasse, ocorrendo apenas em *L. styraciflua* (TAKHTAJAN, 2009).

Alguns outros compostos químicos advindos da espécie *L. styraciflua* foram verificados na literatura.

As sementes da espécie, a exemplo, são fontes de ácido chiquímico, um composto de partida na síntese comercial do agente antiviral oseltamivir e um importante intermediário na biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas,

representando uma importante fonte natural renovável deste composto (ENRICH *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2010).

As espécies de *Liquidambar* são também conhecidas por suas exsudações balsâmicas (GUENTHER, 1989). *Liquidambar styraciflua* é assim denominada devido à seiva de cor marrom-clara semelhante ao mel que, uma vez concentrada mediante fervura, torna-se um bálsamo utilizado para fins medicinais. Esse bálsamo tem sido usado, desde os tempos dos Aztecas, no tratamento de disenteria, catarro pulmonar, doenças de pele e outros males. As propriedades medicinais são atribuídas aos compostos de ácido cinâmico contidos na seiva (SHIMIZU, 2005; YANG *et al.*, 2011). O bálsamo das cascas de *Liquidambar orientalis* também é utilizado com remédio para problemas de pele (METCALFE E CHALK, 1950).

Em outra espécie do gênero, *Liquidambar formosana*, a resina extraída é frequentemente utilizada para tratamento de carbúnculo, herpes, úlcera, inchaço, hemorrinia e dor de dente na medicina chinesa. Os estudos indicaram que a resina consiste principalmente de constituintes químicos de triterpenóides, ácido cinâmico e seus derivados, possuindo ação farmacológica antitumoral, antiagregante e antiarrítmica (YANG *et al.*, 2011).

Fundamentalmente, de acordo com Lapa e colaboradores (2010), a pesquisa de grupos químicos visa garantir a uniformidade na obtenção de um medicamento fitoterápico. O controle da estabilidade da forma pressupõe que a matéria-prima em estudo seja uniforme e, na maioria das vezes, exige conhecimento prévio da sua constituição química. Neste sentido, os autores ressaltam que os diferentes produtos intermediários (tinturas, granulados, extratos secos, etc.) devem ser caracterizados através de seus constituintes químicos, por método de fácil execução. A opção mais segura seria identificar e determinar a concentração da(s) substância(s) ativa(s), o que nem sempre é possível frente ao grande número de componentes presentes no extrato. A utilização de substâncias marcadoras, relacionando, por exemplo, a concentração das substâncias mais abundantes, ou a dos grupos químicos com a atividade biológica, é alternativa a ser validada.

É possível verificar que são várias as aplicações industriais de compostos obtidos de fontes vegetais. De acordo com Schenkel e colaboradores (2010), estes compostos podem ser utilizados em preparações farmacêuticas, atuando como

substâncias ativas, responsáveis pela ação terapêutica, e também como adjuvantes, substâncias que viabilizam a administração e a manutenção da qualidade do medicamento, contribuindo, portanto, como fornecedores de insumos para estas duas classes de matérias-primas farmacêuticas.

Finalmente, de acordo com Farias (2010) os estudos de natureza química permitem o estabelecimento de marcadores químicos, que são indispensáveis para o planejamento e monitoramento das ações de transformações tecnológicas e para os estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final, na elaboração de medicamentos fitoterápicos.

5.1.2. Características Organolépticas e Teor de Sólidos (Resíduo Seco)

Extratos, do latim *extractus*, referindo-se à algo que extraído de uma outra coisa, são preparações concentradas obtidas de drogas vegetais ou de plantas frescas por meio de um dissolvente apropriado seguido de sua evaporação total ou parcial e ajuste do concentrado a padrões previamente estabelecidos. Dentre os meios de obtenção, destaca-se a maceração, decocção, infusão, digestão e a percolação (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

Dentre os tipos de extratos passíveis de serem obtidos têm-se os extratos fluidos, que consistem de preparações líquidas obtidas de drogas vegetais e preparadas de modo que cada mililitro contenha os princípios ativos solúveis de 1 g da droga devidamente dessacada ao ar livre (OLIVEIRA; AKISUE, 2000).

A partir dos extratos líquidos aquosos e hidroalcoólicos de *L. styraciflua* foram realizados os ensaios de caracteres organolépticos e determinou-se, ainda, o teor de resíduo seco dos mesmos e das respectivas frações, após partição com solventes de polaridades crescentes.

Nos ensaios de características organolépticas do extrato aquoso a 20% de folhas e cascas do caule de *L. styraciflua*, as folhas apresentaram extrato com cor marrom-esverdeado, odor herbáceo e sabor adstringente. Já as cascas apresentaram extrato com cor marrom, odor aromático e sabor levemente amargo e

adstringente. O extrato aquoso das folhas apresentou pH 4 e teor de sólidos de 19,11 g% e o extrato aquoso das cascas pH de 4-5 e teor de sólidos de 9,63 g%, conforme apresentado na Tabela 6.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS AQUOSOS A 20 % DE FOLHAS E CAULE.

Extrato aquoso a 20%		
Características Organolépticas	Folhas	Caule
Cor	marrom esverdeado	Marrom
Odor	Herbáceo	Aromático
Sabor	Adstringente	levemente adstringente/amargo
Ph	4	4 a 5
Teor de Sólidos (m/m)	19,114 g%	9,63 g%

Nos ensaios com o extrato hidroalcoólico a 20%, por sua vez, o extrato das folhas apresentou-se com cor marrom esverdeado claro, sabor adstringente, pH 4 a 5 e teor de sólidos de 11,39 g%. O extrato das cascas do caule, por outro lado, apresentou cor marrom esverdeado escuro, sabor levemente adocicado, pH 5 e teor de sólidos de 11,74 g%, conforme pode ser evidenciado na tabela abaixo (Tabela 7).

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS A 20 % DE FOLHAS E CAULE.

Extrato hidroalcoólico a 20%		
Características Organolépticas	Folhas	Caule
Cor	marrom esverdeado claro	marrom esverdeado escuro
Odor	levemente adocicado	aromático/amadeirado
Sabor	picante/adstringente	levemente adocicado
pH	4 a 5	5
Teor de Sólidos (m/m)	11,39 g%	11,74 g%

A análise comparativa dos dados presentes nas tabelas 6 e 7 permite estabelecer que as folhas possuem maior quantidade de compostos com características mais polares presentes, já que apresentou maior teor de resíduos sólidos extraídos quando da utilização do solvente aquoso em relação à extração com a mistura água-álcool, ao passo que o caule teve seus constituintes mais

extraídos com a solução hidroalcoólica, indicando maior presença de compostos de polaridades mais intermediárias.

De acordo com Farias (2010), a análise sensorial, ou seja, a análise do aspecto visual, do sabor, do odor e da percepção ao tato de matérias-primas vegetais é o meio mais simples e rápido de verificar alguns parâmetros de qualidade, principalmente de identidade e pureza. Quanto à pureza, muitas vezes a simples análise organoléptica pode permitir a verificação da contaminação por fungos ou o odor de material em decomposição. A característica de sabor verificada em ambos os extratos aquosos e hidroalcoólico a 20%, no presente trabalho, propiciou um indício prévio da presença de taninos, indicada pelo sabor adstringente dos extratos.

A Tabela 8 apresenta os resultados de teor de sólidos presentes nas frações da folha e das cascas do caule, a partir do fracionamento com os solventes de escolha já mencionados.

TABELA 8 - TEOR DE SÓLIDOS DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS A 20 % DE FOLHAS E CAULE.

Frações do Extrato hidroalcoólico a 20%		
Rendimento (g/mL)	Folhas	Caule
F1	0,0005	0,0023
F2	0,0011	0,0018
F3	0,0098	0,0025
F4	0,0153	0,0036
F5	0,0148	0,0094

Para as folhas, as frações que apresentaram maior teor de sólidos foram as extraídas com acetato de etila, butanol e etanólica a 70% em água, sendo os metabólitos mais “extraíveis” nestes solventes de maior polaridade em relação aos solventes apolares utilizados (éter de petróleo e diclorometano), o que indica a maior presença de compostos de polaridades intermediárias à polares nas partes aéreas em estudo.

5.1.3 Determinação do Teor de Umidade das folhas

A determinação da umidade, por meio da obtenção do peso constante, a partir da pesagem inicial de 10 g de folhas frescas e da pesagem final deste material, após secagem em estufa a 50 °C, por 24 horas, conduziu a um teor de umidade correspondente a 63% do peso das folhas, conforme os dados e cálculos abaixo.

Peso inicial (tomada de amostra) = 10 g

Peso final (peso constante após secagem) = 3,7 g

Peso relativo à massa de água perdida = 10 g – 3,7 g = 6,3 g

10 g de folhas -----6,3 g de água

100 g de folhas -----x

x= 63% (m/m) de água

A fim de orientar a quantidade de folhas a serem coletadas para a extração do óleo essencial é possível realizar um cálculo simples, que leva em consideração a massa de água presente no material, como segue:

100 g folhas úmidas ----- 37% sólidos vegetais

y -----100% sólidos vegetais

y= 270, 3 g de folhas úmidas (recém-coletadas)

Este valor indica a quantidade necessária de folhas a serem coletadas, considerando a perda em peso relativa á massa de água, após secagem do material. Ou seja, é necessário coletar uma a quantidade muito superior do vegetal para garantir o rendimento desejado do óleo, já que grande parte do peso inicial das folhas coletadas (63%) corresponde à massa de água presente.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS PARTES AÉREAS DE *Liquidambar styraciflua*

5.2.1 Descrição morfológica de *Liquidambar styraciflua*, L., Altingiaceae

A morfologia das folhas e da casca está de acordo com a descrição de Lorenzi (2003). O autor descreve *L. styraciflua* como árvore caducifolia, monóica, de 20-25m de altura, de tronco ereto (Figura 15), com casca pardo-acizentada nas plantas jovens, mais escura e muito fendida longitudinal e transversalmente nas plantas adultas (Figuras 16 e 17). A ramagem está disposta de maneira a formar copa cônica ou piramidal (Figuras 15, 18 e 19). As folhas são simples, aglomeradas nas extremidades dos ramos, alternas, com pecíolo longo, palmatilobadas, com 5-7 lobos agudos, verde-brilhantes e de margens serrilhadas, com cerca de 6-12 cm de comprimento (Figuras 13, 14 e 20) e com evidência macroscópica da presença de tricomas na face abaxial das folhas, com maior concentração na região de inserção do pecíolo e início da nervura de maior porte (Figura 21). A morfologia das partes aéreas em estudo também encontram-se em conformidade com as descrições morfológicas referentes à família, gênero e espécie, expostas nos itens 3.3 e 3.4.

A média obtida a partir da mensuração de 42 folhas resultou em 9,28 cm de comprimento e 11,05 cm de largura (Figuras 13 e 14)

Ainda de acordo com Lorenzi (2003), as inflorescências masculinas e femininas na espécie *L. styraciflua* encontram-se separadas na mesma planta e são terminais, globosas, formadas entre setembro e outubro.

Os frutos, por sua vez, produzidos em grande número, são do tipo cápsula globosa e epinescente (Figuras 22 e 23), arranjadas em uma infrutescência em forma de pequenas esferas (cabeças). Quando maduras, estas se abrem, lançando uma grande quantidade de sementes pequenas e aladas, com grande capacidade de dispersão pelo vento (GUTTENBERG, 1952; LORENZI, 2003).



FIGURA 13 – EXEMPLO DE MEDIDA DO COMPRIMENTO DE FOLHA UTILIZADA NO CÁLCULO DAS MÉDIAS DAS DIMENSÕES



FIGURA 14 - EXEMPLO DE MEDIDA DE LARGURA DE FOLHA UTILIZADA NO CÁLCULO DAS MÉDIAS DAS DIMENSÕES



FIGURA 15 - ASPECTO GERAL DA ÁRVORE DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Nakashima (2011)



FIGURA 16 – ASPECTO GERAL DO TRONCO DA ÁRVORE DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Nakashima (2011)



FIGURA 17 - DETALHE DAS CASCAS DO TRONCO DA ÁRVORE DE *Liquidambar styraciflua*.
FONTE: Nakashima (2011)



FIGURA 18 - DETALHE DA COPA E ASPECTO DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Nakashima (2011)



FIGURA 19 - ASPECTO GERAL DA COPA DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Nakashima (2011)



Figura 20 – ASPECTO DA FACE ABAXIAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*, COLETADAS NO PERÍODO DO OUTONO
FONTE: Nakashima (2011)



Figura 21 – EVIDÊNCIA MACROSCÓPICA DA PRESENÇA DE TRICOMAS NA FACE ABAXIAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Nakashima (2011)



Figura 22 – ASPECTO DO FRUTO SECO DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Nakashima (2011)



Figura 23 – ASPECTO DO FRUTO VERDE DE *Liquidambar styraciflua*
Fonte: Nakashima (2011)

5.2.2 Descrição anatômica das folhas de *Liquidambar styraciflua*

De acordo com Farias (2010) a identificação dos caracteres botânicos microscópicos exige a preparação adequada do material. O preparo das lâminas pode ser realizada a partir de drogas inteiras ou de material fragmentado, por meio de cortes histológicos, sendo possível, ainda, realizar a análise a partir do próprio pó da droga. Frequentemente, preconiza-se também a realização de reações histoquímicas, as quais permitem a caracterização de certos grupos de constituintes químicos auxiliares na identificação das estruturas microscópicas.

Desta forma, as diversas microtécnicas realizadas no presente trabalho visaram identificar e verificar possíveis marcadores para os órgãos vegetais analisados.

Para realizar a discussão das estruturas anatômicas descritas para a espécie *L. styraciflua*, de forma comparativa à espécies de parentes próximos, levou-se em consideração as informações pertinentes em nível de família, considerando a primeira classificação proposta para a espécie, como pertencente à família Hamamelidaceae, e também com dados da família Altingiaceae, em que atualmente se encontra classificada. De forma ainda mais restritiva, foram consideradas as informações relativas ao gênero *Liquidambar*, a que pertence. Os resultados encontrados, portanto, estão contemplados nos itens a seguir.

5.2.2.1 Epiderme

A epiderme das folhas de *L. styraciflua* corresponde a um tecido com uma única camada de células em ambas as faces, caracterizando-se, portanto, como uniestratificada. Em secção transversal são observadas células com formatos arredondados a ovalados, de diferentes tamanhos, sendo as células da face adaxial de maior tamanho que as da face abaxial (Figura 24A).

Em vista frontal, as células epidérmicas apresentam-se com formato poliédrico, com sinuosidades nas paredes anticlinais em ambas as faces (Figuras 24B, C, D e F).

As Figuras 24C, D, E e F revelam a visão frontal geral das células epidérmicas, por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em suas faces adaxial (24C e 24D) e abaxial (24E e 24F), respectivamente.

Em relação à presença de estômatos, a folha é caracterizada como anfi-hipoestomática, por apresentar estômatos em ambas as faces (Figuras 24E, 24F, 25B e 25C) e por estes estarem localizados em maior número na face abaxial (Figuras 24E, 24F e 25A). Na face adaxial, os estômatos, em menor quantidade, se localizam principalmente nas regiões próximas à nervura central (Figura 25C).

Os estômatos presentes são predominantemente do tipo paracítico², porém também se observa, em menor grau, a presença de estômatos do tipo tetracítico³, (Figura 24E, 24F e 25A). A classificação dos estômatos é dada em função do formato e arranjo das células subsidiárias no entorno dos mesmos (METCALFE e CHALK, 1950). Segundo estes autores, pode existir uma ampla variação no tamanho dos estômatos, assim como em sua frequência e distribuição.

Pela técnica de MEV pode-se verificar também a presença de estrias cuticulares, apenas na face abaxial, que fornecem um aspecto estriado à esta superfície, conforme representado na figura 25E. A parede periclinal externa apresenta-se revestida por cutícula (Figura 25F).

A epiderme das folhas de *L. styraciflua* apresenta tricomas do tipo tector, classificados como pluricelulares e unisseriados (Figura 26).

Estes tricomas encontram-se concentrados, em grande número, na face abaxial da folha, localizados na porção mais próxima à região do pecíolo (Figuras 26D, E e F) e emergindo da nervura central (Figuras 26A e 26C). Macroscopicamente, é possível verificar a presença dos tricomas nesta região das folhas (Figura 21).

² Estômatos acompanhados em ambos os lados por um ou mais células subsidiárias paralelas ao eixo longitudinal do poro e das células-guarda (METCALFE; CHALK, 1950).

³ Estômatos com quatro anéis de células subsidiárias (METCALFE; CHALK, 1950).

A análise ultraestrutural a partir da MEV permitiu a classificação precisa da morfologia dos tricomas. A Figura 26C destaca a base dos tricomas e como estes emergem da nervura central, auxiliando na sua classificação.

Os tricomas estão presentes na face abaxial e ausentes na face adaxial (Figura 26 E).

As estruturas verificadas estão de acordo com as descrições de Metcalfe e Chalk (1950). De acordo com os autores, na família Hamamelidaceae, composta de árvores e arbustos, a folha é sempre dorsiventral, os tricomas são quase que exclusivamente não-glandulares, na maior parte tufados ou estrelados, frequentemente com paredes espessas e lúmen estreito. Os estômatos, confinados na face abaxial, são rubiáceos, com uma ou mais células subsidiárias em ambos os lados do poro.

5.2.2.2 Mesofilo

O mesofilo das folhas é dorsiventral, composto, em geral, por duas camadas de parênquima clorofiliano paliçádico, característico de *Liquidambar*, conforme Metcalfe e Chalk (1950), e por parênquima clorofiliano lacunoso, com mais de um extrato de células e com amplos espaços intercelulares (Figura 27A, 27B e 27H). Ocorre na região do mesofilo a presença de idioblastos contendo cristais do tipo drusas (Figuras 27B, 27C e 27G), especialmente na região do parênquima lacunoso. Foi verificada também a presença de outros compostos, que são substâncias ergásticas provenientes do metabolismo do vegetal, como os compostos fenólicos, revelados nos testes histoquímicos.

Segundo Metcalfe e Chalk (1950), no gênero *Liquidambar* os feixes vasculares das nervuras estão freqüentemente rodeados por esclerênquima, e acompanhados por pequenos cristais. Ocorre também a presença de cristais agrupados na região do mesofilo.

Em alguns gêneros da família Hamamelidaceae, porém, é relatada a presença de idioblastos esclerenquimáticos na região do mesofilo. Estudo realizado

por Rao e Bhupal (1974), verificou em diversas espécies desta família a tipologia foliar em relação à presença ou não de esclereídes no mesofilo. Os estudos sugeriram que os tipos de esclereídes presentes, em poucos Taxas, podem ser utilizados como ferramentas importantes na sistemática, orientando os critérios de divisão taxonômica. Neste estudo, dos vários Taxas examinados, esclereídes de um tipo ou o outro, em várias combinações dentro do mesofilo, puderam ser relatados, ou então, sua ausência constatada. Estudos detalhados têm demonstrado que a tipologia dos esclereídes são úteis em destacar uma espécie ou grupo de espécies a um gênero. De acordo com o autor, desta forma, a ausência destas estruturas em todas as espécies de Liquidamberoideae, levou à conclusão de que pode haver uma justificativa para a remoção de Liquidambar e Altingia de Hamamelidaceae e realocação a uma família independente, Altingiaceae.

O mesofilo das folhas de *L. styraciflua* possui, ainda, cavidades que acumulam e secretam o óleo essencial nesta espécie aromática (Figura 27D, 27E e 27F), em conformidade com as descrições de Metcalfe e Chalke (1950), que relatam a presença destas estruturas secretoras no interior do xilema (Figura 27E).

De acordo com Evert (2006), os óleos essenciais são formados por células especiais e excretados por intermédio de cavidades intercelulares. Óleos e gorduras podem ser identificados por visualização da coloração quando são tratados com Sudam III ou IV.

Segundo Dickison (2000), os espaços secretores internos, contendo óleos, são usualmente descritos como cavidades ou canais de comprimento indeterminado. Estas cavidades secretoras são revestidas por células glandulares especializadas e contém um amplo espaço, repleto de secreção, possuindo possíveis origens lisígenas, esquizógenas ou esquisolisígenas. Estudos ontogênicos, neste sentido, com a espécie em questão, podem elucidar como ocorre a formação destas cavidades secretoras de óleo, estando além dos objetivos deste trabalho.

Nos vegetais, segundo Glória e Guerreiro (2006), os óleos voláteis podem atuar na atração de agentes polinizadores, como no caso dos osmóforos, que conferem fragrância às flores e, também, repelir os insetos, por ação inseticida e dissuasiva alimentar, reduzindo a herbivoria.

5.2.2.3 Nervura Central

As células epidérmicas da nervura central, em vista frontal, apresentam-se achatadas e com formato retangular, evidenciadas pela análise ultra-estrutural por MEV (Figura 28E).

Em corte transversal, observam-se, nesta estrutura, regiões de colênquima subepidérmicas em ambas as faces e a disposição do feixe vascular colateral (Figura 28A e 28D). De acordo com Metcalfe e Chalk (1950), o sistema vascular das veias maiores das folhas forma um anel de xilema e floema em *Liquidambar*, assim como em *Altingia*.

Assim como no mesofilo, há na nervura central das folhas a presença de glândulas secretoras de óleo essencial, de maior porte em relação aos do mesofilo (Figura 28A). De forma semelhante, ocorre também nesta região a presença de idioblastos contendo cristais do tipo drusas, presentes, neste caso, na região do colênquima (Figura 28B).

As Figuras 28C e 28F demonstram o aspecto geral das células da nervura central das folhas, na face abaxial, em contraste com as demais células, bem como evidencia a inserção dos tricomas presentes, anteriormente classificados.

Nas folhas, células preenchidas com mucilagem tanífera ocorrem na espécie *L. styraciflua* (METCALFE; CHALK, 1950), o que pode ser constatado pela utilização do corante policromático azul de toluidina, que se cora em diferentes padrões de coloração de acordo com o tipo de substância presente, como é o caso de mucilagens, em tons violáceos (Figura 28A).

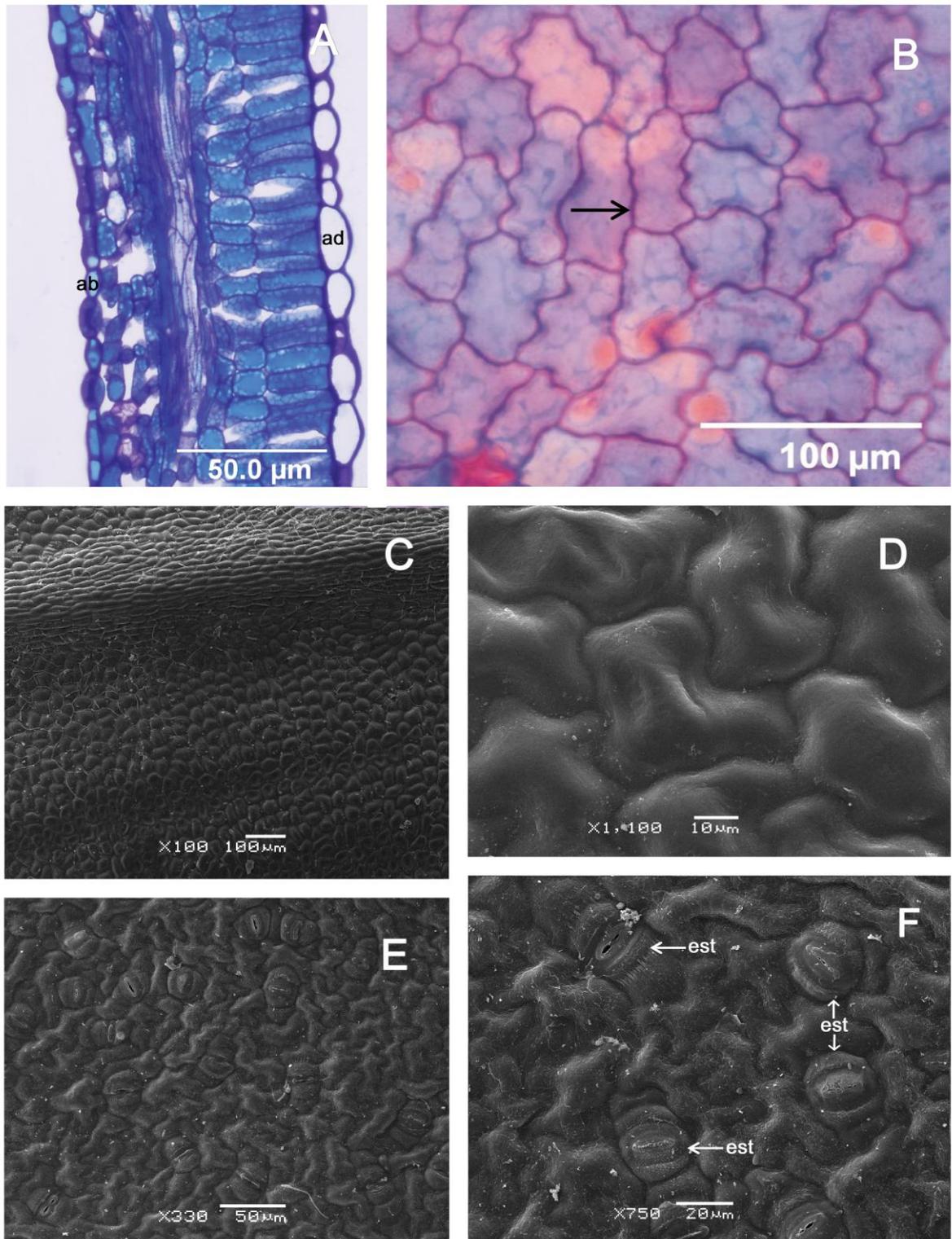


FIGURA 24 - CARACTERIZAÇÃO DA EPIDERME DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*. **A.** SECÇÃO TRANSVERSAL DAS FOLHAS EVIDENCIANDO A EPIDERME DAS FACES ADAXIAL (ad) E ABAXIAL (ab). **B.** VISTA FRONTAL DAS CÉLULAS DA EPIDERME ADAXIAL. **C e D.** VISÃO GERAL DAS CÉLULAS DA EPIDERME DA FACE ADAXIAL. **E e F.** VISÃO GERAL DAS CÉLULAS DA EPIDERME DA FACE ABAXIAL, COM A PRESENÇA DE GRANDE NÚMERO DE ESTÔMATOS (est).

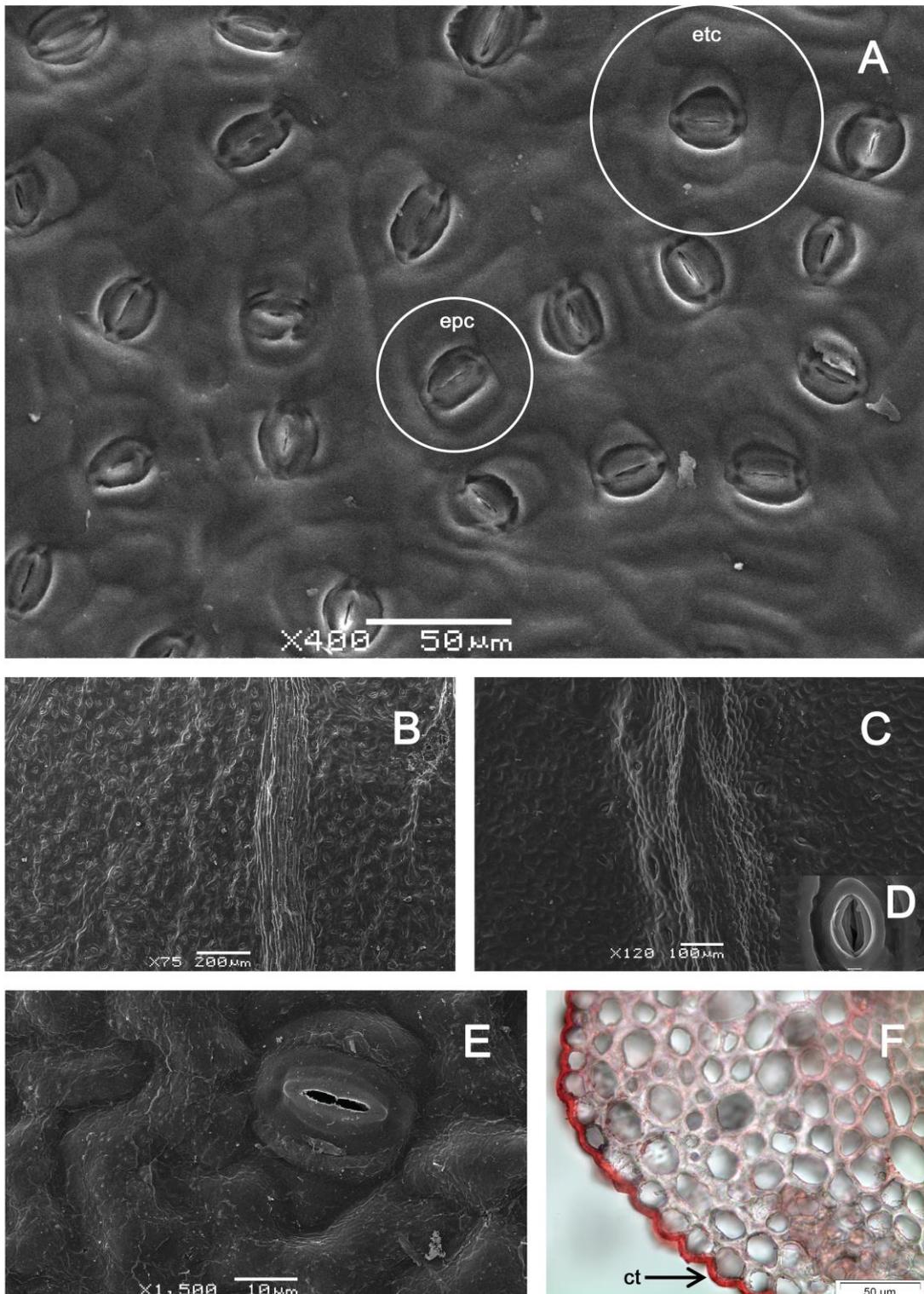


FIGURA 25 - CARACTERIZAÇÃO DA FOLHA EM RELAÇÃO AOS ESTÔMATOS PRESENTES E CARACTERÍSTICAS DA CUTÍCULA. A. PRESENÇA DE ESTÔMATOS NA FACE ABAXIAL DA FOLHA; EVIDENCIADA A PRESENÇA DE ESTÔMATOS PARACÍTICOS (epc) E TETRACÍTICO (etc). B. ESTÔMATOS EM GRANDE NÚMERO NA FACE ABAXIAL DA FOLHA. C. ESTÔMATOS, EM MENOR NÚMERO, PRESENTES NA FACE ADAXIAL DA FOLHA. D. DETALHE DE UMA FENDA ESTOMÁTICA. E. ESTRIAS CUTICULARES PRESENTES NA FACE ABAXIAL DA FOLHA. F. CUTÍCULA (ct) EVIDENCIADA PELA UTILIZAÇÃO DO REAGENTE SUDAM III.

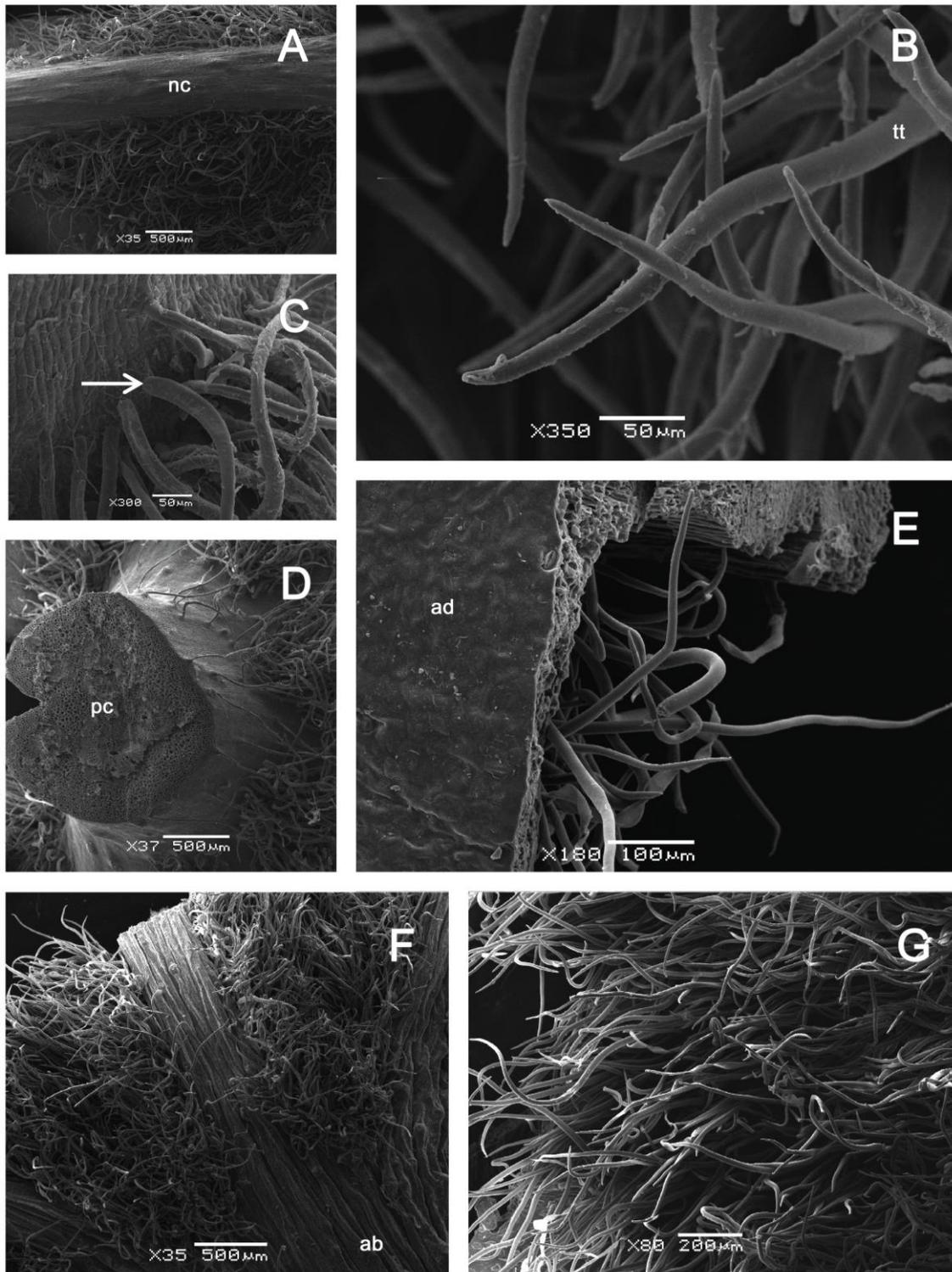


FIGURA 26 - CLASSIFICAÇÃO DOS TRICOMAS PRESENTES NA FOLHA DE *Liquidambar styraciflua*. **A.** TRICOMAS EMERGINDO DA NERVURA CENTRAL (nc). **B.** DETALHES DOS TRICOMAS TECTORIOS (tt) PLURICELULARES E UNISSERIADOS. **C.** INSERÇÃO DA BASE DOS TRICOMAS NA NERVURA CENTRAL, INDICADA POR SETA. **D.** GRANDE NÚMERO DE TRICOMAS PRESENTES NA REGIÃO DA FOLHA PRÓXIMA AO PECÍOLO (pc). **E.** TRICOMAS PRESENTES NA FACE ABAXIAL E AUSENTES NA FACE ADAXIAL (ad). **F.** VISÃO GERAL DO GRANDE NÚMERO DE TRICOMAS PRESENTES NA FACE ABAXIAL (ab), EMERGINDO DA NERVURA CENTRAL, NA FACE ABAXIAL. **G.** TRICOMAS TECTORIOS EM DETALHE.

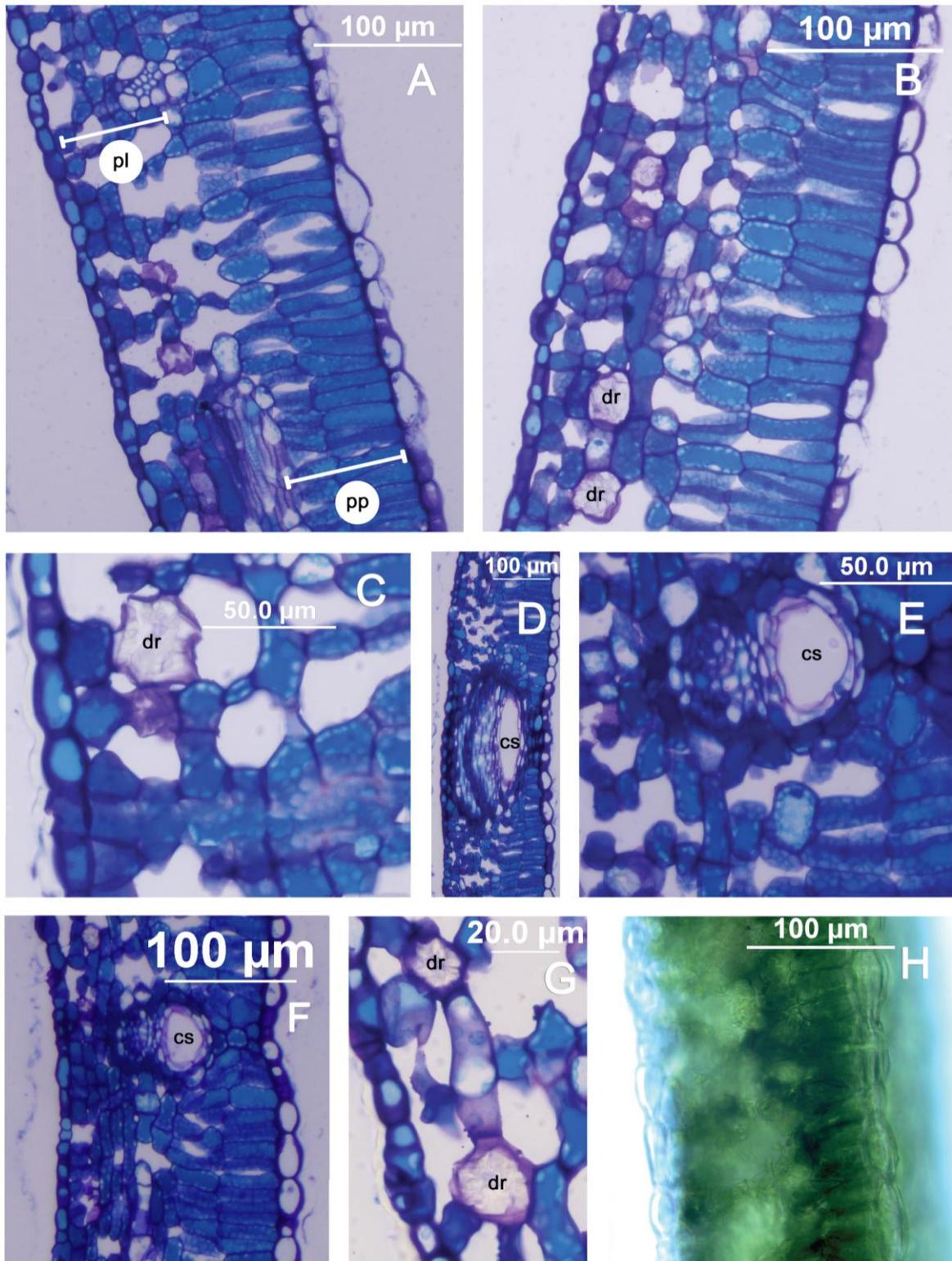


FIGURA 27 - CARACTERIZAÇÃO DO MESOFILO DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*. **A.** SECÇÃO TRANSVERSAL DO MESOFILO, EVIDENCIANDO OS PARÊNQUIMAS PALIÇÁDICO (pp) E LACUNOSO (pl). **B.** MESOFILO EM SECÇÃO TRANSVERSAL, SENDO EVIDENCIADOS IDIOBLASTOS CONTENDO DRUSAS (dr). **C e G.** DETALHE DA REGIÃO DO PARÊNQUIMA LACUNOSO CONTENDO IDIOBLASTOS COM DRUSAS (dr). **D, E e F.** CAVIDADE SECRETORA DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua* PRESENTES NA REGIÃO DO MESOFILO. **H.** MESOFILO EVIDENCIADO A PARTIR DE CORTE À FRESCO, SEM COLORAÇÃO.

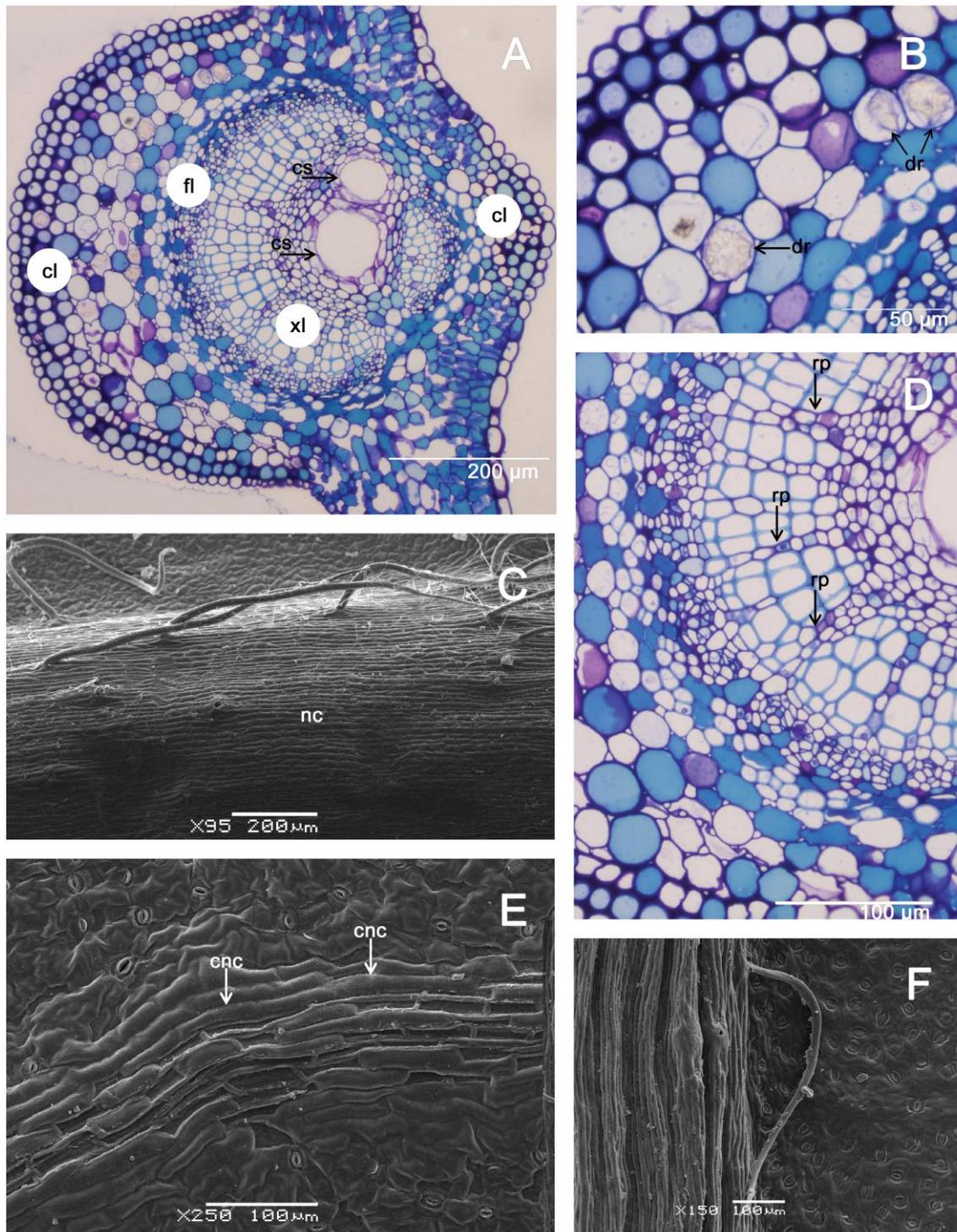


FIGURA 28 - CARACTERIZAÇÃO DA NERVURA CENTRAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*. **A.** VISÃO GERAL EM SECÇÃO TRANSVERSAL, EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE CAVIDADES SECRETORAS DE ÓLEO ESSENCIAL (gs), REGIÕES DE COLÊNQUIMA SUBEPIDÉRMICAS (cl) E DO FEIXE VASCULAR: XILEMA (xl) E FLOEMA (fl). **B.** REGIÃO DE COLÊNQUIMA CONTENDO IDIOBLASTOS COM DRUSAS (dr). **C.** VISÃO GERAL DA NERVURA CENTRAL (nc) POR MEV. **D.** DETALHE DO FEIXE VASCULAR COLATERAL E DOS RAIOS PARÊNQUIMÁTICOS (rp) DO XILEMA, INDICADOS POR SETA. **E.** DETALHE DAS CÉLULAS DA NERVURA (cnc) CENTRAL, ACHATADAS E RETANGULARES, POR MEV, NA FACE ABAXIAL. **F.** DETALHE DE TRICOMA EMERGINDO DA NERVURA CENTRAL, NA FACE ABAXIAL.

5.2.3 Descrição anatômica do caule de *Liquidambar styraciflua*

O caule de *L. styraciflua*, característico de espécies dicotiledôneas, apresenta crescimento secundário, com regiões de câmbio, floema secundário e xilema secundário (Figuras 29B, 29G, 29H, 30A e 30C).

De acordo com Evert (2006), na espécie *L. styraciflua* os vasos estão distribuídos como poros difusos. De acordo com o autor, a palavra poros é utilizada por anatomistas para se referir ao surgimento dos vasos nas secções transversais. Desta forma, lenhos com poros difusos são lenhos em que os vasos, ou poros, são uniformes em tamanho e distribuição, através de um anel de crescimento.

Em proximidade à região do xilema, em secção transversal, ocorre a formação de ductos que secretam resina (Figuras 29B, 29C, 30A, 30B).

Metcalf e Chalk (1950), relatam que estruturas secretoras ocorrem na região de protoxilema de *Liquidambar*, cada qual circundada por pequenos epitélios celulares.

Conforme Bogle (1986), a presença de ductos resiníferos associados aos feixes vasculares de caules e folhas é encontrada na família Altingiaceae e também na família Hamamelidaceae.

De acordo com Dickison (2000), ductos secretores são uma categoria de estruturas secretoras que incluem ductos de resina e ductos de gomas. Comumente, este termo se refere a ductos alongados contendo uma secreção derivada das células epiteliais ao longo do ducto.

Ductos de resina aparecem como característica constante nos sistemas adaxial e radial (EVERT, 2006). Ductos axiais de resina estão comumente localizados na transição de lenho inicial e tardio ou porções mais desenvolvidas dos anéis de crescimento (WIMMER *et al.*, 1999). Tipicamente, ductos de resina surgem como um espaço intercelular esquisógeno, por separação de células parenquimáticas derivadas do câmbio vascular. Cada ducto radial origina-se para um ducto axial e é contínuo do xilema para o floema, embora os ductos não possam ser abertos na região cambial de espécies com finas paredes celulares (CHATTAWAY, 1951; WERKER; FAHN, 1969; WODZICKI; BROWN, 1973).

Segundo Glória e Guerreiro (2006), a importância das resinas para os vegetais reside no bloqueio de ferimentos, tendo papel relevante na defesa contra patógenos, e, assim como os óleos voláteis, podem afastar os insetos, reduzindo a herbivoria.

As figuras 31A e 31 B revelam o aspecto geral do caule em secção longitudinal. Delimitando as regiões de xilema e floema existe uma faixa cambial, e, após a região do floema, no sentido de formação do súber, ocorre uma bainha esclerenquimática bem delimitada (Figura 29E, 30D, 30E e 31D). Na sequência, na região do parênquima cortical, há a presença de idioblastos contendo drusas (Figuras 29A, 29F, 29G e 29H e 31C), grãos de amido (Figuras 30F e 30G) e substâncias fenólicas.

De acordo com Dickson (2000) entre as mudanças mais dramáticas que ocorrem durante a transformação do alburno em cerne estão o acúmulo de uma grande diversidade de substâncias, como taninos, óleos essenciais, gomas, polifenóis aromáticos e sais de ácidos orgânicos. Estes materiais se depositam no lúmen e paredes celulares do cerne de algumas espécies, produzindo um xilema de cor escura, com um odor característico, que pode inclusive fornecer uma resistência e ação repelente contra insetos.

Segundo Metcalfe e Chalk (1950), células com conteúdo não identificado, provavelmente taniníferas ou mucilaginosas estão presentes em número variável nos tecidos não lignificados de espécies em Hamamelidaceae, conforme pode ser constatado nos cortes corados com azul de toluidina no caule de *L. styraciflua* (Figuras 29A, B e E).

De acordo com Evert (2006), o floema secundário de angiospermas apresenta uma maior diversidade de arranjo celular e maiores variações nos componentes do que o floema de coníferas. Elementos de tubo crivado, células-companheiras e células parenquimáticas são elementos constantes do sistema axial, enquanto fibras podem estar ausentes. Ambos os sistemas podem conter esclereídes, elementos secretores de origens esquizógena e lisígena, laticíferos e vários idioblastos, que são células individualizadas, com conteúdos especializados, como mucilagem, óleo, taninos e cristais. A formação de cristais é comum e pode ocorrer em células do parênquima, em células do raio parenquimático ou em células

de esclerênquima. Os cristais podem ser abundantes e contribuir como um mecanismo de suporte mecânico à casca, resultando em uma casca dura mesmo na ausência de esclerênquima.

Cristais, na espécie em estudo, encontram-se em grande número na região de parênquima cortical, próximos à bainha esclerenquimática (Figuras 29E, 29F e 29H).

A região da periderme, como tecido de revestimento, é representada em detalhe na Figura 29D, apresentando-se suberizada (Figura 31F).

No gênero *Liquidambar*, e em outras espécies de Hamelidaceae, no caule jovem a cortiça geralmente surge na subepiderme. O xilema e floema, nos entrenós dos caules jovens, constituem cilindros atravessados por raios unisseriados ou bisseriados. O xilema inclui numerosos pequenos vasos angulares, raramente superiores a 25 micra de diâmetro, providos com placas de perfuração escalariformes, comumente anastomizadas, fornecendo aspecto de placas parcialmente reticuladas (Figuras 31E, 32D, 32E e 32F). Pequenos canais secretores medulares (Figuras 29B e 30B) ocorrem no caule das espécie em *Altingia* e *Liquidambar* e não em outros gêneros, o que os particulariza, neste aspecto, dentro da família Hamamelidaceae (METCALFE E CHALK, 1950).

5.2.4 Técnicas complementares para descrição anatômica das partes aéreas de *Liquidambar styraciflua*

A técnica de maceração permitiu evidenciar a características das células da epiderme do limbo e da nervura central das folhas, além do tipo de estômatos presentes (Figuras 32A, B e C).

A análise do macerado do caule revelou a presença de elementos de vaso com placas de perfuração do tipo escalariformes, que podem ser úteis como marcadores da espécie em questão (Figuras 32D a F). De acordo com Dickison (2000), uma placa de perfuração escalariforme é uma placa composta, consistindo de aberturas alongadas, paralelas, separadas por uma ou muitas (mais de 100)

barras ramificadas ou não ramificadas. Entre elementos de vasos com placas de perfuração escalariformes, as perfurações individuais estão delimitadas pelo contorno original da parede. Estas placas são características da família Hamamelidaceae, assim como de algumas outras famílias, como Betulaceae, Hydrangeaceae, Magnoliaceae e Theaceae. Contrastam com placas de perfuração simples, tipo mais comum verificado entre as angiospermas, cuja área de parede terminal tipicamente exhibe aberturas largas, simples, circulares ou elípticas, que frequentemente deixam apenas um aro estreito de parede primária remanescente.

A maior parte dos elementos de vasos possuem ou exclusivamente placas de perfuração simples ou exclusivamente placas de perfuração escalariformes, embora alguns elementos possam desenvolver uma placa simples em uma parede terminal e uma placa de perfuração escalariforme na outra. Apenas raramente este padrão de combinação ocorre entre as paredes das extremidades de dois membros de vasos adjacentes, o que foi descrito apenas para algumas famílias, como Verbenaceae e Asteraceae (DICKISON, 2000).

É importante ressaltar que, frequentemente, o material que chega à indústria não está em sua forma íntegra, mas sim rasurada ou na forma de pó. De acordo com Farias (2010), a análise de amostras pulverizadas é mais complexa, exigindo o reconhecimento de estruturas microscópicas características e diferenciais, complementada com as análises químicas.

Importantes considerações, neste sentido, são fornecidas por Dickison (2000). De acordo com o autor, drogas úteis de origem vegetal, derivadas ou extraídas a partir de tecidos vegetais, dependem da identificação correta das plantas referentes e das exatas descrições das estruturas vegetais. Importantes avanços ocorreram durante o século 19 e início do século 20 na indústria farmacêutica e na farmacognosia, culminando com descrições histológicas detalhadas de drogas. Ainda hoje, é rotineira a análise de matérias-primas obtidas de plantas produtoras de drogas, submetidas à observação microscópica, sendo especialmente importante quando se trata de tecidos vegetais em pó ou seccionados. O autor ressalta que, além de exame macroscópico e da utilização de testes químicos diversos, a avaliação microscópica é essencial para a correta identificação da planta em pós e também para a análise quantitativa de adulterantes, que pode ocorrer, também, pela

completa substituição de um tecido da planta para outra. Quando uma parte da planta encontra-se em pó, poucos caracteres morfológicos, ou até mesmo nenhum, encontram-se disponíveis para serem utilizados na identificação do medicamento, pois as células e os tecidos tornam-se variadamente dissociados e divididos com a maceração. Nestes casos, a preparação deve ser caracterizada usando a evidência fornecida por células individuais, ou seja, por meio de elementos traqueais e fibrosos, esclereídes, células epidérmicas das folhas, tricomas, cristais ou corpos de sílica, e grãos de amido.

Desta forma, a técnica de maceração realizada com os materiais botânicos mostrou-se eficaz para determinar características a serem verificadas para reconhecimento da espécie *L. styraciflua*.

Nos testes histoquímicos, a partir da utilização de diferentes reagentes, foi possível evidenciar e confirmar a presença de diversas classes de compostos presentes no vegetal, previamente identificados nas análises fitoquímicas de identificação (item 5.5.1) como polifenóis, amido, substâncias graxas e células de gordura. Trata-se de um método simples, rápido e de menor custo, que pode auxiliar na identificação da espécie em questão.

Pela reação com o cloreto férrico, constatou-se a presença de substâncias fenólicas no mesofilo e na nervura central, na região dos raios parenquimáticos e na região externa ao floema, próxima ao colênquima. Já com a utilização do reagente Sudam III, nas folhas, foi possível visualizar a cutícula e células com conteúdo de gordura, como as que contêm óleo essencial. A presença de amido foi verificada através da reação com o lugol, nas folhas e caule. No caule há também intensa presença de substâncias fenólicas, na região dos raios parenquimáticos, parênquima cortical e parênquima medular.

De acordo com Farias (2010), os estudos botânicos têm como objetivo a identificação inequívoca de uma espécie vegetal, através da análise de características anatômicas e morfológicas procurando destacar aquelas consideradas peculiares de uma determinada espécie e que, em última instância, estejam presentes na matéria prima vegetal. Da mesma forma, é importante o estabelecimento de características botânicas comparativas que permitam detectar a presença de uma ou mais espécies adulterantes.

Segundo Schenkel e colaboradores (2010), na era Lineana as características florais eram as mais utilizadas e mais importantes nos sistemas de classificação. Nos sistemas atuais, além das estruturas reprodutivas e vegetativas, as características anatômicas, embriológicas e químicas são consideradas em mesmo nível de importância na delimitação dos táxons.

Portanto, as diversas técnicas atuais disponíveis para análise em morfologia vegetal proporcionam aos estudiosos boas ferramentas para análise de materiais vegetais processados. No âmbito farmacêutico, visando determinar parâmetros de identidade e qualidade da potencial droga vegetal, podem ser utilizadas técnicas simples e menos dispendiosas, como colorações em cortes à mão livre e análise de partes dos órgãos vegetais fragmentados, utilizando a técnica de maceração, por exemplo, ou ainda técnicas como infiltração e inclusão em polietilenoglicol, aplicadas neste trabalho, e, para uma análise mais detalhada, pode-se utilizar também técnicas mais diferenciadas como inclusão e infiltração em parafina e resina. De acordo com a finalidade desejada, é possível utilizar a técnica experimental que conduza aos melhores resultados.

A caracterização morfoanatômica, por meio da descrição das estruturas e do estabelecimento de marcadores de valor taxonômico, representa uma importante ferramenta visando o reconhecimento da espécie vegetal em estudo, e, em conjunto com as características verificadas nos testes histoquímicos e fitoquímicos, podem fornecer subsídios à sua identificação e ao controle de qualidade e pureza.

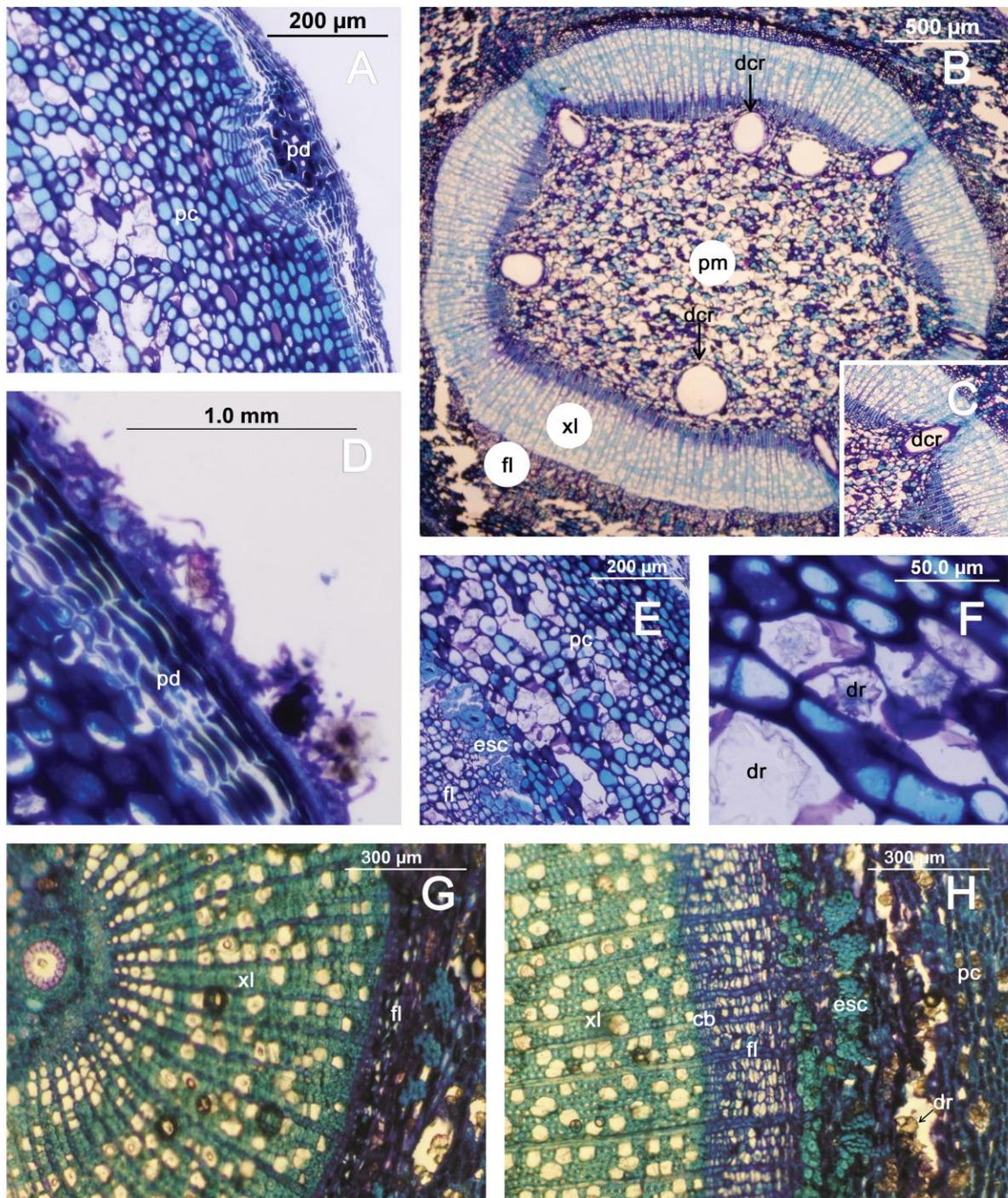


FIGURA 29 - CARACTERIZAÇÃO DO CAULE DE *Liquidambar styraciflua*. SECÇÕES TRANSVERSAIS. **A.** DETALHE DA REGIÃO DA PERIDERME (pd) E DO PARÊNQUIMA CORTICAL (pc). **B.** VISÃO GERAL DA SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE, EVIDENCIANDO REGIÕES DE PARÊNQUIMA MEDULAR (pm) COM A PRESENÇA DE DUCTOS RESINÍFEROS (dcr) E AS REGIÕES DE XILEMA (xl), CÂMBIO, FLOEMA (fl) E PARÊNQUIMA CORTICAL. **C.** DETALHE DE DUCTO RESINÍFERO (dcr). **D.** DETALHE DA REGIÃO DA PERIDERME (pd). **E.** DETALHE DA REGIÃO DO PARÊNQUIMA CORTICAL (pc), DA BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (esc) E FLOEMA (fl). **F.** DETALHE DO PARÊNQUIMA CORTICAL COM IDIOBLASTOS CONTENDO DRUSAS (DR). **G e H.** DETALHE DA REGIÃO DO XILEMA (xl), EVIDENCIANDO OS ANÉIS DE CRESCIMENTO E RAIOS PARENQUIMÁTICOS, E REGIÕES DE CÂMBIO (cb), FLOEMA (fl), PARÊNQUIMA CORTICAL (pc) COM DRUSAS (dr) E ESCLERÊNQUIMA (esc).

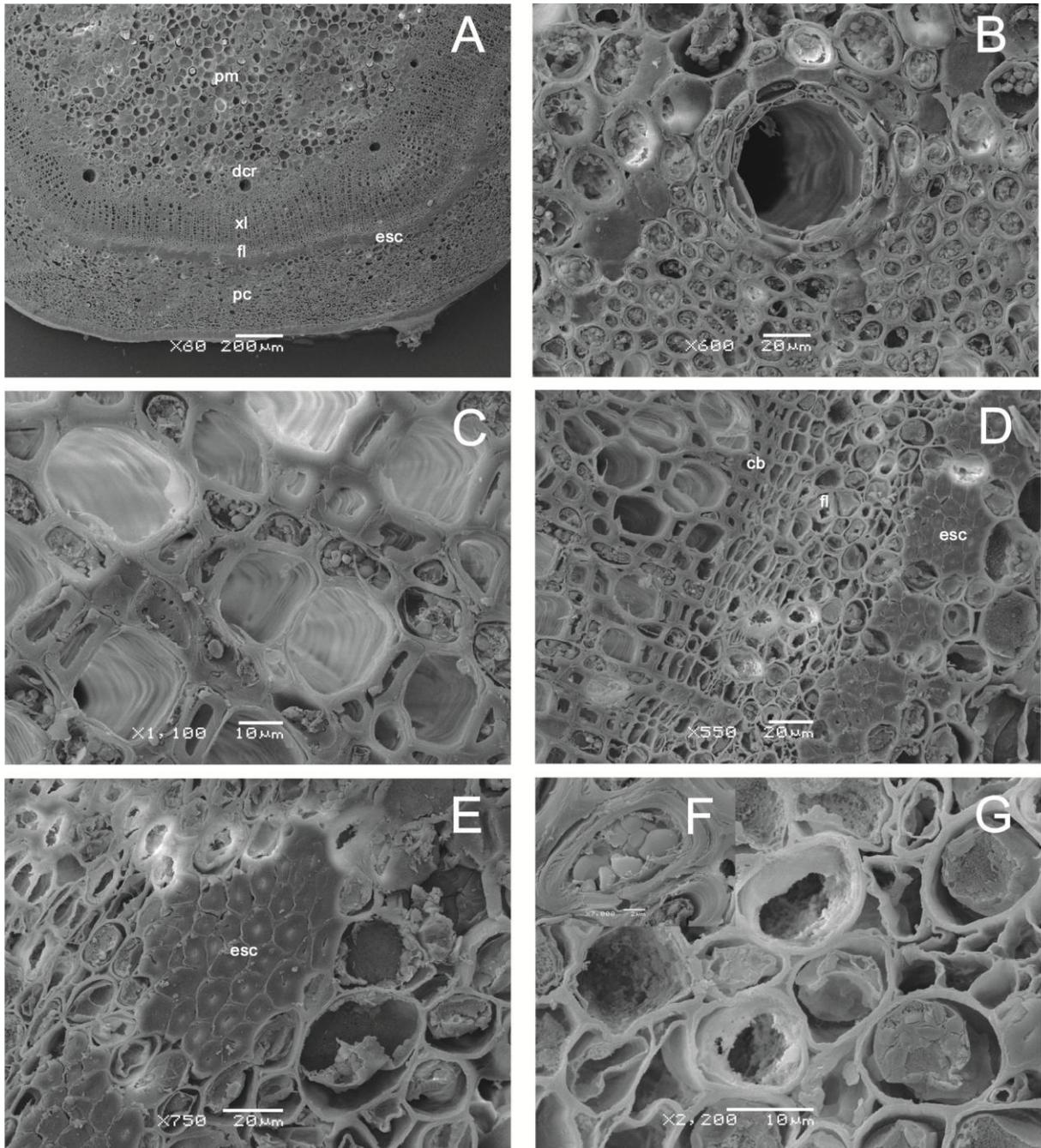


FIGURA 30 - ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DO CAULE DE *Liquidambar styraciflua* POR MEV A PARTIR DE SECÇÕES TRANSVERSAIS DO MESMO. **A.** VISÃO GERAL DO CAULE, COM A PRESENÇA DE DUCTOS RESINÍFEROS (dcr), PARÊNQUIMAS MEDULAR (pm) E CORTICAL (pc), XILEMA (xl), FLOEMA (fl) E ESCLERÊNQUIMA (esc). **B.** DETALHE DE UM DUCTO RESINÍFERO. **C.** CAULE COM REGIÃO DE XILEMA E ELEMENTOS DE VASO. **D.** CAULE COM REGIÃO DE CÂMBIO (cb), FLOEMA (fl) E ESCLERÊNQUIMA (esc). **E.** DETALHE DAS FIBRAS DO FLOEMA E DA REGIÃO DE ESCLERÊNQUIMA (esc). **F.** DETALHE DE CÉLULA DO PARÊNQUIMA COM AMIDO. **G.** DETALHE DO PARÊNQUIMA CORTICAL COM IDIOBLASTOS.

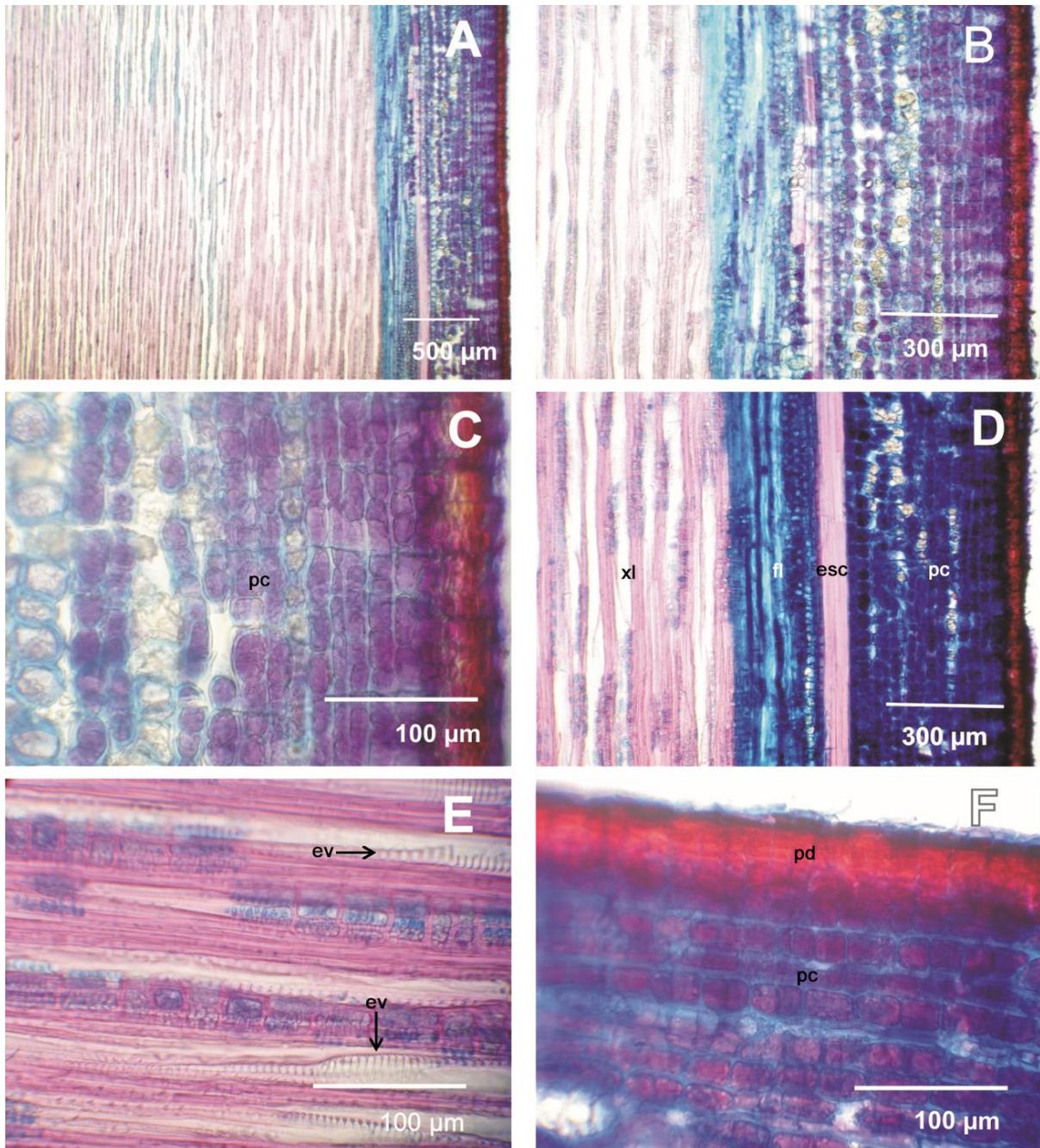


FIGURA 31 - INFILTRAÇÃO E INCLUSÃO DE CAULE DE *Liquidambar styraciflua* EM PEG 1500. CORTES LONGITUDINAIS, CORADOS EM DUPLA COLORAÇÃO COM FUCSINA 1% EM ÁGUA E AZUL DE ASTRA 1% EM ÁGUA (A, B E C) E SAFRANINA 1% EM ÁGUA E AZUL DE ASTRA 1% EM ÁGUA (D, E E F). MONTAGEM SEMI-PERMANENTE. **A e B.** VISÃO GERAL DA ESTRUTURA CAULINAR. **C e F.** DETALHE DAS CÉLULAS DA PERIDERME (pd) E DO CÓRTEX (pc), COM A PRESENÇA DE CRISTAIS DO TIPO DRUSAS. **D.** DETALHE DA BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (esc), XILEMA (xl) E FLOEMA (fl) E PARÊNQUIMA CORTICAL. **E.** PLACAS DE PERFORAÇÃO DO TIPO ESCALARIFORME DE ELEMENTOS DE VASOS DO XILEMA (ev)

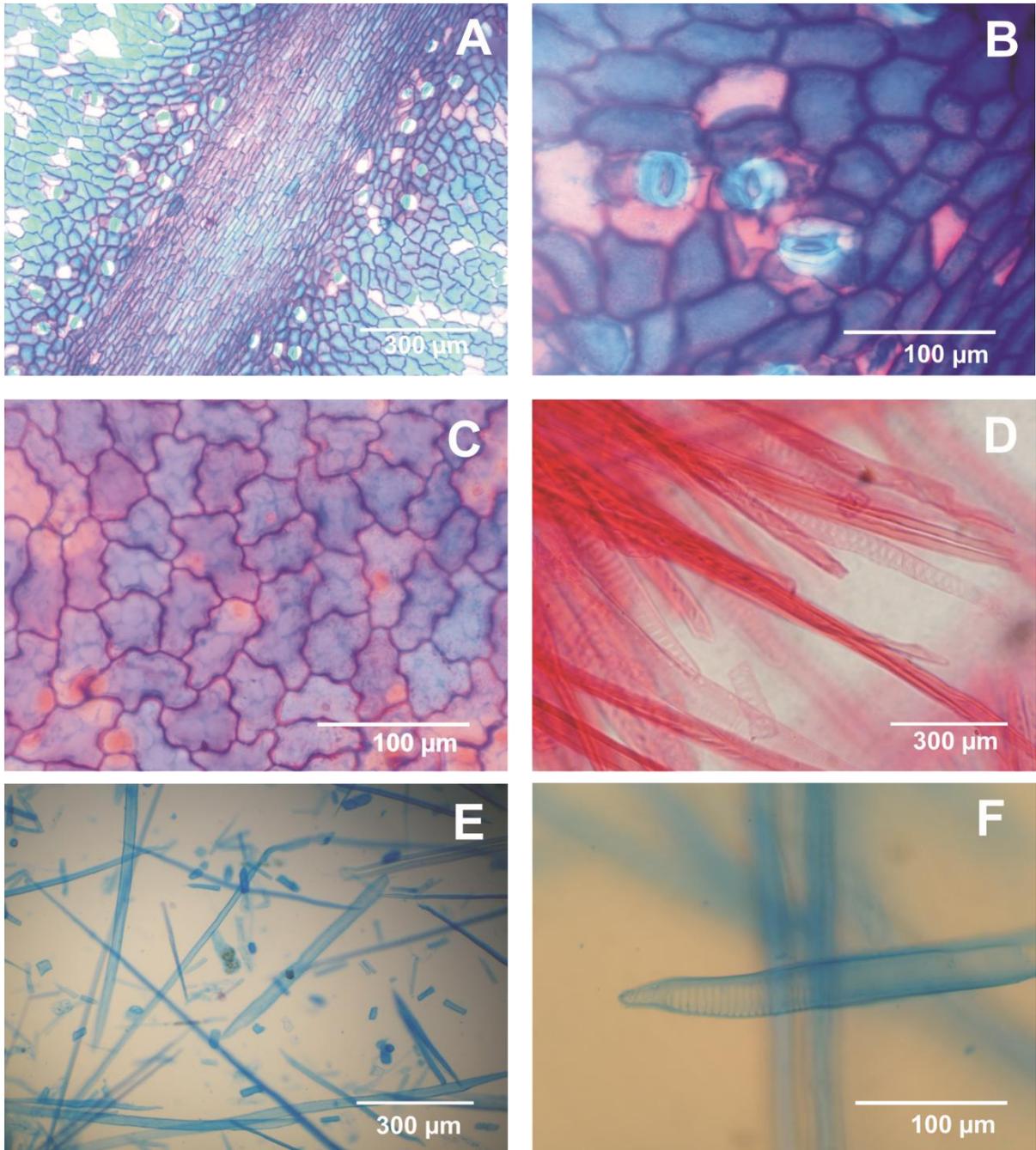


FIGURA 32 - TÉCNICA DE MACERAÇÃO APLICADA ÀS FOLHAS E CAULE DE *Liquidambar styraciflua*. COLORAÇÃO SEMI-PERMANENTE COM SAFRANINA 1% EM ÁGUA E AZUL DE ASTRA 1% EM ÁGUA (A, B, C, E E F) E COLORAÇÃO PERMANENTE COM SAFRANINA 1% : ACETATO DE BUTILA (1:1) (D) **A.** MACERADO DE FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*, EVIDENCIANDO ESTÔMATOS E NERVURA CENTRAL. **B.** MACERADO DE FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*, EVIDENCIANDO EPIDERME COM PRESENÇA DE ESTÔMATOS. **C.** MACERADO DE FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*, EVIDENCIANDO O FORMATO DAS CÉLULAS DA EPIDERME. **D e F.** MACERADO DE CAULE DE *Liquidambar styraciflua*, EVIDENCIANDO PLACAS DE PERFORAÇÃO ESCALARIFORMES. **F.** DETALHE DE PLACA DE PERFORAÇÃO ESCALARIFORME DO CAULE DE *Liquidambar styraciflua*.

5.3 AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*

Além das determinações realizadas com as partes aéreas de *L. styraciflua*, são importantes as análises que visem estabelecer parâmetros de qualidade para o óleo essencial obtido a partir das folhas desta espécie, tendo em vista seu possível emprego em diversos setores do âmbito industrial.

Portanto, visando caracterizar o óleo essencial de *L. styraciflua* da região procedente deste trabalho, assim como verificar possíveis compostos de interesse e estabelecer parâmetros que possam ser utilizados no controle de qualidade e identificação deste óleo volátil natural, foram realizados um conjunto de análises, cujos resultados estão contemplados na leitura a seguir.

A obtenção de parâmetros que permitam um controle de qualidade dos óleos essenciais é de extrema importância, tendo em vista que estes apresentam frequentemente problemas de qualidade, que podem ter origem na variabilidade da sua composição, na adulteração ou falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem. Os produtores de grande parte dos óleos voláteis comercializados, como exemplo, muitas vezes não apresentam a identificação correta da planta da qual o produto foi obtido (nome científico), a parte do vegetal que foi empregada e a procedência do mesmo (SIMÕES; SPITZER, 2010). De acordo com os autores, os seguintes procedimentos são frequentemente utilizados na falsificação dos óleos voláteis:

- Adição de compostos sintéticos, de baixo preço, tais como álcool benzílico, ésteres do ácido ftálico e até hidrocarbnetos clorados;
- Mistura do óleo volátil de qualidade com outros óleos de menor valor para aumentar o rendimento;
- Adição das substâncias sintéticas que são os compostos principais do óleo em questão;
- Falsificação completa do óleo através de misturas de substâncias sintéticas dissolvidas em um veículo inerte.

Uma indústria pode utilizar os óleos essenciais ou para o isolamento de seus constituintes que podem ser empregados a fins diversos já mencionados, ou depois

de isolados para transformá-los em novas substâncias com destinos idênticos. Estes produtos podem concorrer com os obtidos por síntese química, já que possuem aromas mais delicados e podem ser mais baratos (COSTA, 1975 PROENÇA DA CUNHA, 2005).

De acordo com Simões e Spitzer (2010), para avaliar a qualidade de um óleo volátil, de uma matéria-prima vegetal rica em óleo volátil ou de um medicamento que contenha óleo volátil, são necessárias informações analíticas em relação à identidade e a pureza do material em questão. Os autores ressaltam que, em certos casos de falsificação, estes aspectos não podem ser detectados somente com métodos que forneçam informações básicas e que, informações isoladas não permitem, por si só, afirmar com certeza a identidade de um óleo volátil. Por isso, parâmetros como densidade relativa em relação a água, índice de refração, rotação óptica, ponto de solidificação, entre outros, em conjunto, podem indicar a pureza e atestar a identidade do óleo em questão. Desta forma, se os valores medidos encontrarem-se nas faixas de dados da literatura, é possível que o material analisado não tenha sido falsificado, mas, como forma de garantir a real identidade, outros métodos devem ser utilizados, como a cromatografia gasosa, método de separação e identificação de óleos essenciais.

5.3.1 Rendimento das extrações do óleo essencial

A etapa inicial, que serviu como ponto de partida para a realização de todas as análises com o óleo essencial neste trabalho, consistiu em realizar a extração do óleo essencial por meio de um método de fácil execução, com equipamento disponível e compatível com o que pode ser realizado em âmbito industrial, que pudesse ser aplicado para o vegetal em questão. Para isto, optou-se por realizar uma hidrodestilação do material vegetal selecionado, através de um aparato de Clevenger modificado (Figura 33), conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira V edição (2010), que permitiu a obtenção de volumes de óleo essencial para as

posteriores análises, assim como permitiu a determinação dos rendimentos das extrações, pela leitura no tubo de graduação (Figura 4).

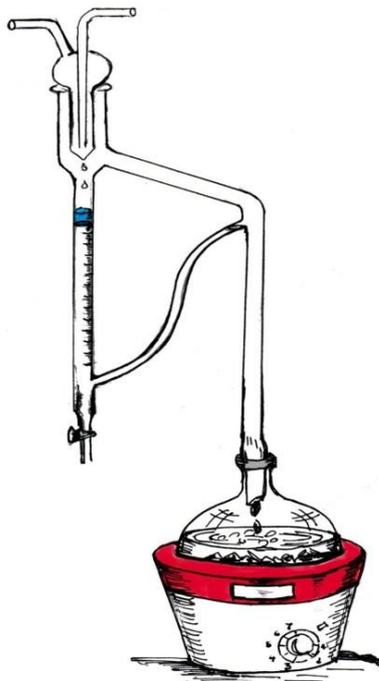


FIGURA 33 - MODELO DE APARATO DE CLEVENGER MODIFICADO UTILIZADO PARA A HIDRODESTILAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*
FONTE: Singer (2001)

De acordo com Costa (1975) e Proença da Cunha (2005), para o doseamento do conteúdo dos óleos essenciais podem ser utilizados pequenos aparelhos destilatórios, com coabação, em geral de vidro, semelhante ao utilizado neste trabalho, de modo que a essência destilada se separe num tubo de vidro graduado, onde, após decorrido o tempo conveniente de extração dado pela constância de volume, se fará a respectiva leitura. A água, simultaneamente separada, reflui no balão que contém a planta em análise. Quando a essência se solubiliza na água destilada, devido ao seu pequeno rendimento, pode ser recuperada agitando o líquido destilado com pentano. Após, deve ser feita a evaporação do solvente, resultando desta forma, apenas a essência. Neste sentido, são vários os modelos disponíveis que se distinguem em capacidade, técnica da destilação, local onde se encontra o tubo na medida, etc.

Segundo Bruneton (1991) e Simões e Spitzer (2010), a principal determinação quantitativa consiste no doseamento do óleo volátil, extraído por arraste de vapor d'água em aparelho tipo Clevenger modificado, conforme

preconizado pela F. Bras. IV edição, método executado no presente trabalho e fundamentando no princípio de separação acima descrito. Neste trabalho, portanto, a partir da hidrodestilação de folhas frescas e secas de *Liquidambar styraciflua* realizou-se a determinação quantitativa do óleo essencial presentes nas folhas, por meio da obtenção dos rendimentos das extrações (Figura 34).



FIGURA 34 – OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E LEITURA NO TUBO DE GRADUAÇÃO EM APARATO DE CLEVINGER MODIFICADO
FONTE: O Autor (2011)

A extração do óleo essencial foi realizada a partir de folhas frescas e secas do período da primavera e de folhas frescas do período de verão, não tendo sido a extração realizada de forma sazonal tendo em vista que se trata de uma espécie decídua, que perde suas folhas na época de inverno. De acordo com Evert (2006), em árvores decíduas, as folhas comumente sofrem senescência no final do crescimento sazonal.

Devido também ao baixo rendimento e tempo dispendioso gasto nas primeiras experiências de extração, para a obtenção de amostragens que permitissem a análise de dados não foi extraído o óleo do período do outono, apenas de coletas de primavera e verão, visando a obtenção de um volume satisfatório para a realização das análises cromatográficas e físico-químicas.

O tempo das extrações iniciais foi de 6h, anotando-se o volume de hora em hora do rendimento do óleo. Com o decorrer da realização das extrações, foi observado experimentalmente que o rendimento final para 6 horas de extração era

obtido a partir de 2 horas de extração, permanecendo praticamente constante com o decorrer do tempo. Com isso, volumes de óleo posteriores foram obtidos em 2 horas de hidrodestilação do material, otimizando o processo.

A tabela 9 apresenta os resultados do rendimento das extrações do óleo essencial de *L. styraciflua*, realizado em quintuplicatas, para as folhas do período de primavera e verão.

TABELA 9 - RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS E SECAS DE *Liquidambar styraciflua*

Rendimento do óleo essencial (mL%)		
Amostras	Média	Desvio Padrão
Folhas Frescas Primavera	0,236	0,059
Folhas Secas Primavera	0,382	0,093
Folhas Frescas Verão	0,119	0,033

De acordo com a tabela acima, as folhas frescas do período da primavera apresentaram rendimento superior ao da extração a partir de folhas frescas do período do verão, resultando em 0,236 mL% de óleo essencial, ao passo que para esta o rendimento foi de 0,119%. Os desvios padrões, a partir de quintuplas de extrações, foram respectivamente de 0,059 e 0,033. A extração do óleo a partir de folhas submetidas à secagem foi realizada com folhas coletadas do período da primavera, conduzindo a um rendimento de 0,382 mL%, com um desvio padrão de 0,093. Esse rendimento superior, em relação às folhas frescas do mesmo período já era esperado, já que o material isento de água possui, para uma mesma tomada inicial de amostra, maior peso em sólidos quando comparado ao material fresco, conduzindo à maiores rendimentos de óleo essencial.

Considerando-se uma mesma tomada inicial de amostra de folhas frescas e de folhas secas (ex: 100 g), o peso em sólidos presentes nas folhas secas, devido à ausência da massa de água é efetivamente maior do que nas folhas frescas, em que a massa de água contribui em peso. Com isso, teoricamente, o esperado é que a extração do óleo essencial a partir das folhas secas, com maior peso em sólidos, conduza a rendimentos maiores quando em comparação com a extração a partir de folhas frescas, o que foi confirmado experimentalmente.

Costa (1975) salienta que as quantidades presentes de óleo essencial variam de espécie para espécie e o conteúdo pode ser de abundância ou extrema escassez. Neste último caso, a caracterização das plantas aromáticas pelos métodos comuns ou pelo aroma, dosagem de conteúdo de essência, exame microscópico, apresenta dificuldades. Auxilia o estudo sistemático das espécies aromáticas o fato de a riqueza em essências, dentro de seus hábitos normais, variar entre limites próximos, mais ou menos conhecidos.

Os fatores ecológicos, climáticos (temperatura, umidade relativa, regime de ventos, duração total de exposição ao solo), de natureza do solo e grau de hidratação, bem como as práticas de cultivo podem modificar a composição dos óleos essenciais, influenciando diretamente na sua produção. A época da colheita e a maneira de efetuar-la podem representar diferenças no rendimento do óleo essencial; isto porque, o método de extração, em si, pode ocasionar a labilidade dos constituintes do óleo, como é o caso da hidrodestilação, em que a água, a acidez e a temperatura podem provocar a hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerizações, racemizações e oxidações. Além disso, o próprio ciclo vegetativo pode implicar em diferentes proporções dos constituintes, de modo que seja necessário eleger o melhor período de colheitas (COSTA, 1975; BRUNETON, 1991; PROENÇA DA CUNHA, 2005; SIMÕES; SPITZER, 2010).

Neste sentido, embora a análise sazonal não tenha sido realizada, em função da ausência de folhas no período do inverno, verificou-se maior produção do óleo essencial de *L. styraciflua* no período da primavera, período em que as folhas se encontram em estágio mais inicial de desenvolvimento, do que em relação às folhas do período do verão, podendo indicar que em períodos de crescimento logo após a perda das folhas o rendimento do óleo essencial, para esta espécie, pode ser maior.

5.3.2 Determinações físico-químicas do óleo essencial

De acordo com Costa (1975), as qualidades particulares de as plantas possuírem odores próprios devem-se aos óleos essenciais, que caracterizam, desta forma, o grupo estabelecido. Procura-se delimitar o grupo dos óleos essenciais pelo método de isolamento e pelas suas propriedades (volatilidade, solubilidade, caracteres organolépticos, em particular o odor, nem sempre aromático, etc), de modo a distinguí-lo de outros constituintes vegetais.

Os óleos essenciais, desta forma, podem ser avaliados através de ensaios como miscibilidade com o etanol, índice de refração, poder rotatório, densidade, determinação dos índices de acidez, de ésteres, de carbonilas, além de análise cromatográficas (CCD, CG, CLAE). São vários os métodos que podem ser utilizados para a avaliação da qualidade, não somente de matérias-primas vegetais ricas em óleos voláteis, como também dos óleos propriamente ditos, classificados como organolépticos, físicos, químicos ou físico-químicos. A escolha deve considerar o tipo e quantidade de amostra, o rigor analítico requerido e a infra-estrutura laboratorial disponível (SIMÕES; SPITZER, 2010).

De acordo com Bruneton (1991) são propriedades físicas dos óleos essenciais serem líquidos à temperatura ambiente, geralmente incolores e com densidade menor do que a da água, quase sempre dotados de poder rotatório e com índice de refração elevado. São solúveis em solventes orgânicos e muito pouco solúveis em água.

Em relação às características organolépticas, o óleo essencial obtido das folhas de *L. styraciflua* possui coloração amarelo esverdeado, conforme pode ser observado nas Figuras 34 e 35 e trata-se de um óleo intensamente aromático, de odor agradável. Uma das características mais evidentes de um óleo volátil é, justamente, o seu odor. De acordo com Simões e Spitzer (2010), os testes organolépticos podem revelar possíveis alterações decorridas com óleo essencial. Um odor fraco, por exemplo, pode indicar que o vegetal ou o óleo volátil isolado já perdeu a maioria dos seus compostos voláteis ao passo que um odor desagradável, pode ser decorrente de produtos de degradação química ou microbiana, indicando

má conservação do produto. Estes testes, porém, apresentam como desvantagem a falta de objetividade, já que a descrição verbal de um odor é extremamente difícil e pode variar de acordo com o indivíduo. Assim, muitas farmacopéias exigem que a análise organoléptica seja feita por comparação direta do óleo volátil em questão com a planta da qual o óleo foi extraído e requer analista com certa experiência a fim de que a execução dos testes seja realizada de forma fidedigna.



FIGURA 35 - ASPECTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua*.
FONTE: O Autor (2011)

São características dos óleos essenciais, que agregam valor em sua identificação, o sabor geralmente acre (ácido) e picante, coloração variando de incolor ou ligeiramente amarelada quando recém extraídos, pouca estabilidade frente à ar, luz, calor, umidade e metais e, de grande relevância no controle de qualidade, o índice de refração e atividade óptica que apresentam. Os autores ressaltam que apenas os óleos naturais, ou seja, aqueles obtidos a partir das plantas, são permitidos pelas farmacopéias para serem empregados em finalidades farmacêuticas, com exceção dos óleos que contêm apenas uma substância, sendo, nestes casos, admitido o uso de equivalentes sintéticos (SIMÕES; SPITZER, 2010).

Neste sentido, é fundamental que se estabeleça parâmetros de qualidade que visem assegurar a fonte do óleo essencial que está sendo utilizado em

diferentes aplicabilidades comerciais. Para isto, as farmacopeias definem testes a serem realizados, que permitem a identificação do óleo essencial de modo a averiguar possíveis “imitações” ou fraudes no que diz respeito à sua legitimidade, conforme já mencionado neste texto.

Desta forma, consistem em parâmetros para o controle de qualidade do óleo essencial de *L. styraciflua* os resultados contidos nas tabelas 10, 11 e 12 frutos das investigações realizadas neste trabalho a partir das amostras de óleo essencial extraído.

A determinação da miscibilidade em etanol permite a detecção de falsificações já que, para cada óleo volátil natural, existe um valor que indica sua miscibilidade numa solução de etanol/água (20°), em que o óleo volátil é miscível de forma transparente ou opalescente (SIMÕES; SPITZER, 2010).

A tabela 10 apresenta os resultados da solubilidade do óleo essencial de *L. styraciflua* determinando as partes em que são solúveis nas concentrações abaixo testadas.

TABELA 10 – SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL

[] ETANOL	70%	80%	90%	100%
Volume Gasto	13,6 mL	1,97 mL	0,28 mL	Completamente solúvel
Solubilidade do óleo	1:136	1: 19,7	1: 2,8	1:1

Em relação à densidade relativa do óleo essencial de *L. styraciflua*, de acordo com a tabela 11, esta foi determinada como sendo de 0,980, obtida por picnometria, sendo realizada a partir de calibração prévia com amostra de água fervida e então mantida em temperatura de 20°C (Figura 36), com posterior pesagem do óleo essencial (Figura 37), correlacionando-a com a pesagem das amostras de água, nas condições anteriormente mencionadas, que conduziram ao valor resultante.

TABELA 11 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua*

Peso da água a 25°C	Peso do óleo a 25°C	Densidade relativa
6,889	6,753	0,980



FIGURA 36 - CALIBRAÇÃO COM AMOSTRA DE ÁGUA PARA A DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua* POR PICNOMETRIA
FONTE: O Autor (2011)

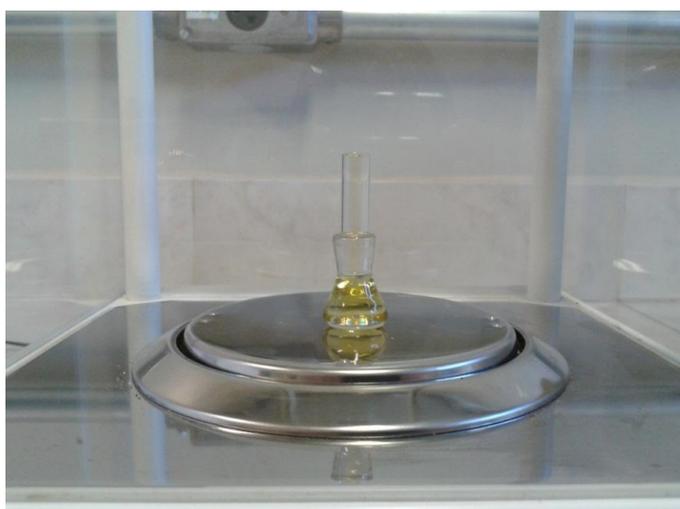


FIGURA 37 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua* POR PICNOMETRIA
FONTE: O Autor (2011)

De acordo com Simões e Spitzer (2010), para a densidade relativa (d) em relação a água, os valores para os óleos essenciais encontram-se geralmente entre 0,69 e 1,118, e são característicos para cada óleo. Desta forma, verifica-se que o valor encontrado de 0,98 enquadra-se nesta faixa e pode ser utilizado como característico para a espécie vegetal em questão.

Os valores para o índice de refração (n) de óleos essenciais, por sua vez, encontram-se entre 1,450 e 1,590 sendo que cada óleo também possui um valor característico (SIMÕES; SPITZER, 2010). A tabela 12 contempla o valor obtido para o óleo essencial de *L. styraciflua*, que correspondeu a 1,478 a partir de análises em triplicatas.

TABELA 12 - DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua*

Leituras (triplicata)	Resultado
1	1,4778
2	1,4778
3	1,4780
Índice de Refração = 1,478	

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), a medição do poder rotatório de uma substância com polarímetro é um dos métodos mais práticos para distinguir os enantiômeros e, portanto, é um importante critério de identificação, caracterização e de determinação de pureza enantiomérica dos fármacos. Os intervalos dos valores preconizados pelas farmacopéias para a rotação óptica são relativamente grandes, sendo, por exemplo, para óleo de eucalipto entre 0 e 10 e para o óleo de menta entre 16 e 30 (SIMÕES; SPITZER, 2010).

O poder rotatório, resultante das análises e cálculos com o óleo essencial, correspondeu a $-0,3681^\circ$ ou $-0^\circ 22' 5,16''$, dados obtidos da análise em triplicada.

Desta forma, os resultados encontrados, em conjunto, são compatíveis para o que se espera de um óleo essencial de origem natural, e podem ser utilizados, neste caso específico, como parâmetros para análise físico-química do óleo essencial de *L. styraciflua*.

5.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

De acordo com Farias (2010), a análise cromatográfica é uma ferramenta importante para a identificação de matérias-primas adquiridas na forma de preparados fitoterápicos intermediários (tintura, extratos, óleos fixos e voláteis, entre outros). Permitem, ainda, verificar a pureza do material analisado.

A cromatografia gasosa, neste sentido, é um método de análise indicada para determinações qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais, permitindo, portanto, separar e quantificar os componentes do óleo. Trata-se de um método simples que atualmente emprega as colunas capilares, permitindo a análise de misturas com centenas de componentes, possibilitando também a detecção de possíveis fraudes. A amostra é solubilizada em solventes como hexano e então injetada no cromatógrafo. A identificação dos compostos é realizada através da comparação do tempo de retenção relativo das amostras com padrões. Associada a um espectrômetro de massas, permite obter informações completas em relação ao peso molecular e fragmentações dos constituintes e fornece maior segurança na identificação dos picos individuais e no controle da pureza de um pico cromatográfico. Este método permite separar os constituintes e fornece um espectro de massas para cada pico, indicando a massa molecular e o padrão de fragmentação (BRUNETON, 1991; SIMÕES; SPITZER, 2010).

Na cromatografia gasosa, entretanto, podem ocorrer picos não identificados, devendo-se recorrer a outros métodos analíticos que permitam a elucidação estrutural desses compostos, como Cromatografia Líquida de alta eficiência, utilizando colunas de fase reversa em metodologias isocráticas e de gradientes, bem como a Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ^{13}C), normalmente após diluição em clorofórmio deuterado (SIMÕES; SPITZER, 2010).

O cromatograma do óleo essencial das folhas secas de *Liquidambar styraciflua*, resultante de análise utilizando o método de cromatografia gasosa, está ilustrado na Figura 38.

A Tabela 13, por sua vez, apresenta os 21 compostos químicos totais identificados e seus respectivos tempos de retenção, Índice de Kovat's e porcentagem relativa.

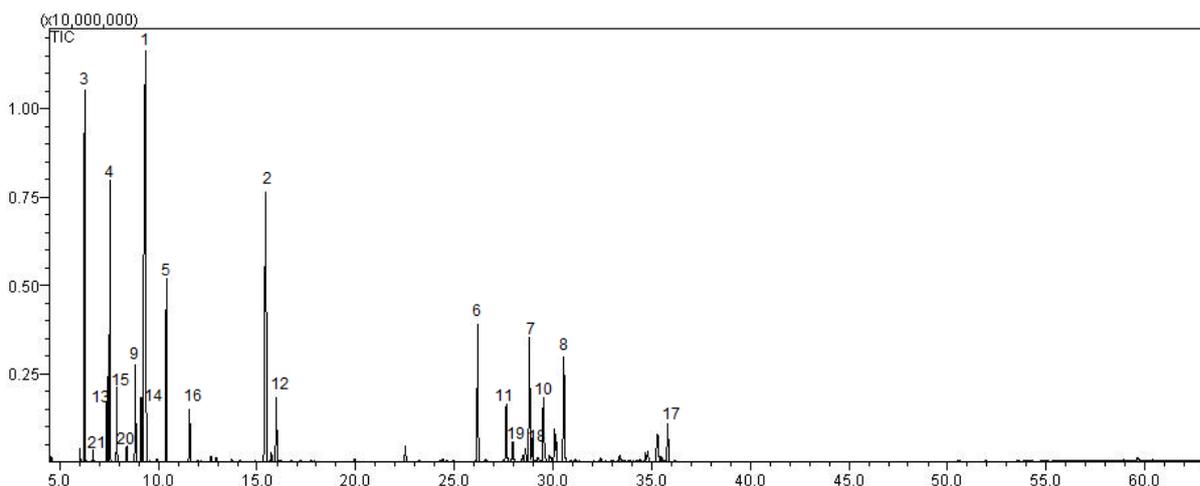


FIGURA 38 – CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*. 1 - limoneno 2 - α -terpineol 3 - α -pineno 4 - β -pineno 5 - γ -terpineno 6 - cariofileno 7 - aromadendreno 8 - α -amorfeno 9 - 2-careno 10 - epizonareno 11 - β -cariofileno 12 - α -tepineol 13 - sabineno 14 - m-cimeno 15 - β -mirceno 16 - α -terpinoleno 17 - delta-cadinol 18 - germacreno-D 19 - α -cariofileno 20 - α -felandreno 21 - canfeno

Através da análise cromatográfica em questão, foram verificados como majoritários os seguintes compostos: limoneno (25,31%), α -terpineol (12,82%), α -pineno (12,71%), β -pineno (7,92%) e γ -terpineno (5,97%). Os compostos identificados pela cromatografia gasosa estão sendo pelo confirmados pela análise dos espectros de massas resultantes. A figura 39 contempla a estrutura molecular dos compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas de *Liquidambar styraciflua*.

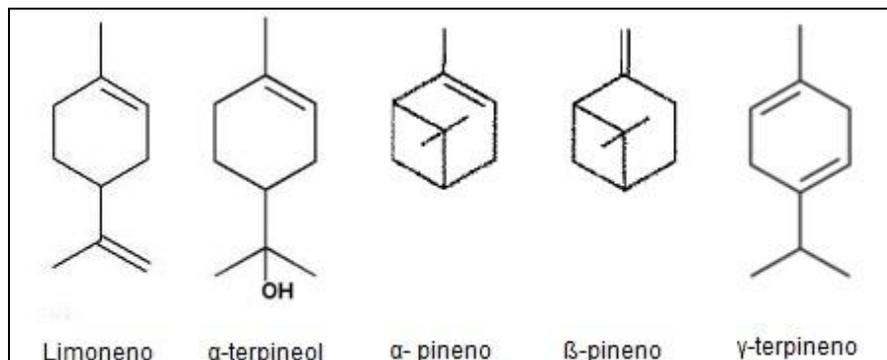


FIGURA 39 – ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Liquidambar styraciflua*
 FONTE: O Autor (2013)

TABELA 13 – COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Liquidambar styraciflua* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Composto	Tempo de Retenção	IK	Porcentagem Relativa (%)
α - pineno	6,267	933	12,71
Canfeno	6,68	947	0,21
Sabineno	7,395	971	1,88
β -pineno	7,537	976	7,92
β -mirceno	7,883	988	1,60
α -felandreno	8,392	1004	0,36
2-careno	8,822	1015	2,31
m-cimeno	9,113	1023	1,87
Limoneno	9,344	1029	25,31
γ -terpineno	10,399	1057	5,37
α -terpinoleno	11,576	1087	1,47
α -terpineol	15,437	1178	12,82
α -tepineol	15,97	1190	1,96
Cariofileno	26,178	1420	5,11
β -cariofileno	27,628	1455	1,99
α -cariofileno	27,949	1462	0,57
Aromadendreno	28,805	1482	4,88
germacreno-D	28,952	1486	0,81
Epizonareno	29,506	1499	1,99
α -amorfenno	30,545	1524	3,72
delta-cadinol	35,816	1657	1,27
Total			

Estudo realizado por Tattje e colaboradores (1980) com o óleo essencial das folhas de *L. styraciflua*, obtido após destilação a vapor, evidenciou a presença de 85% de hidrocarbonetos mono e sesquiterpenos e 15% de compostos oxigenados, sendo que os principais constituintes de uma das frações investigadas, e purificada, foram o α -pineno e o limoneno, em conformidade com o observado no presente trabalho, compostos também obtidos como majoritários (25,31% de limoneno e 12,71% de α -pineno). O estudo datado de 1980 evidenciou outros constituintes importantes, como o β -pineno, o γ -terpineno, α -terpineno e outros monoterpenos, como mirceno e p-cimeno, e sesquiterpenos, como o α -copaeno, cariofileno, humuleno e germacreno D. Os compostos γ -terpineno, cariofileno e germacreno D foram compostos semelhantemente identificados em ambos os estudos.

O limoneno, constituinte majoritário evidenciado, é o monoterpeno cíclico mais abundante da natureza é o componente principal dos óleos de cítricos (CASTELLANOS *et al.*, 2007)

As essenciais usuais, contidas nos aparelhos secretores típicos possuem constituições complexas, sendo formadas por dezenas de compostos em geral pertencentes às séries terpênica, aromática e gorda (COSTA, 1975; PROENÇA DA CUNHA, 2005). Simões e Spitzer (2010) salientam que a composição química de um óleo essencial, extraído de um mesmo órgão vegetal, pode variar em função da época de coleta, condições climáticas e de solo, ainda que sua composição seja determinada geneticamente. Neste sentido, os autores destacam como determinantes de variabilidade os quimiotipos, ou seja, vegetais botanicamente idênticos mas que diferem em composição química, assim como estágio de desenvolvimento do vegetal, os processos de obtenção que podem causar alterações como hidrólises, rearranjos, racemizações, oxidações e isomerizações, além, como já abordados, os fatores extrínsecos, tais como umidade, temperatura e exposição ao sol e ao vento, composição do solo e seu grau de hidratação, dentre outros.

De acordo com Bruneton (1991) e Simões e Spitzer (2010), preponderam na constituição química dos óleos essenciais os compostos terpenóides, normalmente terpenos de baixo peso molecular (GLÓRIA E GUERREIRO, 2006), cuja origem biossintética é derivada de unidades de isopreno. No entanto, há também a

presença dos derivados fenilpropanóides, formados a partir do ácido chiquímico, advindo do metabolismo vegetal.

No primeiro caso, predominam como compostos terpênicos os monoterpenos (em cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpênicos, que são os terpenóides mais voláteis e cujo peso molecular não é demasiadamente elevado. Porém, outros terpenóides podem ser encontrados, como os diterpenos, quando a extração é realizada com solventes orgânicos. Apesar de não serem muito frequentes em óleos essenciais, os fenilpropanóides, por sua vez, são de grande importância em algumas espécies aromáticas, conferindo-lhes odor e sabor característicos (BRUNETON, 1991; PROENÇA DA CUNHA, 2005).

Por fim, é relevante destacar que as essências naturais servem como padrão de odor, o que assegura até então a perenidade do uso dos óleos essenciais. Porém, ao contrário da maioria dos compostos químicos, os óleos essenciais ficam sujeitos à inconstância das suas qualidades sob a influência de diversos fatores, como os que agem diretamente sobre a matéria-prima, a planta, e por outros que agem sobre seu modo de preparar e conservar, em consequência da natureza de seus constituintes químicos. Soma-se a isso a sua complexidade natural, advinda de seus numerosos componentes, o que os torna passíveis de falsificações com essências estranhas de baixos preços. O alvitamento dos preços, devido à concorrência e ao número excessivo de intermediários explica, por vezes, a prática comum de falsificar óleos essenciais. São vários os exemplos de produtos comerciais que habitualmente aparecem adulterados (COSTA, 1975).

Os fatos mencionados no decorrer desta leitura justificam a importância em se realizar as análises que assegurem a identidade, pureza e qualidade dos óleos essenciais, propiciando as vantagens de seu uso e evitando prejuízos em relação à sua utilização.

6 CONCLUSÕES

De forma geral, as técnicas aplicadas neste trabalho permitiram identificar importantes estruturas e características nas partes aéreas do vegetal em estudo, tais como o tipo de estômatos, paracítico e tetracítico, e tricomas, tectores pluricelulares unisseriados, assim como o formato das células epidérmicas, presença de estruturas secretoras de óleo essencial e resina, elementos de vasos com placas de perforação escalariformes, presença de cristais e outras células, que podem servir como marcadores a serem utilizados para identificação da espécie *Liquidambar styraciflua*. As análises fitoquímicas, por sua vez, permitiram evidenciar um grande número de classes de metabólitos que podem desempenhar importantes atividades biológicas, podendo ainda servir como matéria-prima a diversos ramos industriais, como saponinas, taninos, cumarinas, glicosídeos flavônicos e antociânicos, esteróides e/ou triterpenóides e iridóides. As análises com o óleo essencial permitiram definir seus parâmetros de qualidade, além de verificar os compostos presentes, dando margem a elaboração de formulações com os atrativos de sua utilização, como o odor agradável em função dos compostos presentes. Os resultados das análises físico-químicas do óleo essencial das folhas de *Liquidambar styraciflua* estão de acordo com os dados da literatura para essências medicinais, podendo ser utilizados como parâmetros de sua qualidade.

Portanto, as diversas análises realizadas a partir desta espécie vegetal, na perspectiva de utilização no âmbito de produtos naturais, ainda que preliminares, permitiram acumular conhecimentos e verificar características quanto à potencialidade de uso na produção de medicamentos.

Neste sentido, estudos direcionados à atividades biológicas com os extratos podem ser investigadas a fundo com a espécie *Liquidambar styraciflua*, assim como o isolamento de bioativos a partir de extratos purificados pode ser executada, em trabalhos posteriores e complementares.

A perspectiva final no âmbito farmacêutico é que, em conjunto, estes estudos possam indicar a possibilidade de utilização da espécie como mais uma opção de medicamento para atender as demandas de saúde da população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4 ed. Illinois: Allued Publishing Cooperation, 2007.

ADAMS, J. M.; REHILL, B.; ZANG, Y.; GOWER, J. A test of the latitudinal defense hypothesis: herbivory, tannins and total phenolics in four north american tree species. **Ecological Research**, v. 24, p. 697–704, 2009.

ANVISA 2011. **Medicamentos Fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>> Acesso em setembro de 2011.

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BALANDIER, P.; COLLET, C.; MILLER, J. H.; REYNOLDS, P. E.; ZEDAKER, S. M. Designing forest vegetation management strategies based on the mechanisms and dynamics of crop tree competition by neighbouring vegetation. **Forestry**, v. 79, n. 1, 2006.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and citochemistry**. Ames, The Iowa State University Press, 1976.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas Aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOGLE, A. L. The floral morphology and vascular anatomy of the Hamamelidaceae: subfamily Liquidambaroideae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 73, p. 325-347, 1986.

BRASIL, 1999. RDC Nº 104, DE 14 DE MAIO DE 1999

BRASIL, 2013a. DECRETO Nº 5.813, DE 22 DE JUNHO DE 2006

BRASIL, 2013b. RDC Nº 14, DE 31 DE MARÇO DE 2010

BRASIL, 2013c. RDC Nº. 48, DE 16 DE MARÇO DE 2004

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia S.A., 1991. 594 p.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 8, p.255, 1972.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CARPENTER, B. E.; HOPKINS, W. C. Specific gravity values of sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) topwood and bolewood. **Forest Products Journal**, v. 6, n. 7, p. 30, 1966.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos – Anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmed, 2004, 480p.

CARVALHO, J. C. T. **Formulário médico-farmacêutico de Fitoterapia**. Alfenas, MG: Ciência Brasilis, 2005. 350 p.

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. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

CASTELLANOS, F. E.; VILLAMIL, A. P.; LÓPEZ, C. O. Scientia Et Technica, v.XIII(33), p.137, 2007.

CHAAR, J.S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. 125 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

CHAMEIDES, W. L., LINDSAY, R. W.; RICHARDSON, J.; KIANG, C. S. The role of biogenic hydrocarbons in urban photochemical smog: Atlanta as a case study. **Science**, v. 241, p.1473-1475, 1988.

CHANG, C. T. The morphological characteristics of some recent and fossil pollen of *Liquidambar*, *Altingia*, *Sycopsis*, *Euptelia*, and *Pistacia*. **Acta Botanica Sinica**, v. 7, p. 215-229, 1958.

CHANG. C. T. The pollen morphology of *Liquidambar* L. and *Altingia* Nor. **Botanicheskii Zhurnal**, v. 44, p. 1375-1380, 1959.

CHANG, C. T. The pollen morphology of the families Hamamelidaceae and Altingiaceae. Trudy Botanicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR, Ser. 1, **Flora i sistematika isysshikh rastenzii**, v. 13, p. 173-232, 1964.

CHANG, H.-T. Hamamelidaceae. In H.-T. CHANG [ed.]. **Flora Reipublicae Popularis Sinicae**. Beijing, China: Science Press, v. 35 (2), p. 36-116, 1979.

CHATTAWAY, M. M. The development of horizontal canals in rays. **Australian Journal of Science**, Ser. B, Biol. Sci. 4, p.1-11, 1951.

CORDELL, G. A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

COSTA, A. F. **Elementos da Flora Aromática. O laboratório de Farmacognosia no Estudo dos Óleos Essenciais de Portugal e Angola**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1975.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n.4, p. 564-582, 1999.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 854, p. 435-442, 1998.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. Orlando, Florida: Academic Press, 2000.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230 p.

DURKOVIC, J.; LUX, A. Micropropagation with a novel pattern of adventitious rooting in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.). **Trees**, v. 24, p. 491–497, 2010.

ENDRESS. P. K. A suprageneric taxonomic classification of the Hamamelidaceae. **Taxon**, v. 38, p. 371-376, 1989a.

ENDRESS, P. K. Aspects of evolutionary differentiation of the Hamamelidaceae and the lower Hamamelididae. **Plant Systematics and Evolution**, v, 162, p.193–211, 1989b.

ENDRESS, P. K. Phylogenetic relationships in the Hamamelidoideae. In: Crane, P.R., Blackmore, S. (Eds.), **Evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae**, v. 1, Systematics Association Special Volume n. 40A. Clarendon Press, Oxford, UK, p. 227–248, 1989c.

ENDRESS, P. K. Hamamelidaceae. In: K. Kubitzki [ed.]. **The families and genera of vascular plants**, v. 2, Flowering plants, dicotyledons, 322–330. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1993.

ENDRESS, P. K., STUMPF, S. The diversity of stamen structures in 'Lower' Rosidae (Rosales, Fabales, Proteales, Sapindales). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 107, p. 217–293, 1990.

ENDRESS, P. K.; IGERSCHEIM, A. Gynoecium diversity and systematics of the basal eudicots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 130, p. 305-393, 1999.

ENRICH, L. B.; SCHEUERMANN, M. L.; MOHADJER, A.; MATTHIAS, K. R.; ELLER, C. F.; NEWMAN, M. S.; FUJINAKA, M.; POON, T. *Liquidambar styraciflua*: a renewable source of shikimic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 2503-2505, 2008.

ERNST, W.R. The genera of Hamamelidaceae and Platanaceae in the southeastern United States. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 44, p. 193-210, 1963.

EVANS, R. C., TINGEY, D. T.; GUMPERTZ, M. L.; BURNS, W. F. Estimates of isoprene and monoterpene emission rates in plants. **Botanical Gazette**, v. 143, p. 304-310, 1982.

EVERT, R. F. **Esau's Plant anatomy**: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. 3. ed., New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2006.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. dos.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

FARIAS, M. R. Avaliação da Qualidade de Matérias-Primas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Cap.12, p. 263-288.

FARMACOPÉIA Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Fundação Oswaldo Cruz. 5. ed., v. 1. Brasília: Anvisa, 2010.

FERGUSON, D. K. A survey of the Liquidambaroideae (Hamamelidaceae) with a view to elucidating its fossil record. In: P. R. Crane e S. Blackmore. **Evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae**. Oxford, UK: Clarendon Press, v. 1, p. 249-272, 1989.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. C. John Wiley & Sons, Ltd. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213–226, 2008

FRANCO, G. F. Bioprospecção das partes aéreas e do óleo essencial de *Liquidambar styraciflua* L., Altingiaceae. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPR, Curitiba, 2013.

FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resins composites, and a new macerating method for wood. **Nature**, v. 155, n. 3924, p. 51, 1945.

GLÓRIA, B. A. da.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

GREGGUS, P. **Holzanatomie der europäischen Laubholzer und Strilucher**. Academiai Kiad6, Budapest, Hungary, 1959.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**, v. 1, New York: D. Van Nostrand Company, 1948, 427 p.

GUENTHER, E. **The Essential Oils: Individual Essential Oils of the Plant Families**, v.4, Krieger Publishing Company, 1989.

GURGEL GARRIDO, L. M. A. *et al.* Variabilidade genética de características silviculturais de *Liquidambar styraciflua* L. em teste de origens em Paraguaçu Paulista – SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 125- 132, 1997.

GUTTENBERG, S. Sweetgum seed is over-rated flier. **Journal of Forestry**, Bethesda, v. 5, n. 11, p. 844, 1952.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HARMS, H. Hamamelidaceae. In: ENGLER, A., PRANTL, K. (Eds.). **Die natürlichen Pflanzenfamilien**. 2. ed. Alemanha: Engelmann, Leipzig, v. 18, p. 303-343, 1930.

HUANG, G. L. Comparative anatomical studies of woods of Hamamelidaceae in China. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Szinsatseni**, v. 1, p. 22-28, 1986.

ICKERT-BOND, S. M., PIGG, K. B., WEN, J. Comparative infructescence morphology in *Liquidambar* (Altingiaceae) and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 1234-1255, 2005.

ICKERT-BOND, S. M.; WEN, J. Phylogeny and biogeography of Altingiaceae: Evidence from combined analysis of five non-coding chloroplast regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, p. 512-528, 2006.

ICKERT-BOND, S. M., PIGG, K. B., WEN, J. Comparative infructescence morphology in *Altingia* (Altingiaceae) and discordance between morphological and molecular phylogenies. **American Journal of Botany**, v. 94(7), p. 1094–1115, 2007.

INNOCENTINI, A. P. **Extração e caracterização analítica do óleo essencial da espécie *Aniba canelilla*, visando o isolamento do composto majoritário, 1-nitro-2-feniletano, e seu uso toxicológico**. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

JACOB, D.; WOFYSY, S. Photochemistry of biogenic emissions over the Amazon forest. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 93, p. 1477-1486, 1988.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc, 1940.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. ; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KIM, M. K.; SOMMER, H. E.; BONGARTEN, B. C.; MERKLE, S. A. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 536–540, 1997.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, 1999.

KORMANIK, P. P. *Liquidambar styraciflua* L. Sweetgum. In: BURNS, R. M.; HONKALA, B. H. (Coord.). **Silvics of North America: hardwoods**. Washington, DC: USDA, Forest Service, v. 2, p. 400-405. (USDA. For. Serv. Agric. Handbook, 654), 1990.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR. Editora Universidade Rural, 1997.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M .T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M, de. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

LAPG III. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 128-131, 2009,

LI, J., DONOGHUE, M. J. More molecular evidence for interspecific relationships in *Liquidambar* (Hamamelidaceae). **Rhodora**, v. 101, p. 87-91, 1999.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003.

MARTIN, E.; DUKE, J.; PELKKI, M.; CLAUSEN, E. C.; CARRIER, D. J. Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.): Extraction of Shikimic Acid Coupled to Dilute Acid Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1660–1668, 2010.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Clarendon Press, Oxford, UK, 1950.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MOLL, J. W., JANSSONIUS, H. H. **Mikrographie des Holzes der auf Java vorkommenden Holzarten III**. E.J. Brill, Leiden, The Netherlands, 1914.

MOREIRA, E. A. Marcha Sistemática de Análise em Fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-9, 1979.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95–111, 2004.

NAKASHIMA, T. **Manual prático de fitoquímica**. Curitiba: Departamento de Farmácia – UFPR, 1993. 25p. (Apostila).

NAKASHIMA, T. Álbum de Fotografias de *Liquidambar styraciflua*, 2011.

OLIVEIRA, F. de.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. 178 p.

OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 1, p. 49-58, 2003.

PETROVICK, P. R.; GONZÁLES ORTEGA, G. BASSANI, V. L. From a medicinal plant to Pharmaceutical Dosage Form. A (Still) Long Way for the Brazilian Medicinal Plants. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5/6, p. 364-369, 1997.

PHARMACOPOEA Helvetica. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1990.

PIGG, K. B., ICKERT-BOND, S. M., WEN, J. Anatomically preserved Liquidambar (Altingiaceae) from the Middle Miocene of Yakima Canyon, Washington State, USA, and its biogeographic implications. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 499-509, 2004.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos essenciais**. Viçosa: CPT, manual n. 463, 2003.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl.1, p. 45-61, 2002.

PRIMACK, R. B. **Essentials of conservation biology**. Massachusetts: Sunderland, 1993, 546 p,

PROENÇA DA CUNHA, A.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas medicinais e produtos vegetais em fitoterapia**. Fundação Calouste Gulbenkian/ Lisboa, 2003. 702p.

PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia e fitoquímica**. Fundação Calouste Gulbenkian / Lisboa, 2005. 670p.

QUI, Y.-L.; CHASE, M.; HOOT, S.; CONTI, S.; CRANE, P. R.; SYTDMA, K. J.; PARKS, C. R. Phylogenetics of the Hamamelidae and their allies: parsimony analyses of nucleotide sequences of the plastid gene *rbcl*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 159, p. 891-905, 1998.

RAO, K. R., S. K. PURKAYASTHA, S. K. Indian woods. Their identification, properties and uses. **Forest Research Institute**, Dehra Dun, India, v. 3. 1972.

RAO, T. A.; BHUPAL, O. P. Typology of foliar sclereids in various taxa of Hamamelidaceae, **Proceedings of the Indian Academy of Sciences. Section B**, v. 79, p. 127-138, 1974.

RASSMUSSEN, R. A.; JONES, C. A. Emission of isoprene from leaf discs of *Hamamelis*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 15-19, 1972.

REINSCH, A. Über die anatomischen Verhältnisse der Hamamelidaceae mit Rücksicht auf ihre systematische Gruppierungen. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v. 11, p. 347-395, 1890.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SANTOS, R. I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SANTOS, S. da C.; MELLO, J. C. P. de. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames, The Iowa State College Press, 1951, 391 p.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SHI, S.; HUANG, Y.; ZHONG, Y.; DU, Y.; ZHANG, Q.; CHANG, H.; BOUFFORD, D. E. Phylogeny of the Altingiaceae based on cpDNA matK, PY-IGS e nrDNA ITS sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 230, p. 13-24, 2001.

SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Avaliação de procedências e progênies de liquidambar da América Central, do México e dos Estados Unidos, em Agudos, Brazil. Colombo, **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 39, p. 93-108, 1999.

SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Produtividade de madeira de *Liquidambar* (*Liquidambar styraciflua* L.) de diferentes procedências, em Quedas do Iguaçu, PR. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 28, n. 4, p. 487- 491, 2004

SHIMIZU, J. Y. *Liquidambar* para Produção de Madeira no Sul e Sudeste do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 50, p. 127-138, 2005.

SILVA, R. L.; MELO, G. B.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S. O.; DE MELO, V. A.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; DE CASTRO E SILVA JÚNIOR, O. Effect the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 101-105, 2002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15(1), p.71-81, 2002.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.

SPECIES PLANTARUM 2: 999. 1753.

TAKHTAJAN, A. **Flowering Plants**. Dordrecht: Springer, 2009.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANG, Y. Systematic anatomy of the woods of the Hamamelidaceae. **Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology** (New Series), v. 1, p. 8–63, 1943.

TATTJE, D. H. E. BOS`, R. BRUINS, A. P . Constituents of Essential oil from Leaves of *Liquidambar styraciflua* L. **Planta Medica**, v. 38, p. 79-85, 1980.

TIPPO, O. Comparative anatomy of the Moraceae and their presumed allies. **Botanical Gazette**, v. 100, p. 1–99, 1938.

TROPICOS. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Image/100115461>> Acesso em janeiro de 2013a.

TROPICOS. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?mctype=4&lookupid=15100008>> Acesso em janeiro de 2013b.

TROPICOS. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/1510000>> Acesso em janeiro de 2013c.

UNIDO E FAO. United Nations Industrial Development and Food And Agriculture Organization of the Organization. **Herbs, spices and essential oils. Post-harvest operations in developing countries**, 2005. Disponível em: <http://www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/Pub_free/Herbs_spices_and_essential_oils.pdf> Acesso em janeiro de 2013.

WENT, F.W. 1960. Blue haze in the atmosphere. **Nature**, v. 187, p. 641—643

WERKER, E., FAHN, A. Resin ducts of *Pinus halepensis* Mill.: Their structure, development and of arrangement, **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 379–411, 1969.

WILLIAMS, J. Amentaceae. In: BALFOUR, J.H. **A manual of botany**: being an introduction to the study of the structure, physiology, and classification of plants. 3. ed. London, UK: Griffin, 1855.

WIMMER, R.; GRABNER, M.; STRUMIA, G.; SHEPPARD, P.R. Significance of vertical resin ducts in the tree rings of spruce. In: **Tree-ring Analysis**: Biological, Methodological and Environmental Aspects, R. Wimmer and R. E. Vetter (eds). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, p. 107–118, 1999.

WISNIEWSKI, M., BOGLE, A. L. The ontogeny of the inflorescence and flower of *Liquidambar styraciflua* L. (Hamamelidaceae). **American Journal of Botany**, v. 69, p. 1612–1624, 1982.

WHO 2003. **Traditional medicine**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>> Acesso em maio de 2011.

WODZICKI, T. J.; BROWN, C. L. Cellular differentiation of the cambium in the Pinaceae, **Bot. Gazette**, v.134, p. 139–146, 1973.

WU, W.; ZHOU, R.; HUANG, Y.; BOUFFORD, D. E.; SHI, S. Molecular evidence for natural intergeneric hybridization between *Liquidambar* and *Altingia*. **Journal of Plant Research**, v. 123. p. 231–239, 2010.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**, São Paulo, v. 8, n. 43, p. 50-51, 1998.

YANG, N.; CHEN, J.; ZHOU, G.; TANG, Y.; DUAN, J.; TIAN, L.; LIU, X. Pentacyclic triterpenes from the resin of *Liquidambar formosana*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 927–931, 2011.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente. Chapecó: Argos, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAVADA, M. S., DILCHER, D. L. Comparative pollen morphology and its relationship to phylogeny of pollen in the Hamamelidae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 73, p. 348–381, 1986.

ZHANG, Z. Y. Ç.; ZHANG H. T.; ENDRESS, P. K. Hamamelidaceae. In: WU, Z.Y.; RAVEN, P.H. e HONG, D.Y. **Flora of China**. Beijing, China: Science Press, v. 9, p. 18-42, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.