

Amanda Ellen de Athayde

**ARNICAS NO BRASIL: DO PERFIL QUÍMICO A
MORFOANATOMIA, UMA COMPARAÇÃO ENTRE AS
ESPÉCIES.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, sob orientação da Prof^a. Dr^a.Maique Weber Biavatti e co-orientação do Dr. Louis Pergaud Sandjo.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Athayde, Amanda Ellen de
ARNICAS NO BRASIL: DO PERFIL QUÍMICO A
MORFOANATOMIA, UMA COMPARAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES. /
Amanda Ellen de Athayde ; orientador, Maíque Weber
Biavatti , coorientador, Louis Pergaud Sandjo. ,
2019.
191 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Caracterização e comparação de
espécies utilizadas no Brasil como arnica através
de técnicas microscópicas para determinação da
morfoanatomia das espécies e utilização da técnica
cromatográfica CLUE-DAD-ESI-qTOF para análise de
desreplicação dos extratos. I. , Maíque Weber
Biavatti. II. , Louis Pergaud Sandjo. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

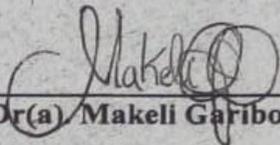
**“ARNICAS” NO BRASIL: DO PERFIL QUÍMICO
A MORFOANATOMIA, UMA COMPARAÇÃO
ENTRE AS ESPÉCIES”**

POR

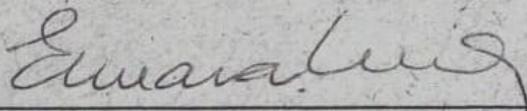
Amanda Ellen de Athayde

Dissertação julgada e aprovada em m
sua forma final pelo(a) a)
Orientador(a) e membros da la
Banca Examinadora, composta ta
pelos Professores Doutores:

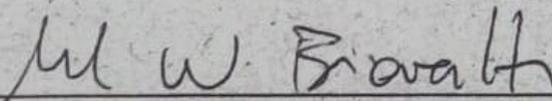
Banca Examinadora:



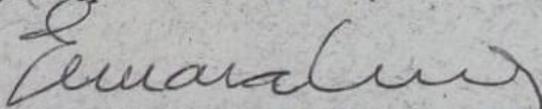
Prof(a). Dr(a). Makelli Garibotti Lusa (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Fernando Batista da Costa (USP – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maique Weber Blavatti (UFSC – Orientador(a))



**Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 26 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus em sua essência, agradeço em todos os seus sagrados nomes, gratidão.

Aos meus orientadores Dr^a Maique Weber Biavatti e Dr. Louis P. Sandjo. Pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

Gostaria também de expressar meus sinceros agradecimentos a professora Dra. Makeli G. Lusa e a todos do Laboratório de Anatomia Vegetal do departamento de botânica da UFSC, em especial aos amigos Everton e Josi.

Ao professor Cesar Simionato pela gentil acolhida e por ser um grande mestre. A Estrutura do Horto didático do CCS sendo abrigo de varia espécies medicinais e por atender lindamente a comunidade. Obrigada por acreditar professor.

À UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia por toda a infraestrutura disponibilizada. Aos professores pelos ensinamentos durante esses dois anos de mestrado. À CAPES pelo incentivo a pesquisa e pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

Aos professores Dr. Fernando B. da Costa (USP-RP), Dr. Leonardo Gobbo Neto (USP-RP), Dr^a. Cristiane Fernanda Fuzer Graef (UFVJM), Dr^a. Makeli Garibotti Lusa (UFSC) e ao Herbário Flor (UFSC) por disponibilizarem e doarem amostras para este estudo.

As Dr^{as} Cristiane Meyre da Silva, Makeli G. Lusa e Cintia Huller, por todas as considerações na versão inicial do trabalho. Todas as considerações foram muito importantes para construção do presente trabalho.

Aos queridos amigos, Larissa G. (minha “irmã de coração”), Larissa F., Luiz, Erlon, Layzon, Guilherme, Ana, Larysse, Claudini, Ingrid, Gabriele, Fernanda, Michael, Tauna e Rafaela. Ao longo de dois anos viraram além de queridos amigos uma grande família.

À técnica do laboratório de Farmacognosia Claudia Barcelos Terrazas, e ao Professor Doutor Flávio Reginatto por sua disponibilidade e auxílio.

Ao Professor Dr. Mário Steindel e a Milene Moraes, do laboratório de protozoologia da UFSC pela recepção, atenção e realização dos ensaios parasitológicos.

Aos meus amados pais, Liége e Fernando. Obrigada por acreditarem e tornarem o que até então era um sonho em realidade. A minha irmã, Maria Fernanda, obrigada por ser meu grande exemplo. Amo vocês. Ao Carlos Rustik, por todo amor e carinho nesses dias finais de escrita e trabalhos. Obrigada pela paciência e parceria. Te amo!

“Olhe profundamente para a natureza, e então
você vai entender tudo melhor.”
Albert Einstein

RESUMO

As "arnicas" encontradas no Brasil são exemplos de diferentes espécies da família Asteraceae utilizadas na medicina popular por atribuída ação anti-inflamatória. Entre as espécies conhecidas e usadas no Brasil como "arnica" selecionamos: *Calea uniflora* Less, *Chaptalia nutans* (L.) Polák, *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B. Jones, *Lychnophora ericoides* Mart, *Lychnophora pinaster* Mart, *Lychnophora salicifolia* Mart, *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass, *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.), *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, R.M.King & H.Rob e *Solidago chilensis* Meyen, devido a ampla tradicionalidade de uso destas. Entretanto, devido a falta de informações sobre a morfoanatomia e a química destas espécies, a identificação das mesmas é dificultada ou impossibilitada visto que, em sua maioria, são comercializadas apenas com a denominação "arnica" nas formas rasurada, pulverizada ou preparadas na forma de tinturas. Desta forma, o presente estudo fornece novas informações sobre a morfoanatomia foliar e química dos principais metabólitos encontrados em preparos tradicionais (tintura e chá) destas espécies. Para este estudo, as folhas das arnicas foram seccionadas e avaliadas por microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e realizados testes histoquímicos (cloreto férrico, sudam, ácido sulfúrico e vermelho de rutêni). Para a desreplicação dos extratos foi utilizado Cromatografo Liquido de Ultra Eficiência hifenado a espectrômetro de massas (CLUE-EM). Os resultados revelaram caracteres anatômicos para o diferenciação e identificação das arnicas, sendo estes: anexos epidérmicos, células epidérmicas, parênquima do mesofilo, feixes vasculares e formato e caracterização da nervura central e das estruturas secretoras. Através da desreplicação dos extratos foram identificadas 45 substâncias, entre eles, o flavonoide buteína e o cromeno noreugenin em *Calea uniflora*; hidroxí-cumarina e cromanona glicosilada em *Chaptalia nutans*; flavonoides pinobanskina e vicenina-2 para *Lychnophora ericoides*; flavonoides vicenina-2, violantina/isoviolantina para *Lychnophora pinaster*; flavonoides camferol-acetil-raminopiranosídeo e vicenina-2 para *Lychnophora salicifolia*; diterpenos labdanos para *Solidago chilensis* e os flavonóides camferol e rutina para *Sphagneticola trilobata*. Neste sentido, este trabalho contribui para a diferenciação morfoanatômica e química das espécies selecionadas utilizadas no Brasil como "arnica", identificando caracteres anatômicos e marcadores químicos específicos para cada espécie avaliada.

Palavras-chave: "Arnica"; Morfonatomia; Desreplicação; CLUE-EM.

ABSTRACT

Arnicas in Brazil: from the chemical profile to morfoanatomy, a comparison among species.

The "arnicas" found in Brazil are examples of different species of the family Asteraceae used in the popular medicine for attributed anti-inflammatory action. Among the species known and used in Brazil as "arnica" we selected: *Calea uniflora* Less, *Chaptalia nutans* (L.) Polák, *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B. Jones, *Lychnophora ericoides* Mart, *Lychnophora pinaster* Mart, *Lychnophora salicifolia* Mart, *Porphyllum ruderale* (Jacq.) Cass, *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.), *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, RMKing & H.Rob and *Solidago chilensis* Meyen, due to their traditional use. However, due to a lack of information on the morphology and chemistry of these species, the identification of these species is hampered or impossible since most are marketed only under the name "arnica" in the forms shaved, sprayed or prepared in the form of tinctures. Thus, the present study provides new information on foliar and chemical morphology of the major metabolites found in traditional (dye and tea) preparations of these species. For this study, the leaves of the arnicas were sectioned and evaluated by light microscopy, scanning electron microscopy and histochemical tests (ferric chloride, sweat, sulfuric acid and ruthenium red). For the dereplication of the extracts was used Ultra performance liquid chromatography of hyphenated to mass spectrometer (CLUE-EM). The results revealed anatomical characters for the differentiation and identification of the arnicas, being these: epidermal attachments, epidermal cells, mesophilic parenchyma, vascular bundles and shape and characterization of the central vein and the secretory structures. Through the excretion of the extracts, 45 substances were identified, among them flavonoid buteína and cromeno noreugenin in *Calea uniflora*; hydroxycoumarin and glycosylated chromanone in *Chaptalia nutans*; flavonoids pinobanskina and vicenin-2 for *Lychnophora ericoides*; vicenin-2 flavonoids, violantin/ isoviolanthin for *Lychnophora pinaster*; flavonoids camphorol-acetylraminopyranoside and vicenin-2 for *Lychnophora salicifolia*; diterpenos labdanos for *Solidago chilensis* and the flavonoids camferol and rutin for *Sphagneticola trilobata*. In this sense, this work contributes to the morphological and chemical differentiation of the selected species used in Brazil as "arnica", identifying anatomical characters and specific nical markers for each species evaluated.

Keywords: "Arnica"; Morphonatomy; Dereplication; CLUE-EM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Sistemas de classificação intrafamiliares taxonômicos da família Asteraceae	33
Figura 02	Documentos relacionados a pesquisa por “arnica”, divididos por áreas de pesquisa	37
Figura 03	Documentos publicados por ano (A) e território/país (B) relacionados a pesquisa por arnica.	38
Figura 04	Representação ilustrativa de preparo de amostra para MEV.	61
Figura 05	Representação ilustrativa da fixação do material vegetal: Método de Johansen (1940).	62
Figura 06	Representação ilustrativa da reversão da herborização: Método de Smith & Smith (1942) modificado	63
Figura 07	Representação ilustrativa da inclusão em PEG	63
Figura 08	Representação ilustrativa dos testes histoquímicos e preparo das lâminas.	64
Figura 09	Tinturas (etanol 45%) obtidas conforme procedimento previamente descrito.	65
Figura 10	Nervura Central (NC) em seção transversal das folhas totalmente expandidas das espécies de arnicas utilizadas popularmente no Brasil.	69
Figura 11	Estômatos e células epidérmicas em vista da superfície abaxial das folhas totalmente expandidas das arnicas utilizadas popularmente no Brasil.	71
Figura 12	Estômatos em vista da superfície abaxial das folhas totalmente expandidas das arnicas utilizadas popularmente no Brasil. Observados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	72
Figura 13	Células da Epiderme (Superfície Adaxial vs. Abaxial) das folhas totalmente expandidas das diferentes espécies de arnicas utilizadas popularmente no Brasil, por MEV	74
Figura 14	Tricoma Glandular (TG) em seção transversal das folhas totalmente expandidas das espécies conhecidas popularmente como arnicas no Brasil. Utilizando microscopia de luz.	76
Figura 15	Tricomas Glandulares (TGs) observados na superfície abaxial das folhas totalmente expandidas das espécies conhecidas popularmente como arnicas no Brasil. Utilizando MEV	77

Figura 16	Tricoma Não Glandular (TNG) em seção transversal das folhas totalmente expandidas das folhas das arnicas avaliadas.	79
Figura 17	Tricomas não glandulares (TNG) das folhas das arnicas totalmente expandidas por MEV.	80
Figura 18	Região Intermediária do Mesofilo (RI) em seção transversal das folhas das arnicas. Folhas totalmente expandidas. Microscopia de Luz.	82
Figura 19	Margem foliar em seção transversal das folhas das arnicas totalmente expandidas	84
Figura 20	Fluxogramas para identificação das arnicas, <i>Calea uniflora</i> , <i>Chaptalia nutans</i> , <i>Lychnophora pinaster</i> , <i>Lychnophora ericoides</i> , <i>Lychnophora salicifolia</i> e <i>Lychnophora diamantinana</i> , <i>Porophyllum ruderale</i> , <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> , <i>Sphagneticola trilobata</i> e <i>Solidago chilensis</i> , avaliadas através da nervura central (A), estômatos (B), tricomas glandulares e não glandulares (C).	85
Figura 21	Triagem para compostos lipofílicos (Sudam IV). Tricomas glandulares (A) e nervura central e células do mesofilo (B).	89
Figura 22	Triagem para Lactonas sesquiterpênicas (Ácido Sulfúrico). Tricomas glandulares (A) e nervura central e células do mesofilo (B).	91
Figura 23	Triagem para compostos fenólicos (cloreto férrico). Tricomas glandulares (A) e nervura central e células do mesofilo (B).	93
Figura 24	Principais classes de metabólitos relatados em cada uma das Arnicas usadas Brasil.	98
Figura 25	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI(-)</i> e <i>ESI(+)</i> , respectivamente A e B, das tinturas de <i>Arnica montana</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	100
Figura 26	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI(-)</i> e <i>ESI(+)</i> , respectivamente A e B, das tinturas de <i>Calea uniflora</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	
Figura 27	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI(-)</i> e <i>ESI(+)</i> , respectivamente A e B, das tinturas de <i>Chaptalia nutans</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	104

Figura 28	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B, das tinturas de <i>Lychnophora ericoides</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2	106
Figura 29	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B, das tinturas de <i>Lychnophora pinaster</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2	108
Figura 30	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B, das tinturas de <i>Lychnophora salicifolia</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	110
Figura 31	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B, das tinturas de <i>Porophyllum ruderale</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	112
Figura 32	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B, das tinturas de <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	114
Figura 33	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B, das tinturas de <i>Solidago chilensis</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2	116
Figura 34	Cromatogramas de picos base obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B, das tinturas de <i>Sphagneticola trilobata</i> . Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	118
Figura 35	Cromatogramas obtidos através do branco de extração (etanol 45%) obtidos por <i>ESI</i> (-) e <i>ESI</i> (+), respectivamente A e B. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.	120
Figura 36	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido quínico em modo de ionização negativo.	130
Figura 37	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido cumárico.	131
Figura 38	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido cumárico <i>O</i> -glicosídeo.	132
Figura 39	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido cafêico.	132

Figura 40	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido 3- <i>O</i> -feruloilquínico.	133
Figura 41	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido sinápico.	134
Figura 42	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido clorogênico.	135
Figura 43	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do isômero ácido dicafeoilquínico.	136
Figura 44	Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido daucico.	137
Figura 45	Mecanismo de fragmentação do cafeato de etila no modo negativo.	138
Figura 46	Mecanismo de fragmentação da substância fenilalanina no modo positivo.	138
Figura 47	Mecanismo de fragmentação do ácido hidroxibenzoico glucopiranosídeo no modo de ionização negativo.	139
Figura 48	Mecanismo de fragmentação do ácido hidroxibenzoico no modo de ionização negativo	139
Figura 49	Mecanismo de fragmentação da substância Quercetin-3-glucuronide no modo de ionização negativo.	140
Figura 50	Mecanismo de fragmentação da flavanona pinobanksina em modo de ionização negativo	141
Figura 51	Mecanismo de fragmentação da flavanona pinobanksina em modo de ionização positivo.	141
Figura 52	Mecanismo de fragmentação da flavanona pinocembrina em modo de ionização negativo.	142
Figura 53	Mecanismo de fragmentação da flavanona pinocembrina em modo de ionização positivo.	142
Figura 54	Mecanismo de fragmentação da substância vicenin-2 em modo de ionização negativo.	143
Figura 55	Mecanismo de fragmentação da substância vicenina-2 em modo de ionização positivo.	144
Figura 56	Mecanismo de fragmentação da substância violantina em modo de ionização negativo.	145
Figura 57	Mecanismo de fragmentação da substância violantina em modo de ionização positivo.	146
Figura 58	Mecanismo de fragmentação da substância luteolina em modo de ionização negativo.	147

Figura 59	Mecanismo de fragmentação da substância luteolina em modo de ionização positivo.	147
Figura 60	Mecanismo de fragmentação do flavonol campferol em modo de ionização negativo.	148
Figura 61	Mecanismo de fragmentação do flavonol campferol em modo de ionização positivo.	149
Figura 62	Mecanismo de fragmentação da substância rutina em modo de ionização negativo.	149
Figura 63	Mecanismo de fragmentação da substância rutina em modo de ionização positivo.	150
Figura 64	Mecanismo de fragmentação da substância quercetrina em modo de ionização negativo.	151
Figura 65	Mecanismo de fragmentação da substância quercetrina em modo de ionização positivo.	151
Figura 66	Mecanismo de fragmentação da substância quercetina-(p-coumaroil)-glicopiranosideo em modo de ionização negativo.	152
Figura 67	Mecanismo de fragmentação do flavonol campferol-acetil-raminopiranosideo em modo de ionização positivo.	153
Figura 68	Mecanismo de fragmentação da substância orobol em modo de ionização negativo	154
Figura 69	Mecanismo de fragmentação da substância orobol em modo de ionização positivo.	154
Figura 70	Mecanismo de fragmentação da chalcona buteína em modo de ionização negativo.	155
Figura 71	Mecanismo de fragmentação da chalcona buteína em modo de ionização positivo.	156
Figura 72	Mecanismo de fragmentação da cromona noreugenina em modo de ionização negativo.	157
Figura 73	Mecanismo de fragmentação da cromona noreugenina em modo de ionização positivo.	158
Figura 74	Propostas de hidroxí-cumarinas para a espécie <i>Calea uniflora</i> em modo de ionização negativo.	158
Figura 75	Mecanismo de fragmentação da cromanona glicosilada em modo de ionização negativo.	159
Figura 76	Mecanismo de fragmentação do terpeno labdano em modo de ionização negativo.	159
Figura 77	Mecanismo de fragmentação do terpeno labdano em modo de ionização positivo.	160
Figura 78	Gráfico pizza das classes químicas identificadas nas 10 espécies de “arnica” através da análise de	161

desreplicação dos extratos hidro alcóolicos (tinturas) e aquosos (chás).

- Figura 79 Cromatograma de picos base obtidos por *ESI(+)* dos extratos acetônicos das folhas de *Calea uniflora*. 167
- Figura 80 Cromatograma de picos base obtidos por *ESI(+)* dos extratos acetônicos das folhas de *Solidago chilensis*. 168
- Figura 81 Cromatograma de picos base obtidos por *ESI(+)* dos extratos acetônicos das folhas de *Sphagneticola trilobata* 179

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação das subfamílias e tribos de Asteraceae segundo Bremer (1994).	32
Quadro 02	Número de tombamento das exsicatas	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Principais classes e substâncias encontrados nas arnicas estudadas. Sendo, <i>Arnica montana</i> (AM), <i>Sphagneticola trilobata</i> (ST), <i>Solidago chilensis</i> (SC), <i>Calea uniflora</i> (CU), <i>Porophyllum ruderale</i> (PR), <i>Chaptalia nutans</i> (CU), <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (PB), <i>Lychnophora ericoides</i> (LE), <i>Lychnophora salicifolia</i> (LS), <i>Lychnophora pinaster</i> (LP) e <i>Lychnophora diamantinana</i> (LD).	41
Tabela 02	Testes histoquímicos e classes metabólicas de secreção/acumulo observadas nas estruturas foliares das espécies de arnica.	97
Tabela 03	Substâncias identificadas nas tinturas obtidas a partir das espécies vegetais avaliadas. ESI(+) e ESI(-).	123
Tabela 04	Fitomarcadores ou classes químicas sugeridas para diferenciação das espécies conhecidas popularmente como arnica no Brasil através da análise das tinturas e chás das respectivas espécies	165

--

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
EM	Espectrometria de massas
ESI-Q-TOF	Ionização por eletronebulização com analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (do inglês, Electrospray ionization-quadrupole-time of flight)
FM	Fase móvel
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrila
T _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v	Volume
RDA	Retro-Diels- Alder
ESI (-)	Ionização por eletronebulização em modo negativo
ESI (+)	Ionização por eletronebulização em modo positivo
NC	Nervura Central
RIM	Região Intermediária do Mesofilo
TG	Tricoma Glandular
TNG	Tricoma Não Glandular
ST	Estômato
CV	Cavidade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ESI	Estrutura Secretora Interna
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometro de massas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	PLANTAS MEDICINAIS E ETNOFARMACOLOGIA	29
2.2	FAMILIA ASTERACEAE	30
2.3	ARNICAS NO BRASIL	35
2.4	ASPECTOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS A DENOMINAÇÃO “ARNICA”	36
2.5	ASPECTOS QUÍMICOS DAS ARNICAS	39
2.6	IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS	54
2.7	CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-EM	54
3	OBJETIVOS	57
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	MATERIAL VEGETAL	59
4.1.1	Estudo morfoanatômico	59
4.1.2	Estudo do perfil químico	59
4.2	ANÁLISE MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS DAS ARNICAS	61
4.2.1	Análise das superfícies adaxial e abaxial das folhas utilizando Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	61
4.2.2	Análise microanatômica interna e externa das folhas utilizando microscopia de luz.	62
4.2.3	Testes histoquímicos	63
4.3	ANALISE DO PERFIL QUÍMICO	64
4.3.1	Soluções extrativas	64
4.3.2	Análises por CL-EM	65
4.3.3	Desreplicação dos extratos	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	AVALIAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS	67
5.1.1	Caracterização microanatômica	67

5.1.1.1	<i>Nervura Central (NC)</i>	67
5.1.1.2	<i>Região Intermediária do mesofilo (RI)</i>	70
5.1.1.3	<i>Bordo da folha</i>	83
5.1.2	Fluxograma de identificação das arnicas avaliadas neste estudo.	85
5.1.3	Caracterização histoquímica	87
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLUE-EM	99
6	CONCLUSÕES	171
7	REFERÊNCIAS	173

1 INTRODUÇÃO

A investigação de plantas medicinais, utilizando da etnofarmacologia como base de informação para estudos de caracterização química de espécies vegetais, vem demonstrando expressiva riqueza e variedade de metabolitos secundários encontrados nos diferentes gêneros e espécies da flora brasileira (POLLO et al., 2013; Da SILVA, 2016; CARVALHO, 2016; FAQUETI, 2016). A família Asteraceae constitui uma das maiores famílias entre as angiospermas, sendo que no Brasil abrange cerca de 37 gêneros aceitos e 43 sinônimos, 300 espécies aceitas e 422 sinônimos, 24 subespécies aceitas e 23 sinônimos destas (FLORA DO BRASIL, 2019).

Espécies pertencentes a esta imensa família, apresentam uma gama de metabólitos secundários como, compostos fenólicos, terpenos, alcaloides, poliacetilenos e óleos essenciais (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; CRONQUIST, 1981; EMERENCIANO et al., 2007). Entre os terpenos, as lactonas sesquiterpênicas são designadas por alguns autores como marcadores quimiotaxonômicos (KELES et al., 2010, SEMIR et al., 2011; Da SILVA, 2016; LUSA et al., 2016).

Entre as espécies utilizadas na medicina tradicional do Brasil, destacam-se as espécies conhecidas popularmente como “arnicas”, sendo exemplos de distintos gêneros e espécies da família Asteraceae, que apresentam relatada ação anti-inflamatória, citando as espécies: *Solidago chilensis* Meyen (SABIR et al., 2012), *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, R.M.King & H.Rob (RAGGI, 2013), *Calea uniflora* Less (TORRES, 2014), *Chaptalia nutans* (L.) Polák (DUARTE et al., 2007), *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (DUARTE et al., 2007), *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) (AMORIM et al., 2016), *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B.Jones, *Lychnophora pinaster* Mart e *Lychnophora ericoides* Mart., *Lychnophora salicifolia* Mart (SEMIR et al., 2011).

Estudos com as arnicas demonstram propriedades medicinais como, anti-inflamatória (SEMIR et al., 2011, LIMA et al., 2015, LANG et al., 2017), analgésica (LOPES, 2001), tripanocida e

leshmanicida (ALCÂNTARA et al., 2005, LIMA et al., 2015), antimicrobiana e antiparasitária (FREIRES et al., 2010, ABREU, 2009).

Entretanto, considerando os estudos morfoanatómicos e fitoquímicos disponíveis na literatura referentes às arnicas, os dados ainda são insuficientes no que diz respeito à identificação e à diferenciação das espécies citadas, visto que a droga vegetal é geralmente comercializada na forma rasurada ou pulverizada, sendo que esta carência de informações reflete diretamente na insegurança de uso de preparos tradicionais, como tinturas e chás (BIESKI et al., 2015). Neste contexto, pesquisas que fornecem informações sobre a morfoanatomia vegetal, perfil químico e histolocalização de metabólitos secundários são fundamentais para às investigações das espécies medicinais, evidenciando estruturas responsáveis pela produção de metabólitos bem como a identificação de substâncias de interesse químico e farmacológico (LUSA, 2014).

Em relação à fitoquímica de espécies vegetais, a aplicação da espectrometria de massas (EM) hifenada a cromatografia líquida (CL-EM) é reconhecida como uma das técnicas de separação e detecção simultânea de diversas substâncias e classes químicas, sendo eficientes em análises e caracterização de produtos naturais. Esta técnica possibilita a detecção de analitos com extrema sensibilidade e seletividade, através da análise da razão massa-carga (m/z). O uso da CL-EM, pode ser bem aplicado para realização da impressão digital metabólica (fingerprinting) de espécies vegetais (LANÇAS, 2009).

Neste contexto, este trabalho aborda a caracterização morfoanatómica e química de espécies utilizadas como “arnica” no Brasil, utilizando técnicas usuais em anatomia vegetal, empregando microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e a caracterização química utilizando da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector Espectrômetro de Massas com Ionização por Eletrospray e analisadores do tipo Quadrupolo e Tempo de Voo (CLUE-ESI-Q-TOF), analisando as principais preparações de uso popular das arnicas no Brasil (tinturas e chás).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS E ETNOFARMACOLOGIA

Os recursos vegetais permaneceram como parte integrante da sociedade humana ao longo da história. Depois de satisfazer as necessidades primárias como alimentação e abrigo, o homem passou a procurar alternativamente remédios adequados entre as plantas para curar várias doenças. A medicina tradicional é definida como a medicina de diferentes culturas que é usada para manter a saúde, prevenir, diagnosticar e tratar doenças físicas e mentais de maneira diferente da medicina alopática, sendo baseada em teorias, crenças e experiências (WHO, 2011). A medicina tradicional tem sido usada há milhares de anos com grandes contribuições feitas pelos praticantes para a saúde humana, particularmente como provedores de cuidados primários de saúde em nível comunitário e tem mantido sua popularidade em todo o mundo (WHO, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 70% a 90% da população nos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional baseada em plantas medicinais no que se refere à atenção primária à saúde (WHO, 1993; 2011). Em alguns países industrializados, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, o uso de produtos da medicina tradicional é igualmente significativo, onde 70% a 90% de sua população utilizada esta medicina sobre a denominação de complementar, alternativa ou não convencional (WHO, 2011).

No Brasil, a primeira descrição sobre o uso de plantas para tratamento de patologias foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil de 1587, que descreve a utilização de produtos medicinais indígenas pelas colônias europeias, que diante da escassez de medicamentos europeus perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como fonte terapêutica (ARGENTA et al., 2011). Segundo Oliveira et al. (2009), esta relação entre homem-natureza e homem-plantas pode ser definido como Etnobotânica. O autor cita como termo com o

significado: “O estudo das inter-relações diretas entre seres humanos e plantas”.

O termo Etnobotânica foi introduzido no ano de 1895 pelo botânico taxonomista John W. Harshberger, da Pennsylvania University. Segundo Oliveira et al. (2009), a etnobotânica é uma área de conhecimento muito antiga, visto que o conhecimento sobre plantas úteis remonta à própria existência da humanidade, seja tanto para alimentação quanto para o alívio de doenças e enfermidades. Estudos etnobotânicos de registro de plantas, seus usos e formas terapêuticas (plantas medicinais) por grupos humanos têm oferecido a base para diversos estudos básicos e aplicados, especialmente no campo da fitoquímica e da farmacologia, inclusive como ferramenta para o descobrimento de novas drogas. Nesse contexto insere-se a Etnofarmacologia, como um ramo da Etnobiologia/Etnobotânica que trata das práticas médicas, especialmente remédios, usados em sistemas tradicionais de medicina. A definição mais aceita da etnofarmacologia é "a exploração científica multidisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem" (ELIZABETZKY, 1999).

No caso do Brasil, diversidade cultural e biológica (conhecimentos e práticas de seus habitantes) constituem um patrimônio de imenso valor cultural, incluindo plantas de interesse medicinal e potencial de mercado que podem ser possíveis fontes de geração de renda aliada a sustentabilidade ambiental (OLIVEIRA et al., 2009). Dessa forma, o incentivo a pesquisas com as espécies vegetais proporciona avanços importantes para terapêutica de várias patologias, como também vem fornecendo ferramentas extremamente úteis para o estudo de fisiologia e farmacologia proporcionando fontes seguras à população (LIMA, 2007).

2.2 FAMILIA ASTERACEAE

A família Asteraceae é considerada uma das maiores famílias de plantas floríferas dentro das angiospermas eudicotiledôneas, com

aproximadamente 1800-2000 gêneros e 24.000-30.000 espécies, o que representa cerca de 10% da flora mundial (FUNK et al., 2009). Apresenta distribuição cosmopolita, sendo disseminadas por todos os continentes e com representação mais ampla nas regiões temperadas e semi-áridas dos trópicos e subtropicais. Na América do Sul, esta família apresenta hábitos distintos, como ervas, subarbustos, arbustos, arvoretas e árvores (MELO; PEREIRA, 2016).

Em uma compilação de estudos realizada por Roque e Bautista (2008), estes apresentam características morfológicas que defendem a monofilia de Asteraceae, entre elas a presença de um capítulo modificado, ovário bicarpelar ínfero que desenvolve-se em uma cipsela com óvulo basal e reto e anteras sinânteras. Entretanto, segundo Funk et al (2009), devido ao grande número de espécies, diversidade morfológica e filogenética de Asteraceae, vários botânicos têm estabelecido sua própria classificação taxonômica para essa família o que dificulta principalmente a delimitação das subfamílias, tribos e subtribos.

A primeira descrição de espécies desta família foi realizada por Teofrasto, um filósofo grego datado de 300 anos a.C. No ano de 1792, foi realizada a primeira denominação da família definida por Dietrich Giseke pelo nome Compositae e posteriormente, no ano de 1822 por permissão do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB) a mesma passou a ser designada definitivamente como família Asteraceae (KATINAS; GUTIÉRREZ; CRISCI, 2007, CARVALHO, 2016). Assim, desde o primeiro esquema de classificação da família em 19 tribos por Cassini, em 1816, diversas propostas foram realizadas, modificando o número e a circunscrição destas, sendo atualmente reconhecidas 43 tribos para Asteraceae (Funk et al. 2009).

No Brasil, alguns trabalhos adotam o sistema de Bremer (1994), que divide a família em 17 tribos distribuídas em três subfamílias: Asteroideae (10 tribos), Cichorioideae (6 tribos) e Barnadesioideae (1 tribo) (Quadro 1). Outra classificação ainda aceita, porém por reduzido número de pesquisadores, é a proposta por Andenberg et al. (2007) que inclui a descrição morfológica de 1620 gêneros, avaliando principalmente os gêneros Aster, Eupatorium, Vernonia

e Senécio. Mais recentemente, Funk et al (2009) propuseram um novo sistema de classificação taxônomica, atualmente mais aceito, que inclui muitas das supersubtribos propostas por Andenberg et al (2007), e 43 tribos. Na Figura 01 encontram-se descritos os principais sistemas de classificação intrafamiliares taxonômicos da família Asteraceae, compilado por Ramos (2011).

Quadro 1 - Classificação das subfamílias e tribos de Asteraceae segundo Bremer (1994). Incluindo as espécies avaliadas no presente estudo.

Sub família	Tribo	Número de espécies	Sub tribo (arnicas)	Arnicas utilizadas no presente estudo
Asteroideae	Inuleae	480	-	-
	Plucheeae	220	-	-
	Gnaphalieae	1728	-	-
	Calenduleae	113	-	-
	Astereae	2846	<i>Solidagininae</i>	<i>Solidago chilensis</i>
	Anthemideae	1737	-	-
	Senecioneae	3247	-	-
	Helenieae	835	<i>Madiinae</i>	<i>Arnica montana</i>
	Heliantheae	2449	<i>Tagetinae</i>	<i>Porophyllum ruderale</i>
	Eupatorieae	2396	<i>Neurolaeneae</i>	<i>Calea uniflora,</i>
Cardueae	2513	<i>Ecliptinae</i>	<i>Sphagnticola trilobata</i>	
Lactuceae	2486	<i>Alomiinae</i>	<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	
Cichorioideae	Vernonieae	1346	<i>Lychnophorinae</i>	<i>Lychnophora sp</i>
	Liabeae	159	-	-
	Arctoteae	139	-	-
Barnadesioideae	Barnadesieae	29	-	-
Não classificada	Multisieae	318	NE	<i>Chaptalia nutans</i>
TOTAL		23104		

Legenda: Não encontrado (NE)

Figura 01 - Sistemas de classificação intrafamiliares taxonômicos da família Asteraceae

CASSINI (1813)	HOFFMANN (1890)	BREMER (1994)	ANDERBERG <i>et al</i> (2007)	FUNK <i>et al</i> (2009)
Tribo Lactuécés	Tribo Vernoniaceae	Subfamília Barnadesioideae	Subfamília Barnadesioideae	Subfamília Barnadesioideae
Tribo Labiatiflorées	Tribo Eupatorieae	Tribo Banadesieae	Tribo Banadesieae	Tribo Banadesieae
Tribo Carduacéés	Tribo Astereae	Subfamília Cichorioideae	Subfamília Mutisioideae	Subfamília Stifftioideae
Tribo Carlinéés	Tribo Inuleae	Tribo Mutisieae	Tribo Stifftieae	Tribo Stifftieae
Tribo Xéranthéméés	Tribo Heliantheae	Tribo Cardueae	Tribo Mutisieae	Subfamília Mutisioideae
Tribo Echinopsidées	Tribo Helenieae	Tribo Lactuceae	Subfamília Carduoideae	Tribo Mutisieae
Tribo Arctoidées	Tribo Anthemidae	Tribo Vernoniaceae	Tribo Gochnatieae	Tribo Onoserideae
Tribo Calendulacéés	Tribo Senecioneae	Tribo Liabeae	Tribo Hecastocleideae	Tribo Nassauvieae
Tribo Hélianthéés	Tribo Calenduleae	Tribo Arctoteae	Tribo Tarchonantheae	Subfamília Wunderlichioideae
Tribo Ambrosiacéés	Tribo Arctotideae	Subfamília Asteroideae	Tribo Dicomeae	Tribo Wunderlichieae
Tribo Anthémidées	Tribo Cynareae	Tribo Inuleae	Tribo Cynareae Cardueae	Tribo Hyalideae
Tribo Inuléés	Tribo Mutisieae	Tribo Plucheae	Tribo Pertyeae	Subfamília Gochnatioideae
Tribo Astéréés	Tribo Cichorieae	Tribo Gnaphalieae	Subfamília Cichorioideae	Tribo Gochnatieae
Tribo Sénécionéés		Tribo Calenduleae	Tribo Gymnarrheneae	Subfamília Hecastocleioideae
Tribo Tussilaginéés		Tribo Astereae	Tribo Moquinieae	Tribo Hecastocleideae
Tribo Eupatoriées		Tribo Anthemideae	Tribo Vernoniaceae	Subfamília Carduoideae
Tribo Vernoniées		Tribo Senecioneae	Tribo Liabeae	Tribo Dicomeae
		Tribo Helenieae	Tribo Cichorieae	Tribo Oldenburgieae
		Tribo Heliantheae	Tribo Gundelieae	Tribo Tarchonantheae
		Tribo Eupatorieae	Tribo Arctotideae	Tribo Cardueae
			Subfamília Asteroideae	Subfamília Pertyoideae
			Tribo Corymbieae	Tribo Pertyeae
			Tribo Senecioneae	<i>Catambix</i> incertae sedis
			Tribo Calenduleae	Subfamília Gymnarrhenoideae
			Tribo Gnaphalieae	Tribo Gymnarrheneae
			Tribo Astereae	Subfamília Cichorioideae
			Tribo Anthemideae	Tribo Cichorieae
			Tribo Inuleae	Tribo Arctotideae
				Tribo Eremothamneae
				Tribo Liabeae
				Tribo Vernoniaceae
				Tribo Platycaepheae
				Tribo Moquinieae
				<i>Heterolepis</i> incerdae sedis
17 tribos	13 tribos	3 subfamilias; 17 tribos	5 subfamilias; 36 tribos	12 subfamilias; 43 tribos

Fonte: Ramos (2011).

No mundo, cerca de 40 espécies pertencentes a família Asteraceae apresentam importância direta no consumo humano, entre estas encontram-se: alface (*Lactuca sativa* L.), chicória (*Cichorium endívia* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.) e carqueja (*Baccharis trimera* Less.). Além das citadas, outras espécies apresentam, além do potencial nutricional, potencial tecnológico, ornamental, farmacêutico, industrial ou fornecem néctar e pólen para a apicultura, além de forragem para a produção pecuária (SILVA, 2014).

Em 1988, Cronquist, sugeriu que o sucesso evolutivo da família possa ser atribuído em parte ao desenvolvimento de um sistema químico de defesa que inclui a produção combinada de compostos secundários, do tipo poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas. Desta forma, estudos de caracterização química de Asteraceae, confirmaram sua tese, apontando riqueza e variedade de metabolitos encontrados nos diferentes gêneros que contemplam a família Asteraceae, tais como poliacetilenos (CHRISTENSEN; LAM, 1991; POLLO et al., 2013; POLYANSKAYA; KOROLYUK; TKACHEV, 2007), terpenoides (KHAN et al., 2010; MALDONADO et al., 2014), cumarinas (MIYAZAKI et al., 2013), benzofuranos (ROMANO et al., 2008), alcaloides (TIDJANI et al., 2013), flavonoides (BENYAHIA; BENAYACHE; BENAYACHE, 2014) e lactonas sesquiterpênicas (MERCADO et al., 2014), sendo que estas duas últimas classes são reportadas na literatura como importantes marcadores quimiotaxonômicos dessa família (BOHLMANN et al., 1980, EMERENCIANO et al., 2007, Kelles et al., 2010, LUSA et al., 2015, Da SILVA, 2015, CARVALHO, 2016).

Dados de estudos etnofarmacológicos apresentam registros de aproximadamente 1000 espécies de Asteraceae utilizadas com fins terapêuticos (MONKS et al, 2002), entre estas podemos citar a arnica-do-cerrado ou arnica-brasileira (*Lychnophora ericoides*) utilizada no tratamento da dor, reumatismo, picada de insetos e como antiinflamatório (FERRARI et al., 2012).

Alguns trabalhos, como a compilação realizada por Semir e colaboradores (2011) denominada “Arnica endêmica das Serras do Brasil” apontam vinte e duas espécies de *Lychnophora* (Asteraceae), utilizadas com inúmeras finalidades terapêuticas, estabelecendo caracterização anatômica e partes do seu perfil químico e atividades biológicas. Demonstrando assim, a riqueza de informações e usos tradicionais das arnicas no Brasil.

2.3 ARNICAS NO BRASIL

O nome popular “arnica” descrito para o gênero *Lychnophora* e outros gêneros da família Asteraceae deriva do fato de apresentar relatadas propriedades terapêuticas muito semelhantes à da verdadeira Arnica (*Arnica montana*) que é utilizada na medicina desde a idade média e está estabelecida em compêndios oficiais, como as Farmacopeias Internacional e Brasileira (SEMIR et al., 2011).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é extenso e amplo devido à influência de diversas etnias, como os nativos, Africanos, e Europeos. Estes últimos, imigrantes europeus, quando chegaram ao Brasil se depararam com a falta da espécie nativa europeia *Arnica montana*, utilizada como anti-inflamatório. A falta desta espécie, levou os mesmos a buscarem outras espécies vegetais com características semelhantes (principalmente o aroma do óleo essencial) para utilizar como anti-inflamatório tópico substituto da *A. montana* (MARIOSIA, 2006). A partir de então, juntamente com a miscigenação de etnias, foi mencionada pela primeira vez nas fazendas de café em Minas Gerais a espécie *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), conhecida popularmente como “arnica brasileira”, “arnica-da-serra” ou “arnica -falsa”. Essa seleção teve como base a semelhança do odor do óleo essencial e com o passar do tempo, quase todas as espécies com alguma semelhança morfológica passaram a ser utilizadas indiscriminadamente, o que torna várias espécies do gênero *Lychnophora* sucedâneas da *A. montana* (SEMIR et al., 2011). A espécie *Lychnophora ericoides* foi citada oficialmente em 1929, juntamente com a espécie *Solidago chilensis* (Farmacopeia brasileira, 1 ed.) utilizadas como anti-inflamatório e analgésico. Desde então, a utilização etnofarmacológica das arnicas no Brasil vem se estabelecendo (DUARTE et al., 2007).

A partir de um extenso levantamento bibliográfico, foram encontradas outras espécies no Brasil denominadas popularmente como arnicas, citando: *Solidago chilensis* Meyen (“arnica-brasileira”, “arnica-do-campo”), *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, R.M.King & H.Rob (“arnica -do-mato”), *Calea uniflora* Less (“Arnica-da-praia”), *Chaptalia nutans* (L.) Polák (“arnica -do-campo”, “língua-de-vaca”), *Porophyllum ruderale*(Jacq.) Cass. (“arnica -paulista”, “couve-cravinho”, “arnica -da-praia”), *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) (“arnica”, “arnica -do-campo”, “arnica -do-mato”). De *Lychnophora*, as mais comumente

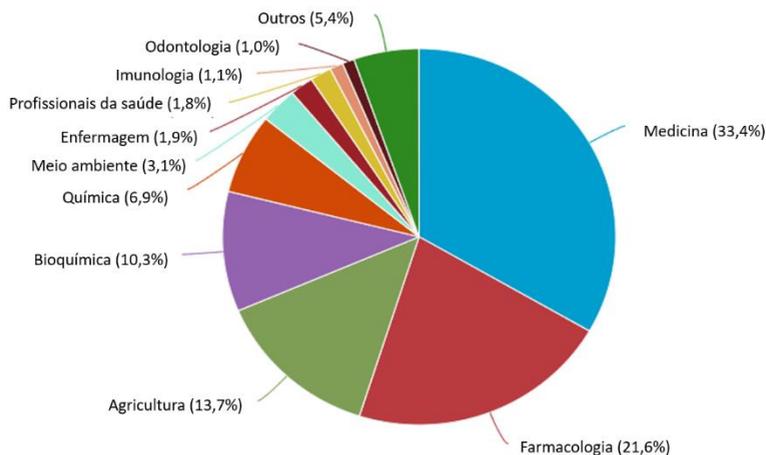
utilizadas são *Lychnophorapinaster*Mart, *L. ericoides*Mart , *L. salicifolia*Mart e *L. diamantinana*Coile & S.B.Jones (“Arnica-falsa”, “Arnica-do-cerrado”).

Além das citadas, outras espécies levam a mesma denominação, como espécies do gênero *Senécio* (“pseudo-arnica”) (Asteraceae), conhecido pela presença de alcalóides pirrolizidínicos e por este motivo o uso medicinal do gênero deve ser desincentivado (SANDINI et al., 2013). Em outros países, espécies vegetais também são descritas como “arnica”. Uma pesquisa realizada por Obón e colaboradores (2012) apontam cerca de 32 espécies de plantas diferentes, pertencentes a seis famílias distintas, denominadas como arnicas, pelo mundo. Como exemplo, no México é relatado a utilização da *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae) conhecida como “arnica -mexicana” (RODRÍGUEZ-CHÁVEZ et al., 2017), e a espécie *Pulicaria odora* (L.) Rchb. (Asteraceae) que cresce selvagem no Noroeste de Marrocos e é comumente utilizada em Portugal e na Espanha com o nome “erva-montã” ou montã (OBON et al., 2012).

2.4 ASPECTOS CIÊNTIFICOS RELACIONADOS A DENOMINAÇÃO “ARNICA”

Pesquisas utilizando a base de dados Scopus com a palavra-chave: **arnica**, levaram ao resultado de 1248 registros de documentos relacionados ao termo. Esta pesquisa contemplou documentos dos anos de 1828 até 2019. Destes documentos, a divisão em áreas de pesquisa demonstra um predomínio de publicações nas áreas da medicina (33,4%) e farmacologia (21,6%). Para a área química encontrou-se um total de 6,9% publicações e para a área botânica 13,7% (Figura 02 a 03).

Figura 02 – Documentos relacionados a pesquisa por arnica, divididos em áreas de pesquisa.



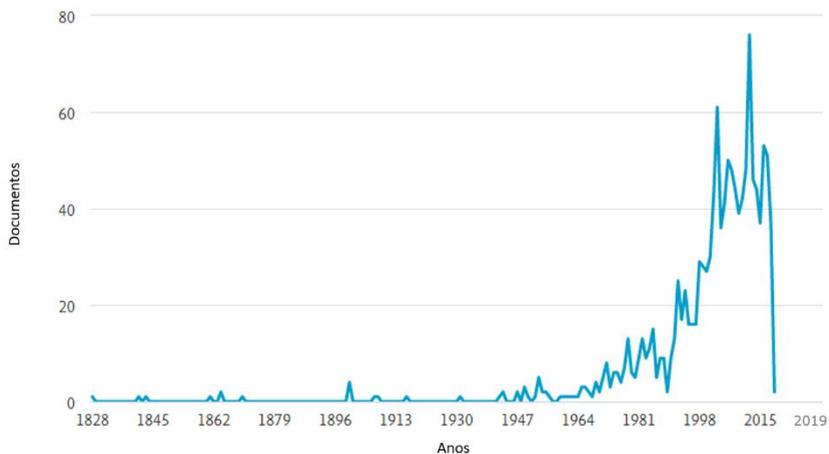
Fonte: base de dados Scopus, acesso em 25 de fevereiro de 2019.

Em relação aos documentos publicados por anos, é visível o crescente número de publicações utilizando como palavra-chave: arnica. Em uma visão global, o Brasil é o quarto país com maior número de publicações relacionadas a pesquisa por “arnica”, perdendo apenas para Alemanha, Estados Unidos e Itália. Estes dados demonstram a crescente pesquisa na área de plantas medicinais em todo o mundo, incluindo o Brasil, evidenciado pelo número de publicações relacionados a presente pesquisa.

Abaixo encontram-se os dados referentes aos documentos publicados por ano no período de 1828 a 2018 (Figura 03 A), bem como os documentos divididos por território/país (Figura 03 B).

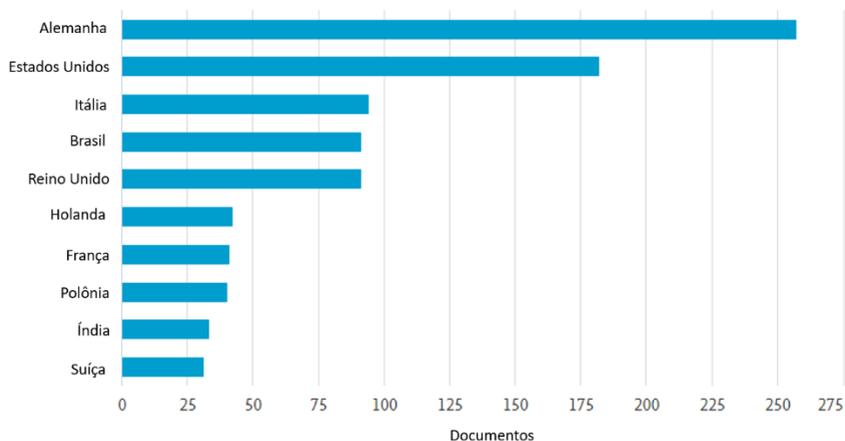
Figura 03 – Documentos publicados por ano (A) e território/país (B) relacionados a pesquisa por arnica.

A– Documentos por ano no período de 1828 a 2019 por áreas de pesquisa.



Fonte: base de dados Scopus, acesso em 25 de fevereiro de 2019.

B – Documentos por território/país.



Fonte: base de dados Scopus, acesso em 25 de fevereiro de 2019.

2.5 ASPECTOS QUÍMICOS DAS ARNICAS

Atualmente, distintas espécies conhecidas como arnicas vem sendo investigadas quimicamente no Brasil. Como exemplo cita-se a *Calea uniflora*, sendo verificada a presença de variadas classes de metabólitos secundários como: cromenos, cromanonas, flavonoides livres e heterosídeos, derivados do timol e terpenos destacando as lactonas sesquiterpênicas como componentes majoritários e indicadas como marcadores quimiossistemáticos para esse gênero *Calea* (CARVALHO, 2016).

Análises da constituição química do gênero *Lychnophora* revelam grande diversidade de metabólitos secundários, como poliacetilenos, flavonoides, cumarinas e terpenóides, apresentando como constituintes majoritários as lactonas sesquiterpênicas e flavonoides (SEMIR et al., 2011). Além disso, foram verificadas atividades biológicas relacionadas aos metabólitos presentes no gênero como, atividade anti-inflamatória, analgésica e anticonvulsivante além de outras ações farmacológicas (SEMIR et al., 2011, Carvalho et al., 2016). Segundo Melo e colaboradores (2009) e Pavarine & Lopes. (2016), a presença das lactonas sesquiterpênicas goiasensolido e centraterina em *L. ericoides* está associada a inibição do processo inflamatório. Cientificamente, os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios ainda não são totalmente comprovados para todas as espécies do gênero (SEMIR et al., 2011). Uma revisão bibliográfica com os principais constituintes químicos encontrados nas espécies conhecidas como “arnica” no Brasil encontra-se na Tabela 1.

Abordagens anatômicas também vem sendo relatadas para as espécies. Estudo realizado por Budel e colaboradores (2006) demonstrou algumas estruturas internas de *Calea uniflora*; Duarte et al. (2007) comparou *Chaptalia nutans* e *Porophyllum ruderale* quanto a alguns caracteres microanatômicos; Souza et al (2017) realizaram uma descrição morfoanatômica detalhada das folhas de *Solidago chilensis*. Entre outras pesquisas.

Contudo, estes estudos ainda são insuficientes para uma comparação inequívoca entre as espécies devido à falta de padronização entre as técnicas utilizadas de forma a abranger estruturas anatômicas, testes histoquímicos, forma de extração e metodologias de caracterização visando um controle de qualidade seguro, padronizado e adequado

levando em consideração o uso tradicional. Outro fato importante é nomenclatura popular muito semelhante, gerando confusão entre as espécies e conseqüentemente levando muitas vezes a identificação errônea destas.

Tabela 1. Principais classes e substâncias encontrados nas arnicas estudadas. Sendo, *Arnica montana* (AM), *Sphagneticola trilobata* (ST), *Solidago chilensis* (SC), *Calea uniflora* (CU), *Porophyllum ruderale* (PR), *Chaptalia nutans* (CU), *Pseudobrickellia brasiliensis* (PB), *Lychnophora ericoides* (LE), *Lychnophora salicifolia* (LS), *Lychnophora pinaster* (LP) e *Lychnophora diamantinana* (LD).

A. FLAVONÓIDES

Substâncias	Espécies										
	AM	ST	SC	CU	PR	CN	PB	LE	LS	LP	LD
FLAVONAS											
apigenina								LE ^(F,G)			
apigenina glicosilada								LE ^(F,G)			
crisina								LE ^(F)	LS ^(K)	LP ^(K)	LD ^(G)
crisina glicosilada								LE ^(F,G)			
luteolina		ST ^(k)	SC ^(a)				PB ^(C)				
luteolina glicosilada								LE ^(F)			
3', 4', 7-trihidroxi-flavona-7- <i>o</i> -β-glicopiranosideo				CU ^(s)							
5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona		ST ^(j)									
5,3',4'-trihidroxi-7- metoxiflavona		ST ⁽ⁱ⁾									
5,7- dihidroxi -4'- metoxiflavona (acetina)								LE ^(F)			
3,7,4'- trihidroxiflavona								LE ^(F)			
3-metil-galangina								LE ^(F)			
FLAVANONAS											
naringenina								LE ^(F,G)			

pinocembrina								LE ^(F,G)	LS ^(K)	LP ^(K)	LD ^(G)
pinostrobrina								LE ^(F,G)	LS ^(K)	LP ^(K)	LD ^(G)
pinobanksina								LE ^(F,G)	LS ^(K)		LD ^(G)
FLAVONOIS											
afzelechina			SC ^(a)								
galangina								LE ^(F)			
campferol	AM ^(N)		SC ^(a)								
resocampferol								LE ^(F)			
patuletina	AM ^(N)		SC ^(a)								
quercetina	AM ^(N)	ST ^(k)	SC ^(b)	CU ^(s)	PR ^(v)	CN ^(A)	PB ^(C)	LE ^(F,G)	LS ^(J)	LP ^(M)	
quercetina hetersideo	AM ^(N)	ST ^(k)	SC ^(a)	CU ^(s)							
quercetina-7,3',4'-trimetil-eter									LS ^(J)		
quercetol								LE ^(F,G)			
rutina	AM ^(N)				PR ^(v)						
CHALCONAS											
buteina				CU ^(r)							
butein 4' - <i>o</i> -glicopiranosídeo				CU ^(r)							
α -hidroxi-buteina				CU ^(r)							
2',4-dihidroxi-3-metoxi-chalcona-4'- <i>O</i> - β - glicopiranosideo				CU ^(s)							
2',4',3,4- α -pentahidroxichalcona				CU ^(s)							

B. CUMARINAS, CROMENOS E CROMANONAS

Substâncias	Espécies										
	AM	ST	SC	CU	PR	CN	PB	LE	LS	LP	LD
CUMARINAS											
umbeliferona	AM ^(O)										
escopoletina	AM ^(O)					CN ^(B)					
7- <i>o</i> -β-d-nutanocumarina- glicopiranosideo						CN ^(B)					
4- <i>o</i> -gluco- piranosil-5-metoxicumarina						CN ^(B)					
9 ^l - <i>o</i> - nutanocumarina- glicopiranosideo						CN ^(B)					
Nutanocumarina						CN ^(B)					
CROMENOS											
eugenina				CU ^(t)							
noreugenina				CU ^(t)							
CROMANONAS											
2,2-dimetil-6-(1-hidroxi-etil)- cromanona				CU ^(t)							
uniflorol b				CU ^(t)							
uniflorol a				CU ^(t)							

C. DERIVADOS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Substâncias	Espécies										
	AM	ST	SC	CU	PR	CN	PB	LE	LS	LP	LD
DERIVADOS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS											
ácido quinico	AM ^(O)		SC ^(c,d)	CU ^(u,r)	PR ^(v)						
ácido cafêico	AM ^(O)		SC ^(c)	CU ^(u,r)						LP ^(L)	
ácido gálico			SC ^(d)	CU ^(r)	PR ^(v)						
cafeato de etila		ST ^(m)		CU ^(r)							
ácido cinamico										LP ^(L)	
ácido 3- <i>o</i> -cafeoilquinico	AM ^(O)	ST ^(l)	SC ^(c)	CU ^(r)					LS ^(J)		
ácido 4- <i>o</i> -cafeoilquinico								LE ^(F)	LS ^(J)		
ácido 5- <i>o</i> -cafeoilquinico									LS ^(J)	LP ^(L)	
ácido 3,4- <i>o</i> -cafeoilquinico		ST ^(l)	SC ^(c)	CU ^(r)					LS ^(J)		
ácido 4,5- <i>o</i> -cafeoilquinico		ST ^(l)	SC ^(c)	CU ^(r)				LE ^(F)	LS ^(J)		
ácido 3- <i>o</i> - <i>p</i> -cumaroilquinico									LS ^(J)		
ácido 4- <i>o</i> - <i>p</i> -cumaroilquinico									LS ^(J)		
ácido 5- <i>o</i> - <i>p</i> -cumaroilquinico									LS ^(J)		
ácido 3- <i>o</i> - <i>e</i> -cumaroil-1,5- <i>o</i> - <i>p</i> -cafeoilquinico									LS ^(J)		
ácido 3- <i>o</i> - <i>e</i> -cafeoil-1,5- <i>o</i> - <i>p</i> -cafeoilquinico									LS ^(J)		
ácido 4- <i>o</i> - <i>e</i> -feluroil-1,5- <i>o</i> - <i>p</i> -cafeoilquinico									LS ^(J)		
ácido 3,4-di- <i>o</i> - <i>p</i> -cumaroilquinico									LS ^(J)		
ácido 4-cafeoil-1-5-feluroilquinico								LE ^(F)			

ácido 4,5- feluroilquinico			LE ^(F)	
ácido 3- <i>o</i> - feluroilquinico			LE ^(F)	
ácido 4- <i>o</i> - feluroilquinico			LE ^(F)	
ácido 5- <i>o</i> - feluroilquinico			LE ^(F)	LS ^(J)
ácido vanílico	ST ⁽ⁱ⁾	CU ^(s)		
ácido 2-senecioil-4-(metoxi-etil)- fenol		CU ^(s)		
ácido 2-senecioil-4-(angeloiloxi- etil)-fenol		CU ^(s)		
ácido 2-senecioil-4- (pentadecanoiloxi-etyl)-fenol		CU ^(s)		
ácido 2-senecioil-4-(hidroxi-etil)- fenol		CU ^(s)		
ácido protocatecuico				LS ^(J)

β -cubebeno				PR ^(x)		
elemeno				PR ^(x)		
isocomeno				PR ^(x)		
sabineno				PR ^(x)		
2,3-diidro-1,8-cineolo				PR ^(x)		
terpinoleno				PR ^(x)		
trans- β -ocimeno				PR ^(x)		
β -ciclocitral				PR ^(x)		
cuminol				PR ^(x)		
α -terpineno					PB ^(D)	
γ -terpineno					PB ^(D)	
α -terpineol					PB ^(D)	
(-)-germacra-1(10),5(e)- dien-4 β -ol					PB ^(D)	
cumeno	AM ^(R)					
camfeno	AM ^(R)	ST ⁽ⁿ⁾				LE ^(G)
tuja-2,4(10)-dieno	AM ^(R)	ST ⁽ⁿ⁾				
α -felandrene	AM ^(R)	ST ⁽ⁿ⁾	SC ^(f)	PR ^(x)		
β -felandrene				PR ^(x)		
<i>p</i> -cymene	AM ^(R)	ST ⁽ⁿ⁾			PB ^(D)	
limoneno	AM ^(R)		SC ^(f)	PR ^(x)	PB ^(D)	LE ^(G)
linalol	AM ^(R)		SC ^(f)			LE ^(G)
α -isocomeno	AM ^(R)			PR ^(x)		
metil eugenol	AM ^(R)					
cariofileno	AM ^(R)		SC ^(f)			LE ^(G)
<hr/>						
SESQUITERPENOS						
eugenol	AM ^(R)					
β -farneseno	AM ^(R)		SC ^(f)			
α -humuleno	AM ^(R)		SC ^(f)			

germacreno d	AM ^(R)	SC ^(f)		PB ^(E)
α-muuroleno	AM ^(R)			
γ-cadineno	AM ^(R)	SC ^(f)		
Δ-amorpheneo	AM ^(R)			
β-sesquifelandreno	AM ^(R)			
sesquisabineno	AM ^(R)			
espatulenol	AM ^(R)	SC ^(f)	PR ^(w)	PB ^(D)
salvial-4(14)-1-ona	AM ^(R)			
humuleno epoxido	AM ^(R)			
α-cadinol	AM ^(R)			
β-bisabolol	AM ^(R)			
cadaleno	AM ^(R)			
α-bisabolol	AM ^(R)			
curcumeno				LE ^(G)
turmerol				LE ^(G)
dihidro-ar-turmerona				LE ^(G)
α-eudesmol		SC ^(f)		
diidroeuodesmol		SC ^(f)		
cariofileno		SC ^(f)		PB ^(D)
nerolidol		SC ^(f)		

LACTONAS
SESQUITERPENICAS

helenalina	AM ^(Q,P)	SC ^(g)		
helenalina metacrilato	AM ^(Q)			
6-0-isobutiril-	AM ^(Q)			
tetrahidrohelenalina				
helenalina acetato	AM ^(Q)			
11,13-dihidrohelenalina	AM ^(Q)	SC ^(g)		
arnicolideo d	AM ^(Q)			

wedelolactona	ST ^(o)		
paludolactona	ST ^(o)		
trilobolideo-6-o-isobutirato	ST ^(p)		
triloboideo-6-0-angelato	ST ^(p)		
triloboideo-6-0-methacrylate	ST ^(p)		
oxidoisotrilobolideo-6-0-isobutirato	ST ^(p)		
oxido-iso-trilobolideo-6-0-methacrilato	ST ^(p)		
oxido-iso-trilobolideo-6-0-angelato	ST ^(p)		
wedeloide a	ST ^(p)		
wedeloide b	ST ^(p)		
desacetileupaserrina		CU ^(t)	
2- α -hidroxi- δ - β -2',3',5'trihidroxi-angeloiloxicostunolideo		CU ^(t)	
2- α -hidroxi - δ - β -3'-hidroxi -2'5'epoxiangeloiloxi-costunolideo		CU ^(t)	
ovatifolina		CU ^(t)	
crisanina			PB ^(D)
2',3'-epoxi-15-deoxigoiazensolideo			LE ^(G)
diidroeremantolideo a			LE ^(G)
eremanteolideo a			LE ^(G)
15-desoxigoiazensolideo			LE ^(G)

15-acetoxigoiazensolideo				LD ^(G)
Goiazensolideo		LE ^(G)		
(4 <i>s</i> ,6 <i>r</i> ,7 <i>s</i> ,8 <i>s</i> ,10 <i>r</i> ,11 <i>s</i>)-1-oxo- 3,10-epoxy-8- angeloyloxigermacre-2-en- 6(12)-olideo		LE ^(l)		
2',3'-diidro-15- deoxigoiazensolideo		LE ^(G)		
lychnofolideo		LE ^(G)		
lychnofolideo b		LE ^(G)		
costenolideo			LS ^(G)	
eremantina			LS ^(G)	
furanoheliangolideo				LP ^(G)
goiazensolideo				X ^(G)
15- acetoxicentraterineo				X ^(G)
entraterineo				X ^(G)

DITERPENOS

ácido ilopico	ST ^(p)			
solidagenona		SC ^(h)		
deoxisolidagenona		SC ^(h)		
trans-sabinol	ST ^(p)			
ácido caurenóico	ST ^(p)		PB ^(d)	
ácido-3 α -cinamiloxicaur- 16- <i>iso</i> -19-oico	ST ^(p)			
ácido 3 α -tigloioxicaur-16- <i>isso</i> -19-oico	ST ^(p)			
ácido ent-caur-9(11), dieno -19 oico ácido (grandiflorenicol)	ST ^(p)			

ácido ent-caur-15-iso-19-oico (ácido isso-caurenóico)	ST ^(P)
ácido (3 α)-3-(angeloiloxi)-ent-caur-16-en-19 oico	ST ^(P)
ácido 3 α -(angeloiloxi) 9 β -hidroxi-ent- caur -16en-19 oico	ST ^(P)

TRITERPENOS

lupeol			LS ^(G)	LP ^(M)	
lupeol acetato			LS ^(G)	LP ^(M)	
lupanol acetato			LS ^(G)		
friedelino				LP ^(M)	
ácido lychnopholico		LE ^(G)	LS ^(G)	LP ^(M)	LD ^(G)
α -amirina	PB ^(D)	LE ^(G)	LS ^(G)	LP ^(M)	
α -amirina acetato	PB ^(D)		LS ^(G)	LP ^(M)	
β -amirina	PB ^(D)	LE ^(G)	LS ^(G)	LP ^(M)	
β -amirina acetato	PB ^(D)		LS ^(G)	LP ^(M)	
pseudotaraxasterol	PB ^(D)				
3- <i>o</i> -acetil-pseudotaraxasterol				LP ^(M)	
taraxasterol	PB ^(D)				
15- acetoxicentraterino					LD ^(G)
entraterina					LD ^(G)

Cubebina	LE ^(G)
Metilclusina	LE ^(G)
Yateina	LE ^(G)
A-metilcubebina	LE ^(G)
Hinokinina	LE ^(G)
Ácido lychnphorico	LE ^(G) LS ^(G) LP ^(G) LD ^(G)
Ácido lychnphorico acetil	LE ^(G) LS ^(G) LP ^(G) LD ^(G)

Referências: (a)FREIRES et al.,2010; (b) GASTALDI et al.,2018; (c)TAMURA et al.,2009; (d)SABIR et al., 2012; (e)SCHMEDA-HUSCMANN et al.,2002;(f) MARIN, 2014; (g)PRUDENCIO, 2012; (h) VECHIA et al.,2016; (k) CARVALHO, 2001; (l) LANG et al.,2017; (m) FILHO et al.,2004; (n) VERMA et al.,2013; (o) FILHO et al.,2000; (q) BATISTA et al.,2010; (r) LIMA et al.,2015; (s) LIMA et al.,2017; (t) NASCIMENTO et al.,2007; (u) WILDINER et al.,2016; (v) FONSECA et al.,2006; (x) GUILLET et al.,1998; (y) TAKAHASHI et al.,2011; (w) RAGGI et al.,2013; (z) LIMA-NETO et al.,1996; (A) BADILLA et al.,2000; (B) TRUTTI et al.,1988; (C) ALMEIDA, 2017; (D) AMORIM et al.,2016; (E) BOHLMANN et al.,1984; (F) GOBO-NETO et al.,2005; (G) SEMIR et al.,2011; (H) BORELLA et al.,1998; (I) SAKAMOTO et al.,2003; (J) GOUVEA et al.,2012; (K) SILVA et al.,2013; (L) FERREIRA et al.,2005; (M) ABREU et al.,2009; (N)ALFREDO et al., 2008; (O)NASCIMENTO, 2007; (P) BRASIL, 2010; (Q)MACIEL, 2006; (R)KOWALSKI et al.,2015.

2.6 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS

A anatomia vegetal tem uso diário e continua a ser uma excelente ferramenta para ajudar a resolver diversos problemas, entre eles a identificação correta de espécies vegetais. Vale ressaltar a importância da identificação correta de espécies vegetais com objetivos de estudos químicos e farmacognósticos na busca de novas substâncias bioativas. Ou seja, a anatomia vegetal é um requisito fundamental na condução de experimentos com plantas embora a parte de identificação botânica ainda seja negligenciada por pesquisadores em produtos naturais (CUTLER et al., 2011).

A avaliação microscópica de espécies vegetais, representou por muitos anos uma técnica única oferecendo uma visão abrangente da planta. Atualmente, novas técnicas são utilizadas para fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos, estruturas vegetais além de outras aplicações. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação ultraestrutural de caracteres microscópicos, sendo utilizada em várias áreas de pesquisa. A MEV utiliza um feixe de elétrons no lugar dos fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado a fonte de luz branca. Outra característica importante do MEV é a resolução tridimensional das imagens de forma a complementar a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID et al., 2007).

No entanto vale lembrar que a MEV é uma técnica dispendiosa, já que faz uso de equipamento de elevado custo. Já as técnicas para microscopia de luz possuem um custo relativamente baixo e são de grande valia para o controle de qualidade de drogas vegetais.

2.7 CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-EM

A cromatografia compreende um grupo variado de importantes métodos que possibilitam separar e identificar compostos (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009). Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) ocupa lugar de destaque devido à facilidade e rapidez com que efetua separação, identificação e quantificação de espécies químicas (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). Na área farmacêutica, há vasta aplicação podendo ser utilizada desde processos qualitativos de componentes medicinais até o doseamento de princípios ativos (LÜ *et al.*, 2012).

A cromatografia líquida (CL), em especial a CLUE hifenada a espectrometria de massas (MS) apresenta várias vantagens, como alta seletividade, quantificação de íons selecionados e picos sobrepostos, boa detectabilidade, possibilidade de avaliação da pureza dos picos, confirmação da presença do analito mediante a informação de massa molar exata e informações estruturais diagnósticas (COLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A técnica de CL-EM tem desfrutado de uma popularidade crescente como uma plataforma para estudos metabolômicos de espécies vegetais devido ao seu alto rendimento e boa cobertura de metabólitos (ZHOU et al., 2012). Um exemplo, da aplicação desta técnica para caracterização de espécies de uso popular, é o estudo realizados por Blum-Silva e colaboradores (2016) com uma planta nativa da América do Sul (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) que identificou vinte compostos em extratos da planta e suas frações relacionadas utilizando CLUE-DAD e CLUE-ESI-qTOF.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e comparar espécies utilizadas no Brasil como arnica através de técnicas microscópicas para determinação da morfoanatomia das espécies e utilização da técnica cromatográfica CLUE-DAD-ESI-qTOF para análise de desreplicação dos extratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e comparar a morfoanatomia das espécies utilizando técnicas microscópicas e testes histoquímicos.
- Obter extratos conforme a utilização popular das espécies: *Arnica montana*, *Calea uniflora* Less, *Chaptalia nutans* (L.) Polák, *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B.Jones, *Lychnophora ericoides* Mart, *Lychnophora pinaster* Mart, *Lychnophora salicifolia* Mart e, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.), *Solidago chilensis* Meyen, *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, R.M.King & H.Rob.
- Desenvolver um método cromatográfico simples e rápido por CLUE-ESI-qTOF para avaliação das espécies;
- Realizar análise de desreplicação dos extratos obtidos;
- Identificar os marcadores majoritários presentes nos extratos obtidos de cada espécie;
- Avaliar os dados obtidos e correlaciona-los com a literatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi dividido para uso no estudo morfoanatômico (4.1.1) e estudo do perfil químico. (4.1.2)

4.1.1 Estudo morfoanatômico

As amostras de indivíduos das espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Porophyllum ruderale*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* foram coletadas pela autora do presente estudo no estado de Santa Catarina no ano de 2017. Estas amostras foram identificadas pelos professores Rafael Trevisan e Pedro Fiaschi do Departamento de Botânica da UFSC e uma excisata de cada amostra foi depositada no Herbário Flor da Universidade Federal das Santa Catarina (UFSC). As amostras de indivíduos das espécies do gênero *Lychnophora* utilizadas no estudo foram doadas pela professora Dr^a. Makeli Garibotti Lusa do Departamento de Botânica da UFSC e a espécie *Pseudobrickellia brasiliensis* foi doada pelo Herbário Flor da UFSC. Os códigos de cada excisata encontra-se no Quadro 2.

4.1.2 Estudo do perfil químico

As amostras de indivíduos das espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Porophyllum ruderale*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* foram coletadas pela autora do presente estudo no estado de Santa Catarina no ano de 2017. Estas amostras foram identificadas pelos professores Rafael Trevisan e Pedro Fiaschi do Departamento de Botânica da UFSC e uma excisata de cada amostra foi depositada no Herbário Flor da Universidade Federal das Santa Catarina (UFSC). As amostras de indivíduos das espécies do gênero *Lychnophora* utilizadas no presente estudo foram obtidas trituradas por doação: Prof. Dr. Fernando B. da Costa e Prof. Dr. Leonardo Gobbo Neto da Universidade São Paulo (USP-RP). A espécies de *Pseudobrickellia brasiliensis* foi doada, também na forma triturada, pela Prof^a. Dr^a. Cristiane Fernanda Fuzer Graef da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Os códigos de cada excisata encontram-se no Quadro 02.

Quadro 02 - Número de tombamento das exsiccatas

Espécie	Código da Exsiccata	Herbário
Uso geral^o		
<i>Arnica montana</i> (L.)*	-	-
<i>Calea uniflora</i> Less	FLOR63637	Flor **
<i>Chaptalia nutans</i> (L.) Polák	FLOR63636	Flor **
<i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass	FLOR63635	Flor **
<i>Solidago chilensis</i> Meyen	FLOR63638	Flor **
<i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski	FLOR63634	Flor **
Estudo morfoanatômico		
<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B.Jones	Loeuille et al. 530	SPF****
<i>Lychnophora ericoides</i> Mart	Pirani 1726	SPF****
<i>Lychnophora pinaster</i> Mart	Mello Silva 1389	SPF****
<i>Lychnophora salicifolia</i> Mart	Mello Silva 3000	SPF****
<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (Spreng.)	FLOR46719	Flor **
Estudo do perfil químico		
<i>Lychnophora ericoides</i> Mart	Paula et al. 2015	SPF****
<i>Lychnophora pinaster</i> Mart	Oliveira et al. 471	SPF****
<i>Lychnophora salicifolia</i> Mart	Mello Silva 3000	SPF****
<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (Spreng.)	DIAM 1096 e DIAM 1296.	DIAM ****

* Amostra comercial, identificada conforme os parâmetros descritos na Farmacopéia brasileira 5 ed (BRASIL, 2005); **Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina; ***Herbário da Universidade de São Paulo; ****Herbarium da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). ^oEspécies utilizadas para estudo anatômico e do perfil químico.

4.2 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS DAS ARNICAS

A investigação morfoanatômica das folhas das arnicas e os testes histoquímicos foram realizados em parceria com o Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVEG) vinculado ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2.1 Análise das superfícies adaxial e abaxial das folhas utilizando Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As folhas (N=3) foram fixadas utilizando solução de FAA (etanol 70%, formalina 40%, ácido acético glacial PA) por um período de 24h. Após, foi realizada a desidratação em série crescente de etanol (80%, 90% e 100%) 20 minutos cada. Posteriormente, foi seccionado um pequeno quadrado da região mediana das folhas e este material foi seco utilizando o método do ponto crítico e por fim, as amostras foram metalizadas (Figura 4) (Fernandes, 2014). Os materiais foram e examinados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV / JEOL JSM-6701F / JEM-1011 / JEM-2100 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), Florianópolis.

Figura 04 – Representação ilustrativa de preparo de amostra para MEV.



4.2.2 Análise morfoanatômica interna e externa das folhas utilizando microscopia de luz.

Para análise morfoanatômica, as folhas coletadas ($n = 3$) foram fixadas em solução de FAA 70 (JOHANSEN, 1940) sob condições de vácuo para remoção de ar dos tecidos vegetais e penetração do fixador e posteriormente os materiais foram armazenados em etanol 70% (Figura 5). O material herborizado foi hidratado utilizando método de Smith & Smith (1942) modificado, onde foi adicionado apenas uma gota de detergente á solução. Na sequência, foi selecionada a região mediana da folha (terço médio) e as amostras foram infiltradas em PEG 1500 (Figura 6).

As amostras infiltradas em PEG (Figura 7) foram seccionadas transversalmente com variação entre 15 a 35 μm de espessura usando um micrótomo rotativo (modelo RM 2125 RT Leica Microsystem, Nussloch, Alemanha).

Para preparo das lâminas permanentes, os cortes transversais foram corados com 0,05% de azul de toluidina em tampão citrato-fosfato, pH 4,5 (SAKAI, 1973) e fixado na lâmina utilizando Bálamo do Canadá sintético.

Para realizar a dissociação da epiderme, uma porção mediana das lâminas foliares, foram imersas em solução de Franklin, lavadas em água e coradas com safranina alcoólica (JOHANSEN 1940), para dissociação da epiderme. Após, o material dissociado foi colocado entre lâmina e lamínula com Gelatina.

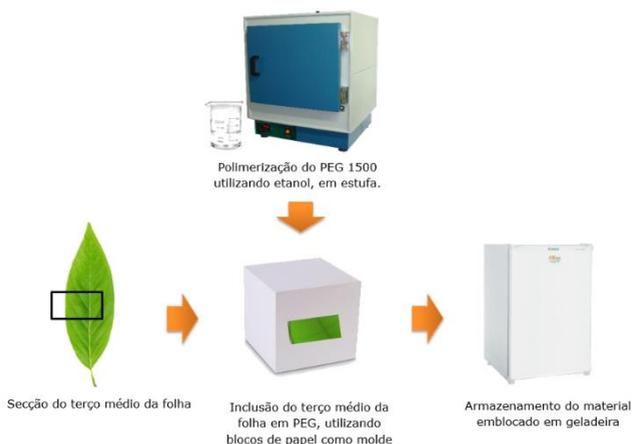
Figura 05 - Representação ilustrativa da fixação do material vegetal: Método de Johansen (1940).



Figura 06 - Representação ilustrativa da reversão da herborização: Método de Smith & Smith (1942) modificado



Figura 07 - Representação ilustrativa da inclusão em PEG



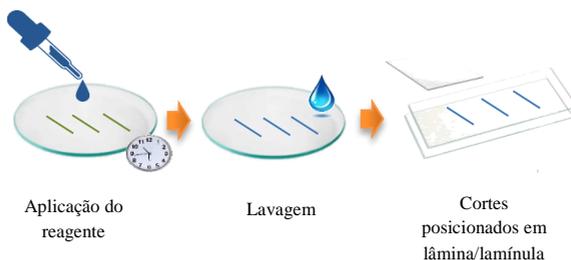
4.2.3 Testes histoquímicos

As reações histoquímicas foram escolhidas com base nas classes químicas de maior ocorrência na família Asteracea e foram realizadas com o material processado de acordo com o item 4.2.2. As seguintes reações químicas foram realizadas: Sudan IV (JENSEN, 1962) para compostos lipofílicos; ácido sulfúrico (GEISSMAN & GRIFFIN, 1971) para triagem de lactonas sesquiterpênicas; cloreto férrico a 3%

(JOHANSEN, 1940) para compostos fenólicos e vermelho de rutênio para compostos pécnicos. As seções foram examinadas imediatamente após cada reação. Na Figura 8 encontra-se a representação ilustrativa dos testes histoquímicos e preparo das lâminas.

As lâminas permanentes e os testes histoquímicos foram observados utilizando microscópio Olympus®, modelo CX21FS1 para as amostras com ácido e o Microscópio Leica®, modelo DM2500 acoplado á câmera de captura de imagens Leica®, modelo DFC29. Para verificação dos cristais foram realizadas fotomicrografias óticas sob luz polarizada obtidas em microscópio de luz polarizada Olympus BX50, acoplado com câmera Olympus DP 73.

Figura 08 - Representação ilustrativa dos testes histoquímicos e preparo das lâminas.



4.3 ANALISE DO PERFIL QUÍMICO

4.3.1 Soluções extrativas

Para o preparo das soluções extrativas foram utilizadas as partes aéreas das plantas, conforme o uso popular. Os materiais coletados foram secos em estufa com temperatura 45°C, rasuradas e triturados com auxílio de grau e pistilo. Estes materiais, bem como os materiais vegetais doados já pulverizado, foram padronizados com granulometria de 0,71 – 1,4 mm.

Para preparo das tinturas, foi utilizado, quando possível, 1g de planta triturada para 10mL de etanol 45°GL, obtendo tinturas a 10% (m/v) (Figura 9). O processo extrativo foi realizado por maceração estática a temperatura ambiente por três dias consecutivos e sob abrigo de luz. Cada tintura foi filtrada com papel filtro e armazenadas em geladeira (6°C) em frasco âmbar até utilização.

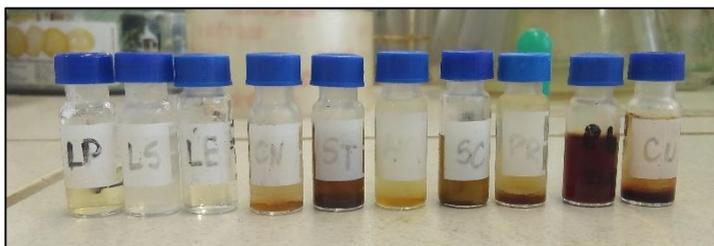
Para preparo dos chás, foi utilizado quando possível 0,1g de planta triturada para 10mL de água MiliQ, obtendo chás a 1% (m/v). O processo extrativo foi realizado por infusão, ou seja, foi realizada a adição de água fervente (10mL) ao material vegetal (0,1g) e mantido em recipiente fechado por 15 minutos, após este tempo, cada chá foi filtrado com papel filtro e armazenadas em geladeira (6°C) em frasco âmbar até utilização.

Uma alíquota do etanol e da água utilizados para realizar a extração hidroalcoólica (tintura) e aquosa (chá) foi reservada a fim de serem utilizados como branco de extração na análise por CL-EM.

As vidrarias utilizadas estão vinculados ao laboratório da Central Analítica do Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Na Figura 9 encontra-se a imagem das tinturas obtidas através do procedimento descrito acima, em viais.

Figura 09 – Tinturas (etanol 45%), obtidas conforme procedimento previamente descrito.



4.3.2 Análises por CL-EM

As tinturas obtidas foram submetidas a análise por Cromatografia líquida acoplado ao espectrometro de massas (CL-EM). Para isto foi utilizado Cromatografo WATERS® modelo Acquity UPLC, com injetor automático, forno e detector de arranjo de diódos (DAD), acoplado e hifenado ao espectrômetro de massa de alta resolução Xevo G2-XS QTOF (Quadrupole - Time Of Flight) (Waters®).

Para as análises empregou-se uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 150 mm i.d., 1,7 µm)(Waters) com temperatura de forno de coluna à 40 °C (± 2 °C) e temperatura do amostrador à 20 °C (± 2 °C). A fase movel utilizada constituiu de gradiente combinando de solução aquosa acidificada com ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) (A) e acetoneitrila (B). As condições do gradiente (A:B) aplicadas foram: 0-7 min (90:10), 7-10 min

(65:35), 10-13 min (50:50), 13-15min (10:90), 15-15,5 min(90:10) e 15,5 – 20min (90:10). O tempo total de análise foi 20 min com fluxo constante de 0,25mL/min e volume de injeção de 2 µL.

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, e antes de sua utilização foram filtrados por membrana (0,22 µm)

A fonte de ionização utilizada foi o electrospray (ESI), em modo positivo e negativo. Em modo positivo, a voltagem do capilar utilizada foi 3.0 kV, temperatura da fonte 90°C, temperatura de dessolvatação 120°C, fluxo de gás no cone de 200L/h, fluxo de gás de dessolvatação 900L/h. Em modo negativo, a voltagem do capilar utilizada foi 3.0 kV, temperatura da fonte 90°C, temperatura de dessolvatação 200°C, fluxo de gás no cone de 200L/h, fluxo de gás de dessolvatação 600L/h. Em ambos os modos trabalhou-se com Scan (faixa de m/z 100 – 1200) em modo Resolution. A aquisição dos dados foi realizada através do software MassLynx v4.1 (Waters®). Também trabalhou-se com DAD monitorado em 280 e 360nm. Este equipamento é vinculado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

As tinturas a 10% (m/v) e o branco de extração (EtOH 45% e água MiliQ) foram diretamente filtradas em membrana Millipore® (0,22 µm) e injetadas, sem diluição. Também foi realizando um branco utilizando metanol a fim de verificar demais interferentes.

4.3.3 Desrepliação dos extratos

A desrepliação dos extratos, (do inglês, dereplication) refere-se à identificação rápida de metabólitos secundários em uma espécie vegetal, sendo uma ferramenta utilizada para detecção de novos compostos bioativos na presença de metabólitos já conhecidos. Desta forma é necessária a utilização de métodos analíticos confiáveis, robustos e seletivos para a identificação destas substâncias nas espécies estudadas (YULIANA et al., 2011).

No presente estudo, a desrepliação dos extratos (tinturas e chás) foi realizada utilizando padrões disponíveis no laboratório Central Analítica do Departamento de Farmácia da UFSC e perfil de fragmentação de classes químicas já relatadas na literatura, sendo em sua maioria já descritos para as espécies, gênero, tribo ou família em estudo. Para busca de compostos descritos na literatura foi utilizada a base de dados Reaxys utilizando a Formula molecular exata ou o peso molecular das substâncias encontradas.

Padrões utilizados para o estudo: ácido cumárico, ácido cafêico, cafeato de etila, luteolina, rutina, quercitrina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS

5.1.1 Caracterização microanatômica

5.1.1.1 Nervura Central (NC)

Inicialmente foi avaliada a Nervura central (NC) em corte transversal. As espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans* e *Solidago chilensis* apresentaram como padrão de NC, formato biconvexo, com a região abaxial mais proeminente (Figura 10A, 10B, 10J). Os dados anatômicos encontrados referentes a estas espécies apresentam-se semelhantes com as descrições realizadas por Budel et al. (2006), Empinotti e Duarte (2006) e Souza et al. (2017) respectivamente para as espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans* e *Solidago chilensis*.

As espécies *Lychnophora diamantinana*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora pinaster* e *Lychnophora salicifolia* apresentaram NC com superfície adaxial com depressão central e face abaxial com projeção arredondada (Figura 10C - 10F). Para *Pseudobrickellia brasiliensis* foi observada uma NC sem saliências (Figura 10G).

Porophyllum ruderale apresentou uma forma de NC plano-convexa (Figura 10G). *Sphagneticola trilobata* apresentou uma forma de NC côncavo-convexa (Figura 10I). Os achados referentes a nervura central observados nas espécies *Sphagneticola trilobata* e *Porophyllum ruderale* encontram-se, respectivamente, de acordo com o descrito pelos autores Baccarin et al. (2009) e Milan et al. (2006).

Através da caracterização da NC das “arnicas” selecionadas, foi possível obter uma diferenciação preliminar entre as espécies avaliadas, especialmente em relação à forma de NC, sendo este um importante carácter anatômico para auxiliar na identificação e diferenciação das mesmas.

Na região da NC, todas as espécies apresentam epiderme unisseriada, sendo que as células epidérmicas apresentaram-se recobertas por cutícula. Adjacente à epiderme da *Calea uniflora* e *Chaptalia nutans*, foi observado colênquima angular voltado para a face adaxial (Figura 10A-10B). Para as espécies *Sphagneticola trilobata* e *Solidago chilensis* observou-se a presença de colênquima angular em ambas as superfícies (Figura 10I-10J).

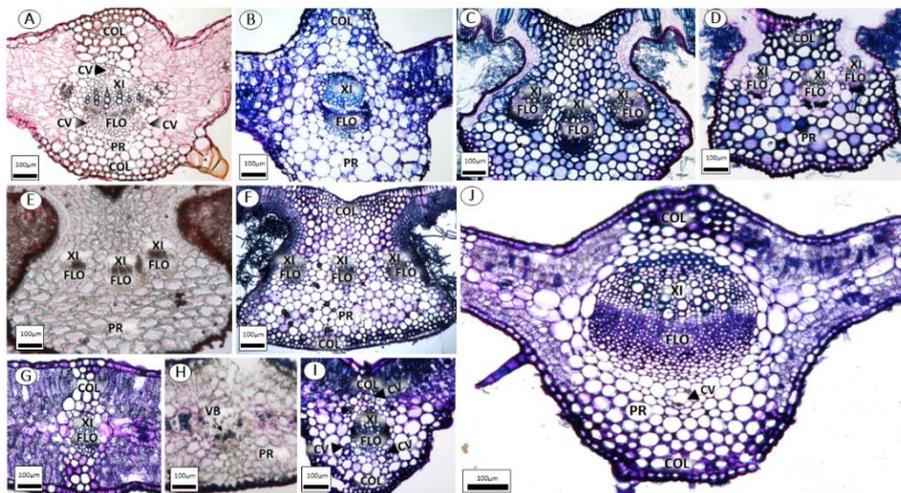
As espécies do gênero *Lychnophora* apresentaram um grande número de células de colênquima em ambas as superfícies (Figura 10C-

10F). *Porophyllum ruderale*, apresentou estratos de colênquima angular em ambas as faces com a extensão da bainha do feixe (Figura10G).

Estruturas secretoras internas foram observadas próximas aos feixes vasculares, dispersas no parênquima da NC. Os táxons *Calea uniflora* e *Sphagneticola trilobata* apresentaram duas cavidades secretoras inseridas no parênquima, sendo voltadas para a superfície abaxial e próximas ao floema e a outra cavidade logo acima do xilema em sentido a face adaxial (Figura10A, 10I). *Solidago chilensis* apresentou uma cavidade secretora voltada para face abaxial, inserida abaixo do floema na NC foliar (Figura10J). As outras espécies não apresentaram cavidades na região da NC (Figura10I).

Os feixes vasculares em secção transversal presentes na NC dos taxons *Calea uniflora* e *Lychnophora pinaster* encontram-se organizados em forma de arco aberto (Figura10A e 10E, respectivamente). *Chaptalia nutans* apresentou um feixe vascular relativamente cilíndrico (Figura10B). As espécies *Lychnophora diamantinana*, *L. ericoides* e *L. salicifolia* apresentaram três feixes vasculares independentes com forma cilíndrica (Figura 10C, 10D, 10F). *Porophyllum ruderale* apresentou feixe vascular pequeno e reto com extensão da bainha do feixe (Figura10G). *Pseudobrickellia brasiliensis* apresentou poucos feixes vasculares distribuídos ao longo do parênquima (Figura10H). *Solidago chilensis* apresentou um grande feixe vascular cilíndrico e, o táxon *Sphagneticola trilobata* apresentou feixes vasculares cilíndricos com dimensões pequenas (Figura10J-10I).

Figura 10 - Nervura Central (NC) em seção transversal das folhas totalmente expandidas das espécies de arnicas utilizadas popularmente no Brasil.



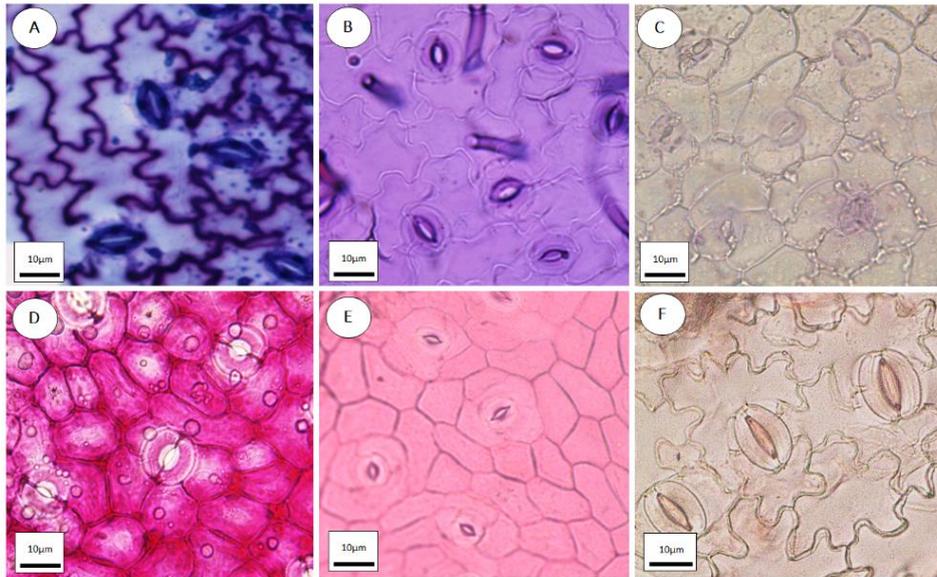
Legenda: A-J - microscopia de luz. A - *Calea uniflora*. B - *Chaptalia nutans*. C - *Lychnophora diamantinana*. D - *Lychnophora ericoides*. E - *Lychnophora pinaster*. F - *Lychnophora salicifolia*. G - *Porophyllum ruderale*. H - *Pseudobrickellia brasiliensis*. I - *Sphagneticola trilobata*. J - *Solidago chilensis*. B-D, F-J - coloração com azul de toluidina. A, E - coloração com vermelho de rutênio. Abreviações: COL - colênquima. XI - Xilema. FLO - floema. PAR - parênquima regular. ESC - esclerides. CV - cavidade secretora interna. A, J, I - presença de CV. E - presença de ESC. C-F - possíveis fibras esclerenquimáticas, abaixo do floema. Resultados: A, B, J - NC com forma biconvexa. C - F - NC apresentando face adaxial com depressão central e face abaxial com projeção arredondada. H - NC não saliente. G - forma de NC plano-convexa. I - NC côncava-convexa. A-J - células epidérmicas unisseriadas, cobertas por cutícula. Os feixes vasculares do arco aberto de E, E-. B - formação de feixes vasculares em formato de cordão. C-D, F - três feixes independentes com forma cilíndrica. G - feixe vascular pequeno e reto com extensão da bainha do feixe. H - feixes vasculares indefinidos. I - feixes vasculares em formato de cordão. J - formação de feixes vasculares cônicos e de pequenas dimensões.

5.1.1.2 Região intermediária do mesofilo (RI)

Na região intermediária do mesofilo (RI), entre a nervura central e o bordo, foi observada maior concentração de estômatos na face abaxial com características anomocíticas para as espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* (Figura 11A-11F). No entanto, devido à inserção dos estômatos nas criptas das espécies de *Lychnophora*, não foi possível identificar as formas das células de guarda, e por este motivo, não foi possível classificar os estômatos nestas espécies. Segundo Metcalfe e Chalk (1988), os estômatos anomocíticos são característicos da família Asteraceae

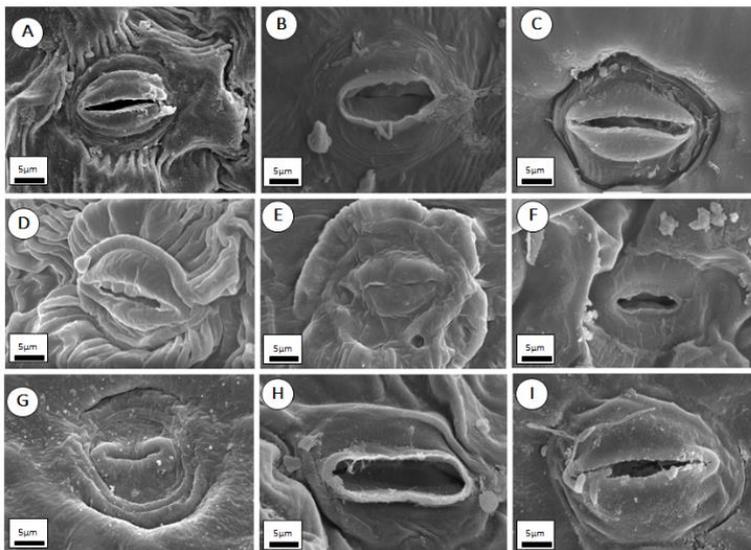
Através do MEV, pode-se verificar o nível dos estômatos em relação a epiderme, sendo o mesmo nível das células epidérmicas em *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans* e *Sphagneticola trilobata* (Figura 12A, 12B, 12H), abaixo da epiderme em *Lychnophora ericoides*, *Porophyllum ruderale* e *Pseudobrickellia brasiliensis* (Figura 12C, 12F, 12G), acima das demais células da epiderme em *Lychnophora salicifolia* e *L. pinaster* e *Solidago chilensis* (Figura 12D, 12E, 12I).

Figura 11- Estômatos e células epidérmicas em vista da superfície abaxial das folhas totalmente expandidas das arnicas utilizadas popularmente no Brasil.



Legenda: A-F - microscopia de luz. A - *Calea uniflora*. B - *Chaptalia nutans*. C - *Porophyllum ruderale*. D - *Pseudobrickellia brasiliensis*. E - *Sphagneticola trilobata*. F - *Solidago chilensis*. A-B - coloração com azul de toluidina. C-F - coloração com safranina. Resultados: A-F - características anomocíticas

Figura 12 - Estômatos em vista da superfície abaxial das folhas totalmente expandidas das arnicas utilizadas popularmente no Brasil. Observados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

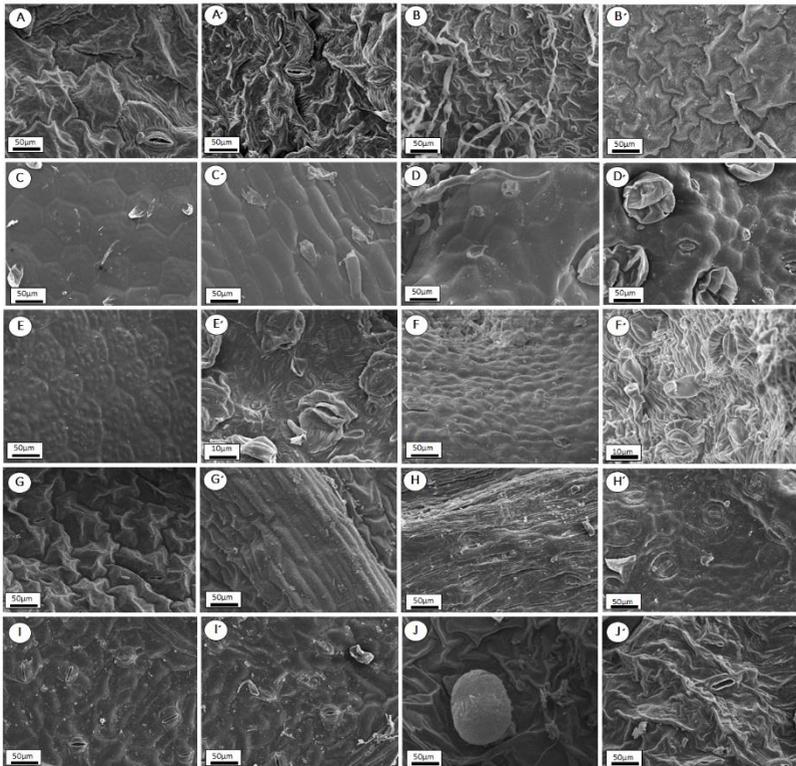


Legenda: A-I – MEV. A - *Calea uniflora*. B - *Chaptalia nutans*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Porophyllum ruderale*. G - *Pseudobrickellia brasiliensis*. H - *Sphagneticola trilobata*. I - *Solidago chilensis*. Resultados: A, B, H - nível regular dos estômatos em relação à epiderme. C, F-G - abaixo do nível da epiderme. D, E, I - acima do nível da epiderme.

O padrão de distribuição de estômatos na folha apresentou-se do tipo anfistomático (estômatos em ambas as superfícies), sendo verificado nas espécies *Calea uniflora*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* (Figura13A, 13G-13D', 13I-J). O padrão hipoestomático para as folhas foi observado nas espécies *Chaptalia nutans*, *Lychnophora diamantinana*, *L. ericoides*, *L. pinaster* e *L. salicifolia* (Figura13B-13F').

A avaliação da sinuosidade das células epidérmicas mostrou expressiva diferença entre as espécie avaliadas. As arnicas apresentaram a superfície foliar (ambas as faces) com epiderme uniforme, cujas células em vista frontal apresentaram paredes sinuosas aos táxons *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans* e *Sphagneticola trilobata* (Figura13A-13B', 13I-13I'). Paredes retas para as células epidérmicas foram observadas para *Porophyllum ruderale* (com células longas e retas na face adaxial), *Pseudobrickellia brasiliensis* (ambos os lados) e *Solidago chilensis* (ambos os lados) (Figura13G-13H', 13J-13J'). Para as espécies de *Lychnophora*, a forma das células foi identificada como reta, com as células na face adaxial sendo mais arredondadas e as células abaxiais mais alongadas (Figura13C-13F)

Figura 13. Células da Epiderme (Superfície Adaxial vs. Abaxial) das folhas totalmente expandidas das diferentes espécies de arnicas utilizadas popularmente no Brasil, por MEV.



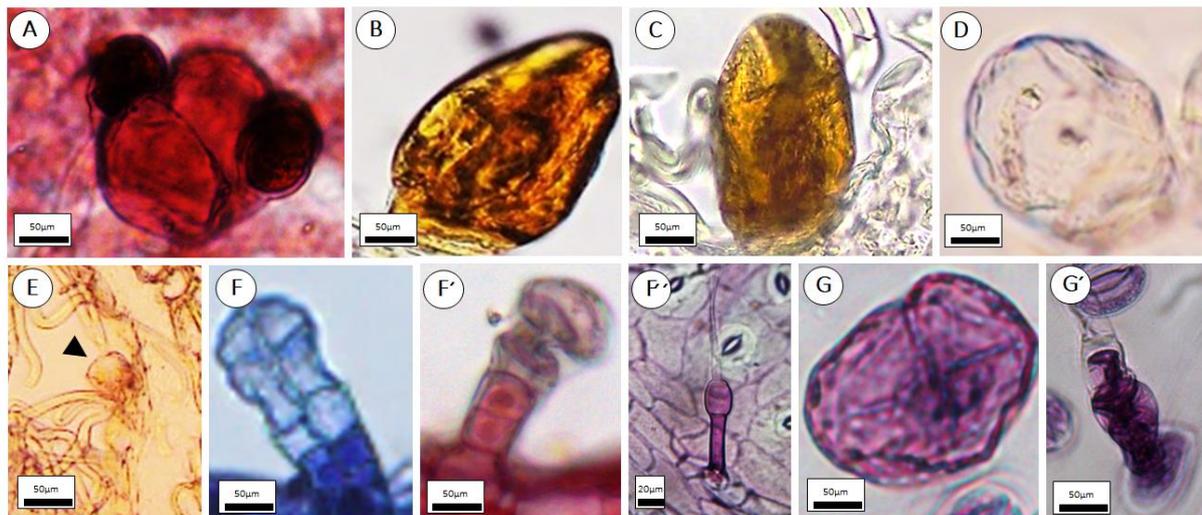
Legenda: Face Adaxial: A - *Calea uniflora*. B - *Chaptalia nutans*. C - *Lychnophora diamantinana*. D - *Lychnophora ericoides*. E - *Lychnophora pinaster*. F - *Lychnophora salicifolia*. G - *Porophyllum ruderale*. H - *Pseudobrickellia brasiliensis*. Eu - *Sphagneticola trilobata*. J - *Solidago chilensis*. Rosto abaxial: A' - *Calea uniflora*. B' - *Chaptalia nutans*. C' - *Lychnophora diamantinana*. D' - *Lychnophora ericoides*. E' - *Lychnophora pinaster*. F' - *Lychnophora salicifolia*. G' - *Porophyllum ruderale*. H' - *Pseudobrickellia brasiliensis*. I - *Sphagneticola trilobata*. J' - *Solidago chilensis*. Achados: A-J e A'-J' - epiderme uniforme (ambas as faces). A, B, I e A', B', I' - paredes sinuosas das células epidérmicas. G, H, J e G', H', J' - parede reta das células epidérmicas. C-F e C'-F' - parede reta das células epidérmicas na face adaxial (C-F) sendo mais arredondadas e as células abaxiais (C'-F').

Foi avaliada a presença de tricomas glandulares (TG) e não glandulares (NGT) nas folhas das espécies. A presença destas estruturas chamadas de anexos epidérmicos foram encontrados nas espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans* (somente TNG), *Lychnophora ericoides*, *L. diamantinana*, *L. pinaster* e *L. salicifolia*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* (Figura14A-14G, Figura15A-15G, Figura15A-15H e Figura16A-16H). As espécies *Porophyllum ruderale* e *Pseudobrickellia brasiliensis* apresentaram folha glabra, ou seja, sem tricomas, esta informação foi descrito previamente por Duarte et al. (2007).

No táxon *Calea uniflora*, os GT encontram-se inseridos em pequenas depressões na epiderme e podem ser classificados como multicelulares e bicelulares ou capitados com pedicelo unicelular e cabeça globosa (Figura14A e 15A), descrito também por Budel et al., (2007). Em *Chaptalia nutans*, numerosos TNGs foram encontrados predominantemente na superfície abaxial, conforme descrito por Empinotti & Duarte (2006).

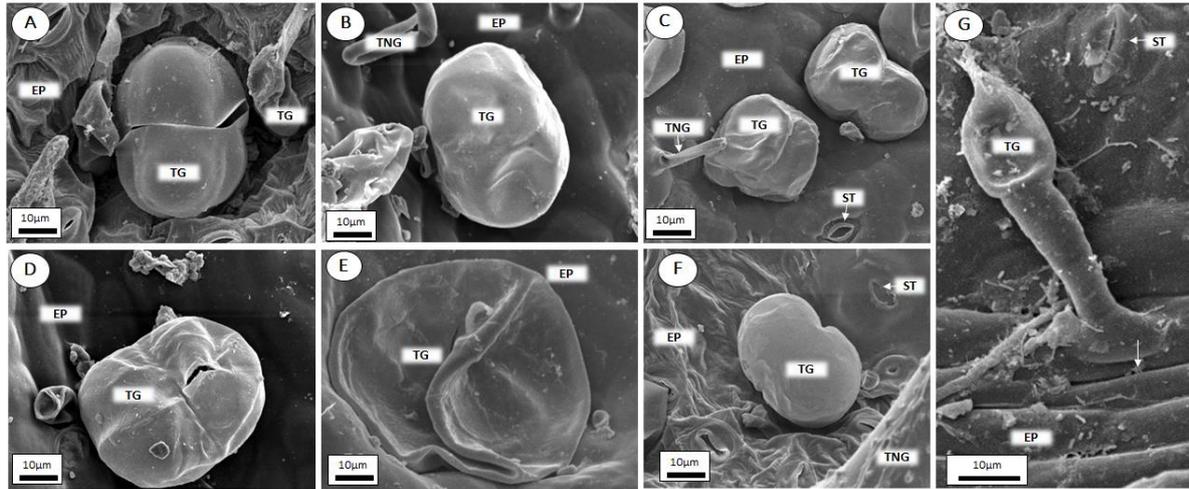
As espécies de *Lychnophora* avaliadas mostraram TG concentrado na face abaxial inclusos em criptas (Figura14B-14E e 15B-15E). *Solidago chilensis* apresentou tricomas glandulares multicelulares, plurisseriados e/ou capitados com pedicelo unicelular com células terminais alongadas (Figura14F-14F", 15G). *Sphagneticola trilobata* apresentou GT bisseriado em depressão e/ou unisseriado, multicelular com células terminais alongadas (Figura14G, 15F), o mesmo descrito por Baccharini et al. (2009).

Figura 14- Tricoma Glandular (TG) em seção transversal das folhas totalmente expandidas das espécies conhecidas popularmente como arnicas no Brasil. Utilizando microscopia de luz.



Legenda: A - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F, F', F'' - *Solidago chilensis*. G, G' - *Sphagneticola trilobata*. A, F', F'', G e G' - coloração com safranina. F - coloração com azul de toluidina. B, C, D, E - sem cor. Resultados: A - GT inserido em pequena depressão e multicelulares e bicelulares ou captados com pedicelo unicelular e cabeça globosa. B-D - TG incluso em criptas. F - TG Plurisseriado multicelular e / ou capitado com pedicelo unicelular com célula terminal alongada. G - TG bisseriado em depressão e / ou unisseriado multicelular com células terminais alongadas.

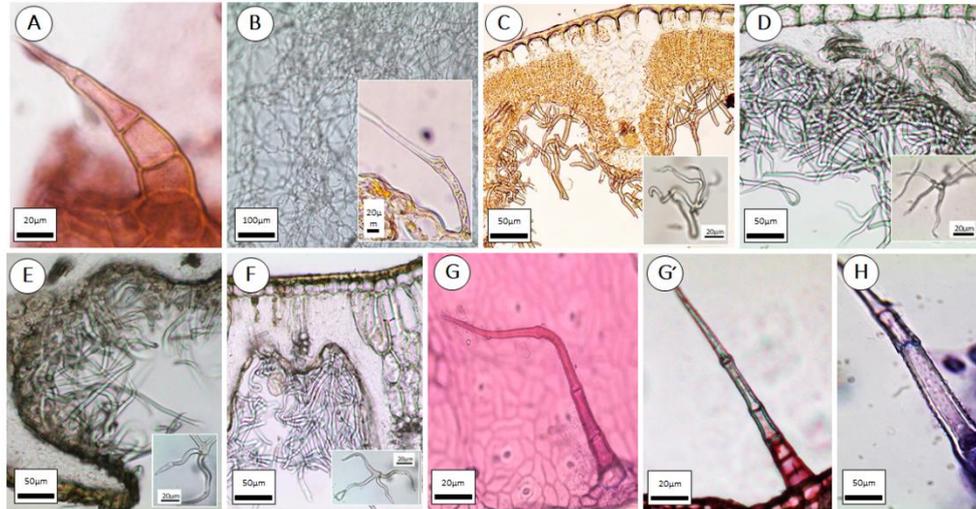
Figura 15 - Tricomas Glandulares (TGs) observados na superfície abaxial das folhas totalmente expandidas das espécies conhecidas popularmente como arnicas no Brasil. Utilizando MEV.



Legenda: A - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Sphagneticola trilobata*. G - *Solidago chilensis*. Abreviações: EP - epiderme. ST - estomate. GT - tricoma glandular. NGT - tricoma não glandular. Resultados: A - TG inserido em pequena depressão e multicelulares e bicelulares ou capeados com pedicelo unicelular e cabeça globoidea. B-D - GT incluso em criptas. F - TG plurisseriado multicelular e / ou capitado com pedicelo unicelular com célula terminal alongada. G - TG bisseriado em depressão e / ou unisseriado multicelular com células terminais alongadas.

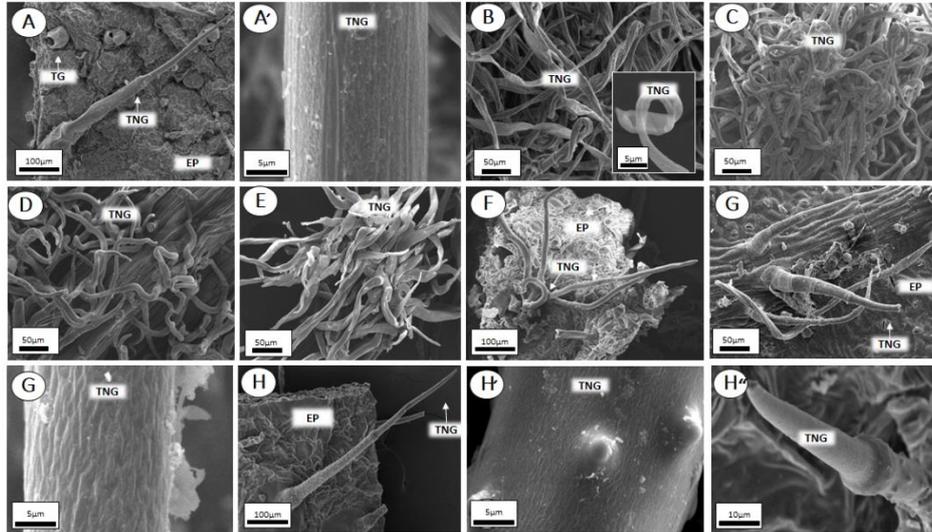
A presença de Tricomas não glandulares (TNG) também foi avaliada nas arnicas. Assim, constatou-se a presença de TNGs multicelulares (5-8 células) e unisseriados nas espécies *Calea uniflora*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* (Figura16A, 16G-16H e Figura17A, 17G-17H”). *Chaptalia nutans* apresentou longos e numerosos tricomas (Figura16B e 17B). As espécies de *Lychnophora* apresentaram tricomas estrelados (3-5 braços) variando em tamanho e largura, com espessamento celulósico e concentrados na face abaxial da folha entre criptas (Figura16C-16F e 17C-17F). *Solidago chilensis* mostrou TNG alongado, com base ligeiramente aumentada e célula terminal delgada (Fig.16G-16G’ e 17G-17G’). *Sphagneticola trilobata* apresentou tricomas com a célula basal da cutícula verrucosa (Figura16H e 17H-17H”).

Figura 16 - Tricoma Não Glandular (TNG) em seção transversal das folhas totalmente expandidas das folhas das arnicas avaliadas.



Legenda: A, *Calea uniflora*. B, B', *Chaptalia nutans*. C, *Lychnophora diamantinana*. D, *Lychnophora ericoides*. E, *Lychnophora pinaster*. F, *Lychnophora salicifolia*. G, G', *Solidago chilensis*. H, *Sphagneticola trilobata*. Resultados: A, G, G', H - coloração com safranina. B, C, D, E, F - sem cor. A, G, G'-H - multicelular (5-8 células) e unisseriada NGT. B - longa e numerosa TNG. C-F - tricomas estrelados (3-5 braços). G, G' - TNG alongado, com base ligeiramente alargada e célula terminal lisa. H - TNG com a célula basal da cutícula verrucosa.

Figura 17 - Tricomas não glandulares (TNG) das folhas das arnicas totalmente expandidas por MEV.



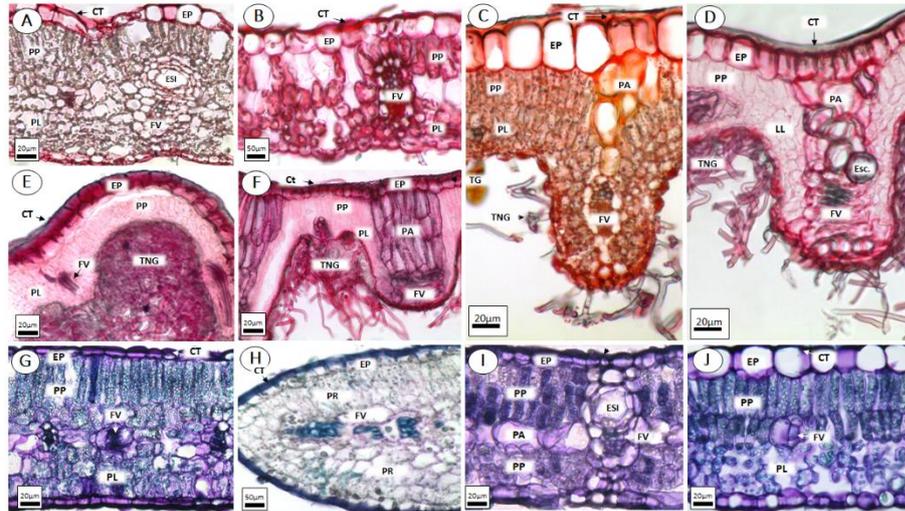
Legenda: A, A' - *Calea uniflora*. B, B' - *Chaptalia nutans*. C, C' - *Lychnophora diamantinana*. D - *Lychnophora ericoides*. E - *Lychnophora pinaster*. F - *Lychnophora salicifolia*. G - *Solidago chilensis*. H, H', H'' - *Sphagneticola trilobata*. Abreviações: EP - epiderme. ST - estomate. GT - tricoma glandular. TNG - tricoma não glandular. Resultados: A, G-H – TNG multicelular (5-8 células) e unisseriada. B - TNG longos e numerosa. C-F - tricomas estrelados (3-5 braços). TNG G - alongado, com base ligeiramente alargada e célula terminal delgada. H - TNG com a célula basal da cutícula verrucosa.

A região intermediária entre a nervura central e o bordo na porção do mesofilo (IR) apresentou parênquima dorsiventral para as espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Porophyllum ruderale* e *Sphagneticola trilobata* (Figura 18A, 18B, 18G, 18J). As espécies de *Lychnophora* apresentaram parênquima clorofiliano paliçádico (adaxial), clorofiliano lacunoso (abaxiais) e parênquima aquífero próximos aos feixes vasculares e com extensões da bainha do feixe, exceto para *L. pinaster* (Figura 18C-18F).

Pseudobrickellia brasiliensis apresentou mesofilo homogêneo, sem distinção entre as células (Figura 18H). *Solidago chilensis* apresentou mesofilo do tipo isobilateral com presença de parênquima aquífero na região média do mesofilo, interligando os feixes vasculares (Figura 18I). Em todas as espécies, os feixes apresentaram-se do tipo colateral, distribuídos na região mediana do mesofilo, sendo circundados por uma extensão da bainha do feixe parenquimática. Nas espécies *Calea uniflora* e *Solidago chilensis*, as extensões de bainha do feixe podem estar associadas a ductos secretores (Figura 18A, 18I). O *Lychnophora* apresentou extensão da bainha do feixe, cujas células possuem dimensões maiores (Figura 18C-18F).

A presença de idioblastos cristíferos foi verificada no *Lychnophora diamantina* (pequenas drusas). A ocorrência de compostos fenólicos, lipofílicos e pécticos também foi verificada sendo descritas a seguir.

Figura 18 - Região Intermediária do Mesofilo (RI) em secção transversal das folhas das arnicas. Folhas totalmente expandidas. Microscopia de Luz.



Legenda A - *Calea uniflora*. B - *Chaptalia nutans*. C - *Lychnophora diamantinana*. D - *Lychnophora ericoides*. E - *Lychnophora pinaster*. F - *Lychnophora salicifolia*. G - *Porophyllum ruderales*. H - *Pseudobrickellia brasiliensis*. I - *Solidago chilensis*. J - *Sphagneticola trilobata*. Abreviaturas: CUT - cuticula. PP - parênquima paliádico. LP - parênquima lacunar. AP - parênquima aquífero. PR - parênquima regular. FV - feixe vascular. ESC - Esclereide. EP - epiderme. TG - tricoma glandular. TNG - tricoma não glandular. ESI – estrutura secretora interna. Resultados: A-F - coloração com vermelho de rutênio. G- J - coloração com azul de toluidina. A, B, G, J - parênquima dorsiventral. C-F - estrato paliádico (adaxial), esponjoso (abaxial) e parênquima aquífero próximo aos feixes vasculares com extensão da bainha do feixe. H - mesofilo homogêneo. I - mesofilo isobilateral e parênquima aquífero (interligando os feixes vasculares). A-J – mesofilo do tipo colateral

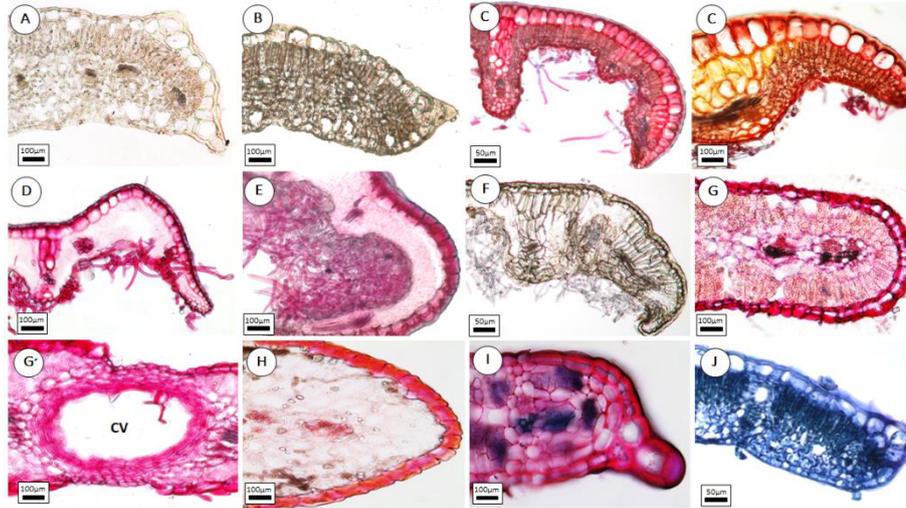
5.1.1.3 Bordo da folha

No presente estudo, entre os exemplares das arnica, observou-se diferença no bordo foliar em relação à flexão do mesmo e a distribuição das células do parênquima. As espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Lychnophora ericoides*, *L. diamantinana*, *L. pinaster*, *L. salicifolia* e *Sphagneticola trilobata* apresentaram bordas arredondadas e fletidas para face abaxial (Figura 19A-19F, 19I). Para as espécies de *Lychnophora* há uma acentuada flexão com visível estreitamento da margem (Figura 19C-19F). *Solidago chilensis* apresentou discreta flexão do bordo e com projeções epidérmicas para o exterior da folha (Figura 19I).

Por outro lado, as espécies *Porophyllum ruderale* e *Pseudobrickellia brasiliensis* apresentaram bordo reto, sem flexão ou pouca flexão (Figura 19G-19H). Curiosamente, observou-se uma grande cavidade secretora presente na margem de *Porophyllum ruderale* (Figura 19G -19G').

Em relação as células do mesofilo do bordo, as espécies avaliadas apresenta organização semelhante do mesofilo da porção intermediária, com exceção de *Solidago chilensis* com predomínio de parênquima aquífero nas extremidades (Fig. 19J).

Figura 19 - Margem foliar em seção transversal das folhas das arnicas totalmente expandidas.



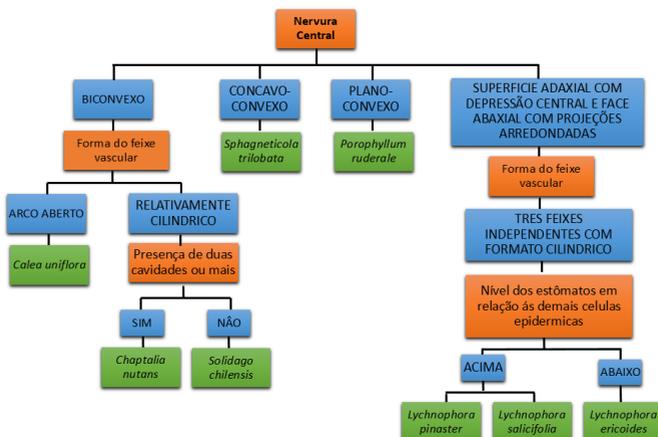
Legenda: A - *Calea uniflora*. B - *Chaptalia nutans*. C, C' - *Lychnophora diamantinana*. D - *Lychnophora ericoides*. E - *Lychnophora pinaster*. F - *Lychnophora salicifolia*. G, G' - *Porophyllum ruderale*. H - *Pseudobrickellia brasiliensis*. I - *Sphagneticola trilobata*. J - *Solidago chilensis*. A, B, F - coloração com cloreto férrico. C-E e G-I - coloração com vermelho de rutênio. J - azul de toluidina. Resultados: A-F, J - borda da folha arredondada e flexionada para a face abaxial. C-F - flexão com estreitamento da margem final. I - flexão discreta da margem com projeções epidérmicas para o exterior da folha. G-H - margem reta, sem flexão ou pouca flexão. G, G' - grande cavidade secretor na margem da folha.

5.1.2 Fluxograma de identificação das arnicas avaliadas neste estudo.

Para sistematizar a caracterização micromorfológica das arnicas avaliadas neste estudo, foi criado um fluxograma para auxiliar na diferenciação e identificação das espécies. Elementos anatômicos diagnósticos foram identificados e plotados em forma de fluxograma, tornando possível uma rápida identificação de espécies podendo estas estarem integras, rasuradas e pulverizadas (Figura 20A-20C).

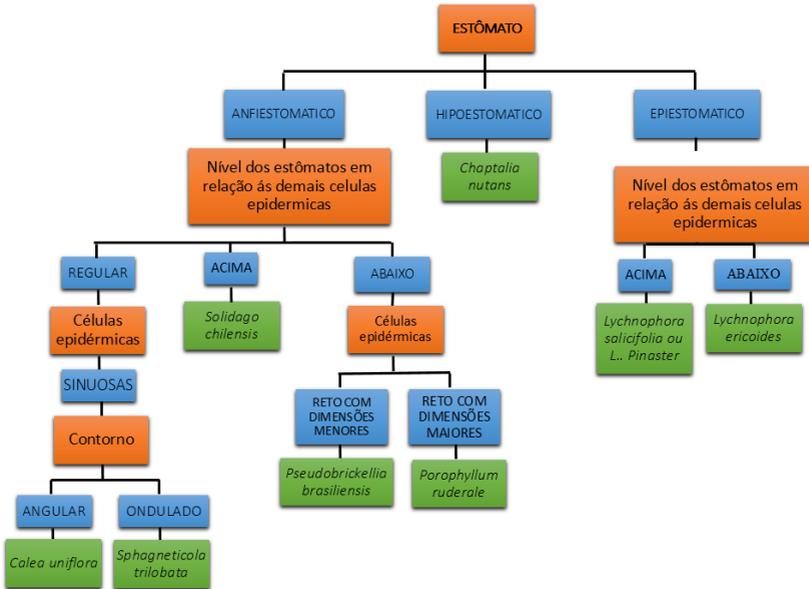
Figura 20 - Fluxogramas para identificação das arnicas, *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Lychnophora pinaster*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora salicifolia* e *Lychnophora diamantinana*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata* e *Solidago chilensis*, avaliadas através da nervura central (A), estômatos (B), tricomas glandulares e não glandulares (C).

A. Avaliação da Nervura Central como parâmetro anatômico para auxiliar na identificação das espécies.



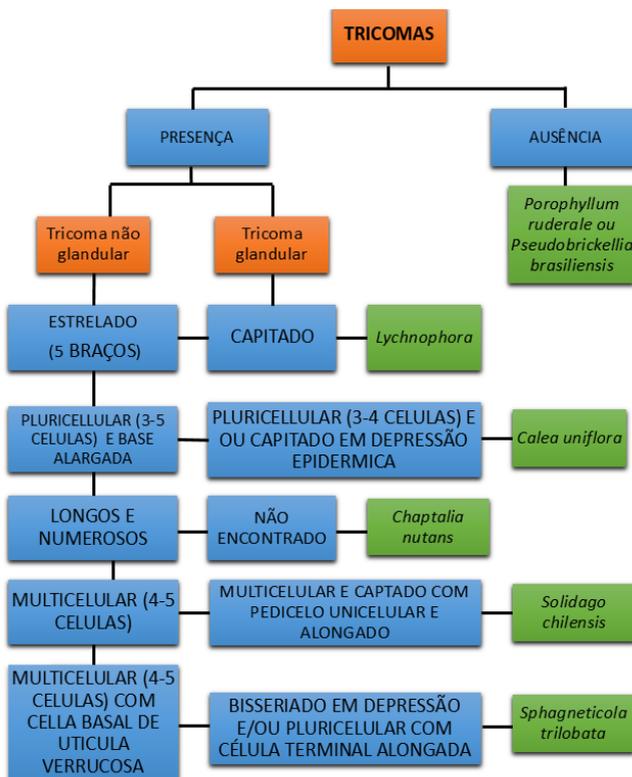
Legenda: Parâmetros anatômicos (alaranjado), definição anatômica e alvo (azul), confirmação de espécie (verde). Não foi possível identificar a espécie *Pseudobrickellia brasiliensis* e nem separar *Lychnophora pinaster* de *L. salicifolia*.

B. Avaliação dos estômatos como parâmetro anatômico para auxiliar na identificação das espécies.



Legenda: Parâmetros anatômicos (alaranjado), definição anatômica e alvo (azul), confirmação de espécie (verde).

C. Avaliação dos tricomas glandulares e não glandulares como parâmetro anatômico para auxiliar na identificação das espécies.



Legenda: Parâmetros anatômicos (alaranjado), definição anatômica e alvo (azul), confirmação de espécie (verde).

5.1.3 Caracterização histoquímica

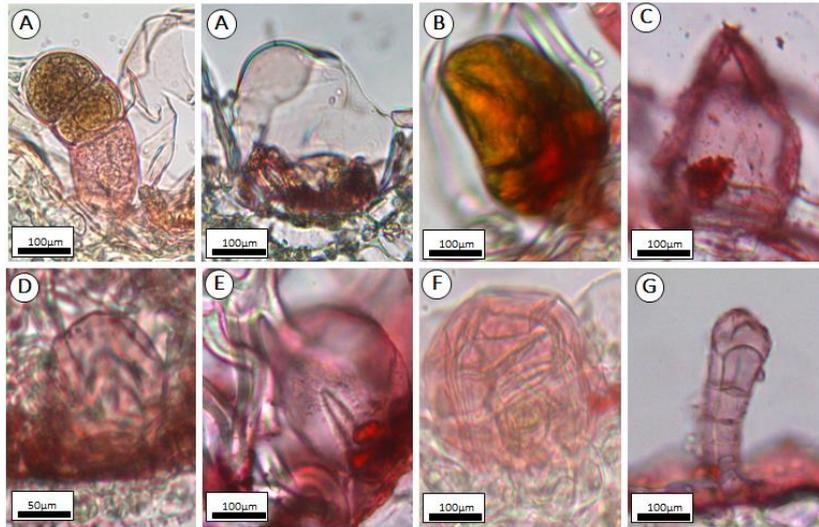
Os testes histoquímicos realizados demonstraram que os metabólitos secundários presentes nas arnicas são secretados e acumulados em estruturas secretoras específicas, como tricomas glandulares, idioblastos epidérmicos, tecidos secretores como o parênquima clorofílico lacunoso e aquifero, nervura central das folhas. Através das figuras observa-se reações positivas para substâncias lipofílicas, evidenciadas pelo Sudam

IV, através da coloração laranja a vermelho (Figura 21A e 21B); triagem de lactonas sesquiterpênicas evidenciadas pelo ácido sulfúrico, através da coloração vermelho, laranja/amarelo (Figura 22A e 22B); compostos fenólicos evidenciados por cloreto férrico com cor marrom (Figura 23A e 23B).

Os dados referentes aos testes histoquímicos e classes metabólicas sugeridas para secreções foliar das espécies encontram-se compilados na Tabela 2.

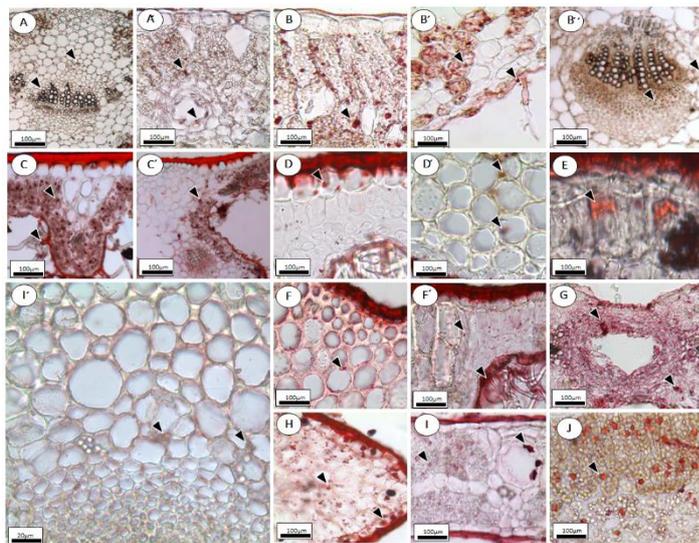
Figura 21 -Triagem para compostos lipofílicos (Sudam IV). Tricomas glandulares (A) e nervura central e células do mesofilo (B).

A. Tricoma Glandular (TG)



Legenda: A figura apresenta reações positivas (vermelho) para substâncias lipofílicas com acúmulo de metabólitos nos tricomas glandulares. A, A' - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C- *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Solidago chilensis*. G - *Sphagneticola trilobata*.

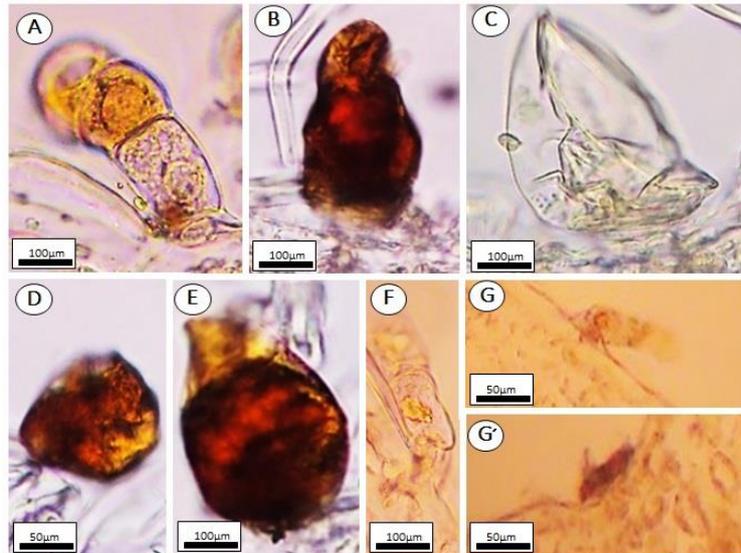
B. Nervura central e células do mesofilo



Legenda: A figura mostra reações positivas para substâncias lipofílicas com acúmulo e secreção de metabólitos nas células epidérmicas e outras estruturas secretoras das folhas. A, A' - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Solidago chilensis*. G - *Sphagneticola trilobata*. Resultados: A, B'', C', D', I', F' - NC com acúmulo de metabólitos nas células do parênquima. A', B, B', C, D, D', E, F', G, H, I, J, - acúmulo de metabólitos na epiderme e / ou parênquima clorofílico do mesofilo. A, A', G, I, I' - acúmulo de metabólitos na estrutura secretora interna. Padrão de reação na ponta da seta (vermelho).

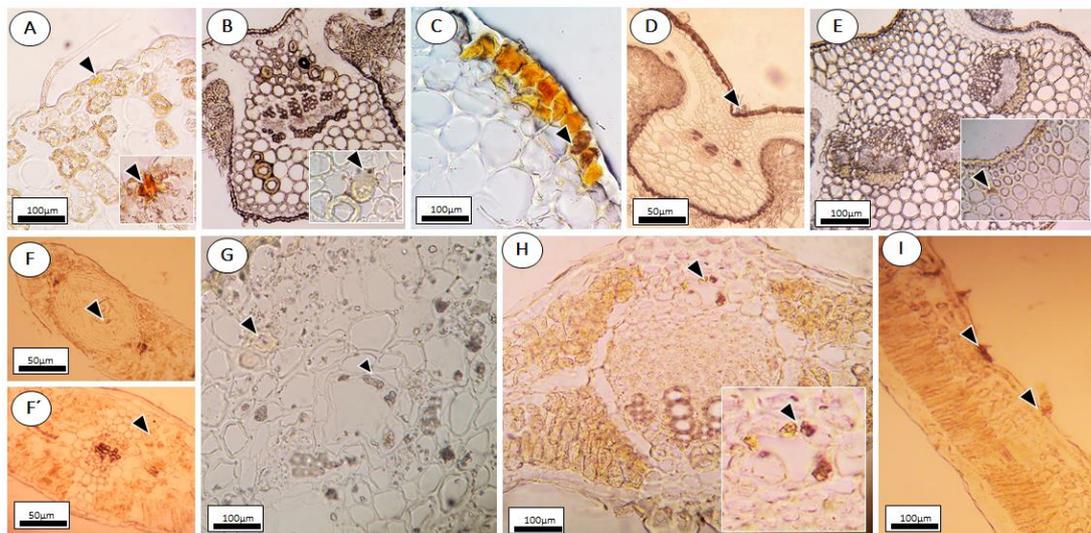
Figura 22. Triagem para Lactonas sesquiterpênicas (Ácido Sulfúrico). Tricomas glandulares (A) e nervura central e células do mesofilo (B).

A. Tricoma Glandular (GT)



Legenda: A figura mostra reações positivas (marrom / laranja) para triagem de lactonas sesquiterpênicas com acúmulo de metabólitos nos tricomas glandulares. A - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Solidago chilensis*. G, G' - *Sphagneticola trilobata*.

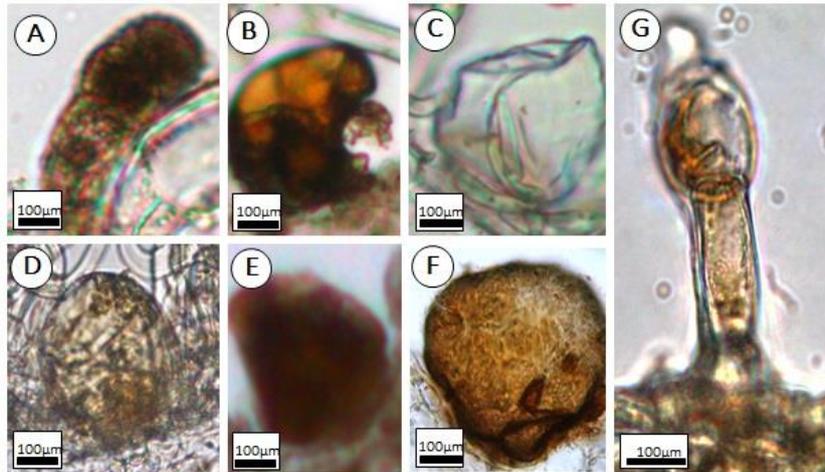
B. Nervura central e células do mesófilo



Legenda: A figura mostra reações positivas para triagem de lactonas sesquiterpênicas com acúmulo e secreção de metabólitos nas células epidérmicas e outras estruturas secretoras das folhas. A - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Solidago chilensis*. G - *Sphagneticola trilobata*. Achados: B, D, E, F', H, Midvein com acúmulo de metabólitos nas células do parênquima. A, C, F, G, H, I, - acúmulo de metabólitos na epiderme e / ou parênquima clorofílico do mesófilo. F, G, H - acumulação de metabólitos na estrutura secretora interna. Padrão de reação na ponta da seta (marrom / laranja).

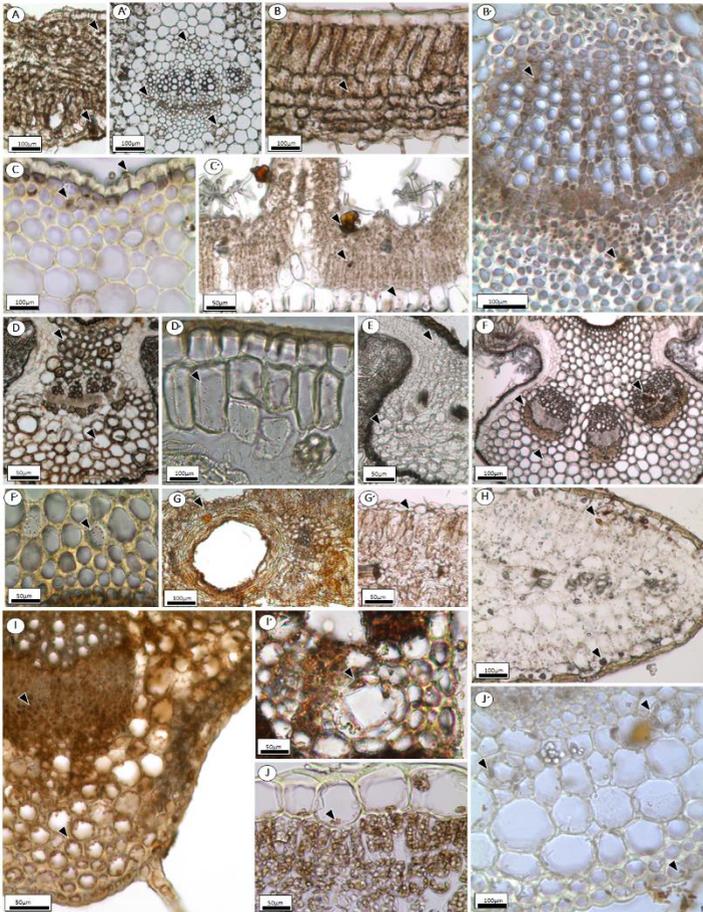
Figura 23. Triagem para compostos fenólicos (cloreto férrico). Tricomas glandulares (A) e nervura central e células do mesófilo (B).

A. Tricoma Glandular (GT)



Legenda: Reação histoquímica de substâncias fenólicas em cortes transversais das folhas das arnicas, destacadas por cloreto férrico. A figura mostra reações positivas (marrom) para substâncias fenólicas com acúmulo de metabólitos em tricomas glandulares. A - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Solidago chilensis*. G - *Sphagneticola trilobata*.

B. Nervura central e células do mesofilo



Legenda: A figura mostra reações positivas para substâncias fenólicas com acúmulo e secreção de metabólitos nas células epidérmicas e outras estruturas secretoras das folhas. A - *Calea uniflora*. B - *Lychnophora diamantinana*. C - *Lychnophora ericoides*. D - *Lychnophora pinaster*. E - *Lychnophora salicifolia*. F - *Solidago chilensis*. G - *Sphagneticola trilobata*. Achados: A', B', C, D, E, F, F', I, J' - midvein com acúmulo de metabólitos nas células do parênquima. A, B, C, D', G, G', H, I, J - acúmulo de metabólitos na epiderme e / ou parênquima clorofílico do mesofilo. A', G, I', J - acúmulo de metabólitos na estrutura secretora interna. Padrão de reação na ponta da seta (marrom).

As análises histoquímicas realizadas para as espécies de arnicas selecionadas confirmam a presença de classes químicas relacionadas a importantes marcadores quimiotaxonômicos para a família Asteraceae (LUSA et al., 2016). Entre eles, compostos fenólicos gerais e terpenóides, incluindo lactonas sesquiterpênicas. As análises histoquímicas realizadas neste estudo indicam os tricomas glandulares como principal sítio de síntese e acúmulo de marcadores quimiotaxonômicos. No entanto, também foi observado o local de síntese/acúmulo dos compostos avaliados nos tecidos do parênquima e idioblastos epidérmicos nas folhas totalmente expandidas como observado também por Lusa et al., 2016. Ainda, conforme a autora, quando observa-se a presença de mais de um grupo de substâncias, que geralmente são acumuladas ao mesmo tempo, das estruturas secretoras identificadas, o conteúdo secretado pode ser considerado misto.

A reação histoquímica indicativa das lactonas sesquiterpênicas aponta que os tricomas glandulares são os principais sítios de síntese e acúmulo dessas substâncias. Este dado está de acordo com Spring (2001), que indica os tricomas glandulares como principais locais de síntese e acúmulo de lactonas sesquiterpênicas em espécies da família Asteraceae.

As indicação histoquímica de substâncias lipofílicas acumulados em células de tecidos do parênquima (folhas) pode estar relacionada à possível presença de lactonas em espécies foliares glabras, como as espécies *Porophyllum ruderale* e *Pseudobrickellia brasiliensis*. Dentre os metabólitos secundários presentes em Asteraceae, os terpenóides (mono, sesqui, di e triterpenos e lactonas sesquiterpênicas) e compostos fenólicos (flavonóides e derivados do ácido cinâmico) são as classes mais representativas de substâncias e são considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos devido a sua enorme variedade química (KELES et al., 2010; LUSA et al., 2016).

Para as espécies de *Solidago chilensis*, uma alta concentração de grãos de amido foi confirmada pelo teste de Lugol no região intermediária do mesófilo, podendo estes serem confundidos com cristais, quando observados rapidamente sob luz polarizada. Neste taxa, a presença de drusas na região da nervura central (NC) ainda é observada. Um estudo de Souza et al. (2017) avaliando esta espécie, descreveu a presença de vários cristais de oxalato de cálcio nas formas de raphides, cristais prismáticos e drusas, porém, o mesmo não foi observado neste trabalho.

A espécie *Sphagneticola trilobata* apresentou drusas na região de NC. Segundo Baccarin et al. (2009), cristais de oxalato de cálcio (drusas e cristais prismáticos) foram encontrados apenas na seção do caule e não há descrição da presença destes achados nas folhas de

Sphagneticola trilobata. A presença de pequenas drusas é notável na espécie *L. diamantinana* em todas as regiões do mesófilo. Nas outras espécies de *Lychnophora* não foram observados cristais. Em *Pseudobrickellia brasiliensis* e *Porophyllum ruderale* a presença de cristais não foi observada.

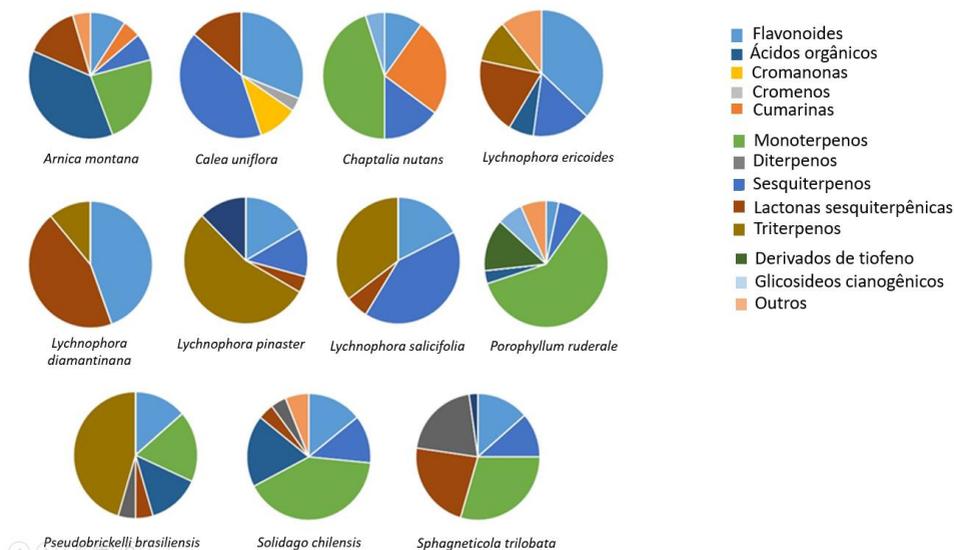
Tabela 2 - Testes histoquímicos e classes metabólicas de secreção/acumulo observadas nas estruturas foliares das espécies de arnica.

Espécies	Testes	Sudan IV	Ácido sulfúrico	Vermelho de	Cloreto férrico
	histoquímicos			Rutênio	
	Metabolic classes	Compostos lipofílicos	Lactonas sesquiterpênicas	Compostos pecticos	Compostos fenólicos
<i>Calea uniflora</i>		RI, TG, NC, ES	RI, TG	TG, ES	RI, TG, NC, ES
<i>Chaptalia nutans</i>		RI EP	RI, TG	RI, ES	MS
<i>Sphagneticola trilobata</i>		RI, TG, NC, ES, EP	RI, TG	RI, TG, NC, ES	RI, TG, NC, ES
<i>Solidago chilensis</i>		RI, TG SS	RI, TG, ES	Ri, TG, ES, TNG	RI, TG, NC, ES
<i>Porophyllum ruderale</i>		RI NC SS	-	RI, NC, ES	RI, NC, ES
<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>		NC	ES, NC	NC	MS
<i>Lychnophora. ericoides</i>		RI, TG, NC	TG, NC	RI, NC, TNG	RI, TG, NC, TNG
<i>Lychnophora saicifolia</i>		RI, TG, NC	TG	RI, TG, NC, TNG	RI, TG, NC, TNG
<i>Lychnophora pinaster</i>		RI, TG, NC	TG	RI, NC, TNG	RI, TG, NC, TNG
<i>Lychnophora diamantinana</i>		RI, TG, NC, TNG	TG, NC	RI, TG, NC, TNG, EP	RI, TG, NC, TNG

Legenda: Abrev.: RI =Região intermediária, EP = células epidérmicas; ST = estomato; NC = Nervura Central ; TG = Tricoma glandular; TNG = Tricoma não glandular; MS= células do mesofilol; "-" = negativo; ES= Estrutura secretora/armazenamento.

Confrontando os dados obtidos dos testes histoquímicos, realizados e discutidos acima, com os dados obtidos com a revisão da literatura (Tabela 1 do tópico 2.5) verificou-se coerência nos achados histoquímicos, visto que compostos fenólicos, lipofílicos e lactonas sesquiterpênicas são encontrados nas espécies avliadas. Através da revisão fitoquímica, realizada no presente trabalho (Tabela 1), realizou-se uma compilação dos dados em forma de gráfico pizza, demonstrando as principais classes químicas já identificadas em cada uma das espécies estudadas. Este gráfico, exposto na Figura 24 apresentam uma relação de proporção entre as classes químicas já identificadas para as espécies.

Figura 24 - Principais classes de metabólitos relatados em cada uma das Arnicas usadas Brasil.



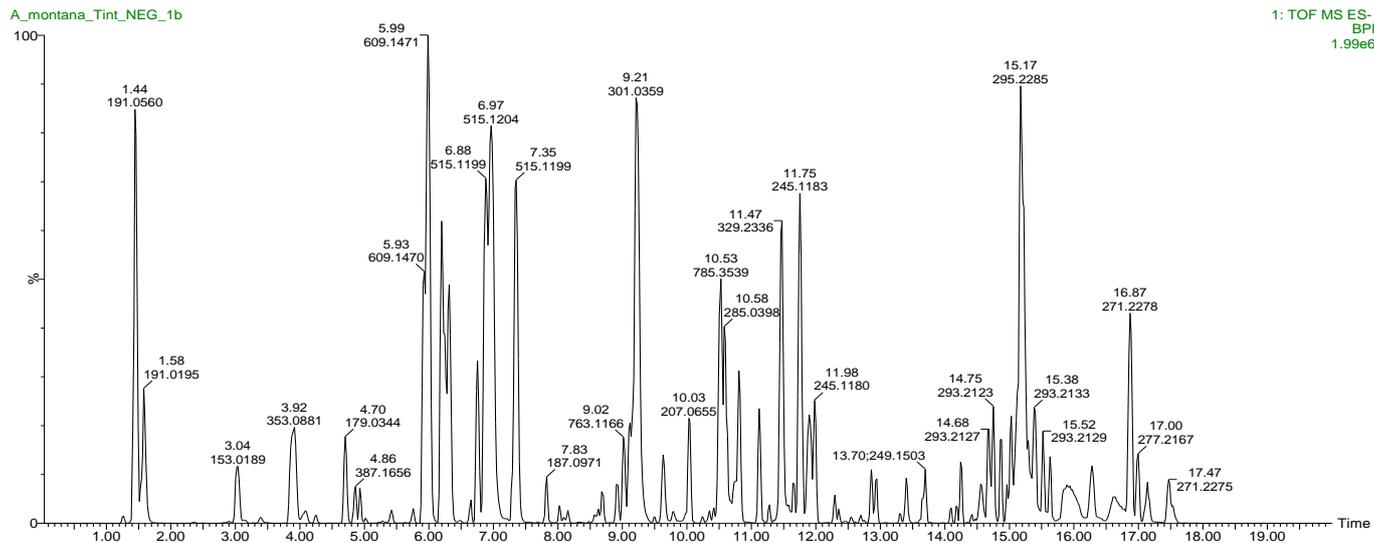
Com base nos dados obtidos de revisão fitoquímica, foi possível verificar as principais classes de metabolitos em cada uma das espécies, sendo elas: flavonoides e ácidos orgânicos (*Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Lychnophora pinaster*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora salicifolia* e *Lychnophora diamantinana*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata* e *Solidago chilensis*), cumarinas (*Chaptalia nutans*), monoterpênicos (*Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata* e *Solidago chilensis*), diterpênicos (*Lychnophora pinaster*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora salicifolia* e *Lychnophora diamantinana*, *Pseudobrickellia brasiliensis*), sesquiterpênicos *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Lychnophora pinaster*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora salicifolia* e *Lychnophora diamantinana*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata* e *Solidago chilensis*), lactonas sesquiterpênicas (*Calea uniflora*, *Lychnophora pinaster*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora salicifolia* e *Lychnophora diamantinana*, *Sphagneticola trilobata* e *Solidago chilensis*), cromenos (*Calea uniflora*), cromononas (*Calea uniflora*), fitoesteróides (*Lychnophora pinaster*, *Sphagneticola trilobata*), glicosídeos cianogênicos (*Chaptalia nutans*), derivados de tiofeno (*Porophyllum ruderale*) e outros.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLUE-EM

Para a identificação das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico (tintura) das espécies de arnicas avaliadas realizou-se a caracterização destes por CLUE-EM/DAD. Os cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(+)* e *ESI(-)* são demonstrados nas Figuras 25 á 37.

Figura 25– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Arnica montana*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.

A. *ESI(-)*



B. *ESI(+)*

A_montana_Tint_POS_1b

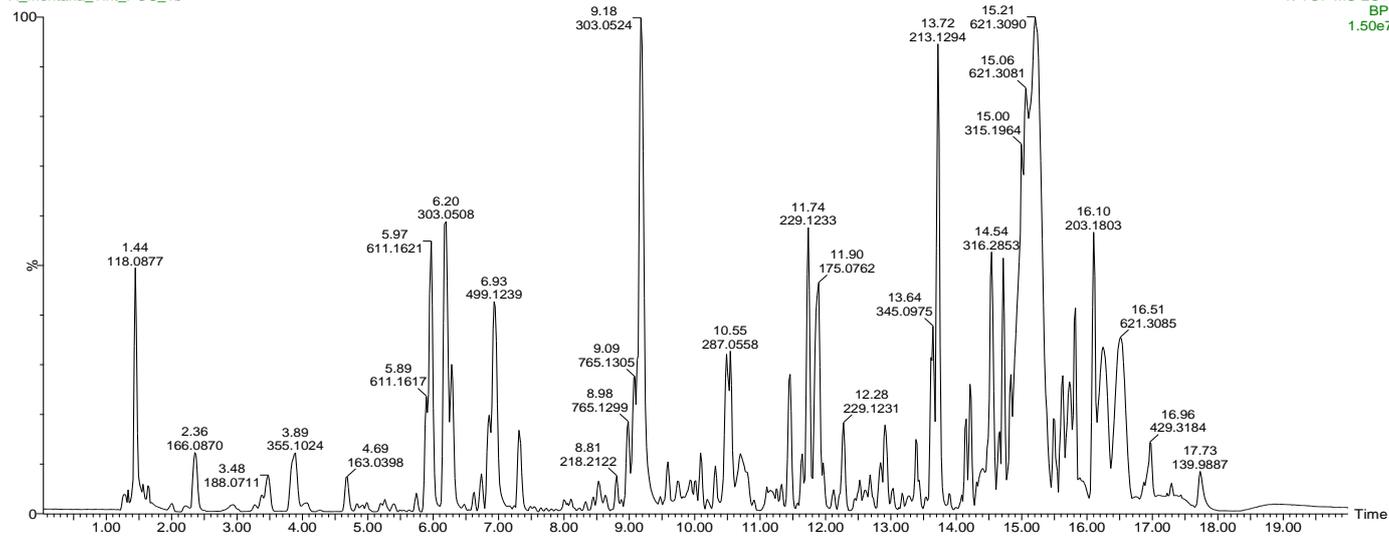
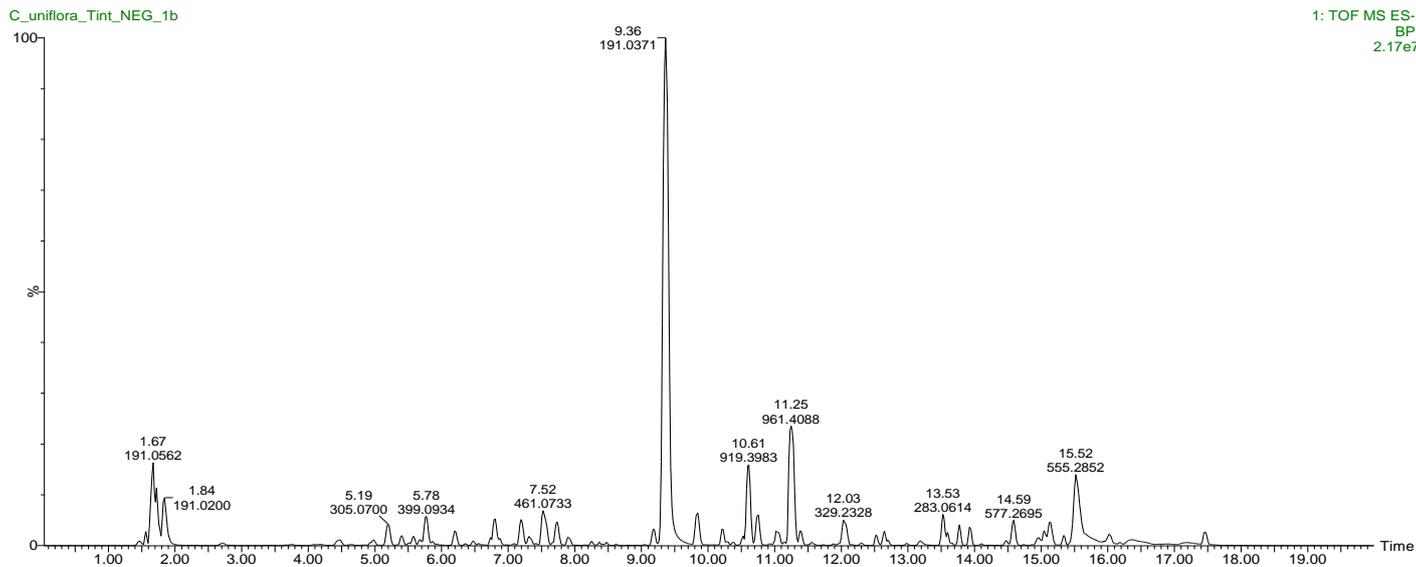


Figura 26– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Calea uniflora*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.

A. *ESI(-)*



B. *ESI(+)*

C_uniflora_Tint_POS_1b

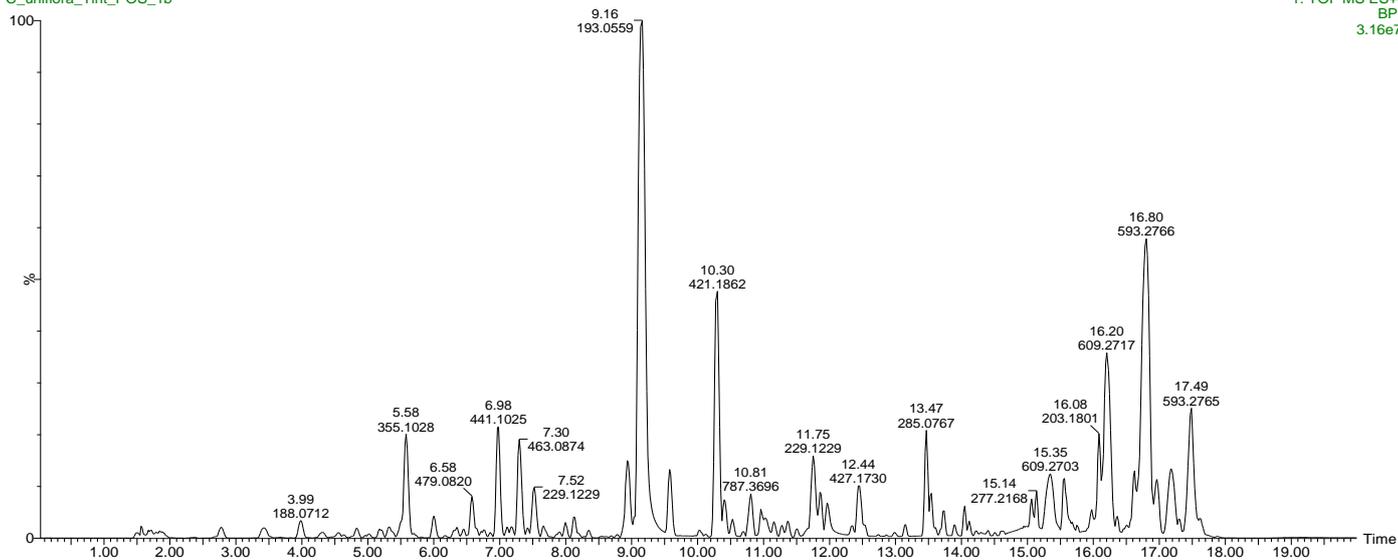
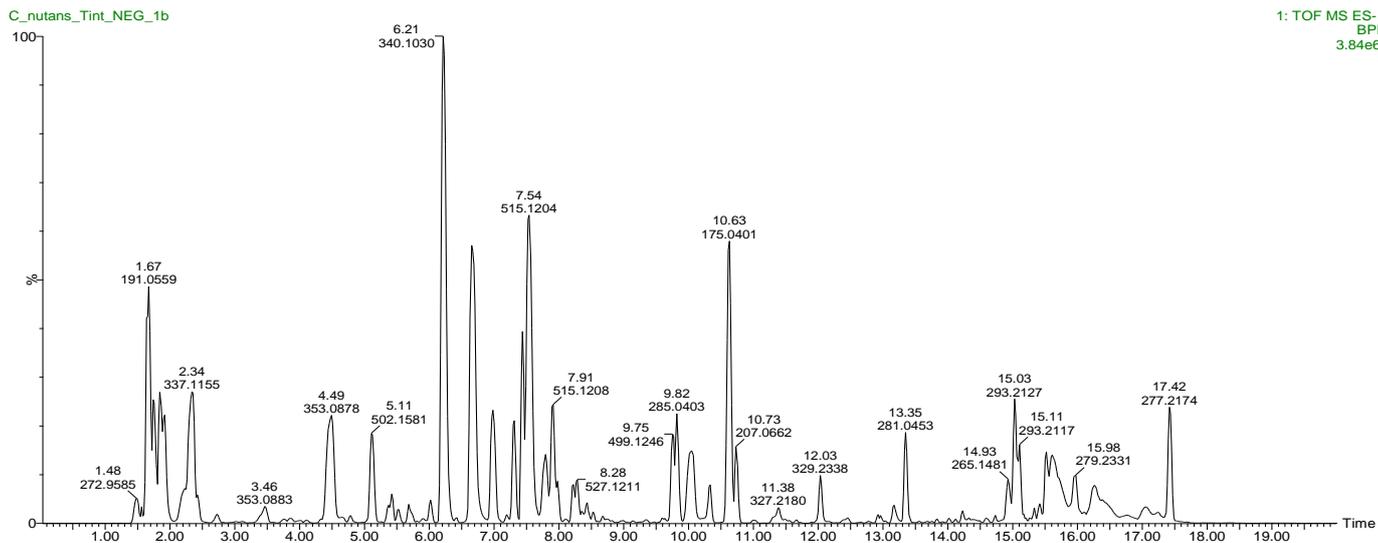


Figura 27– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Chaptalia nutans* Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2

A. *ESI(-)*



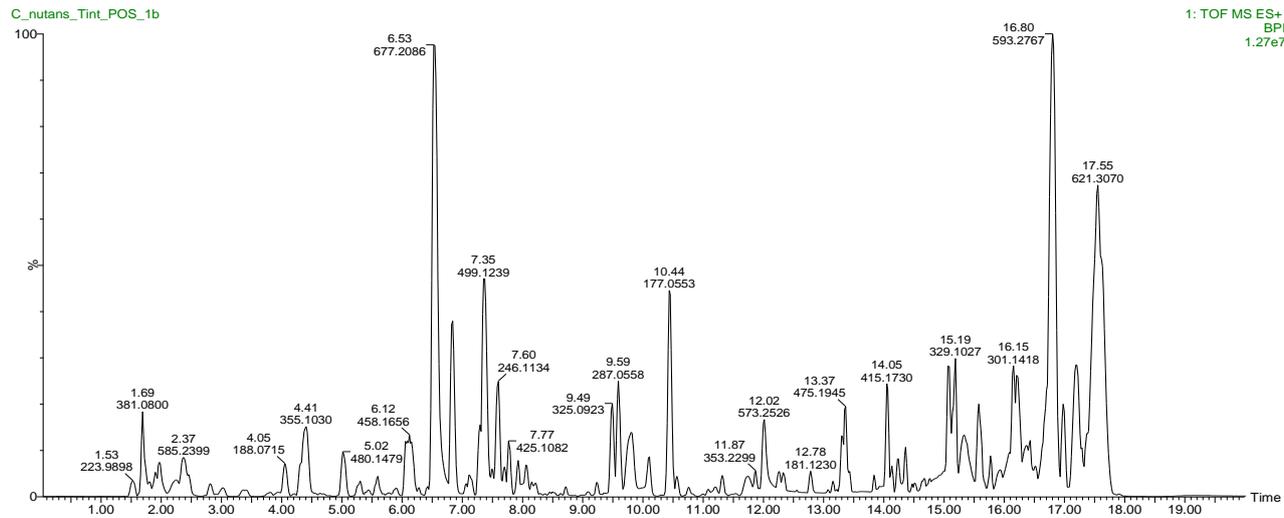
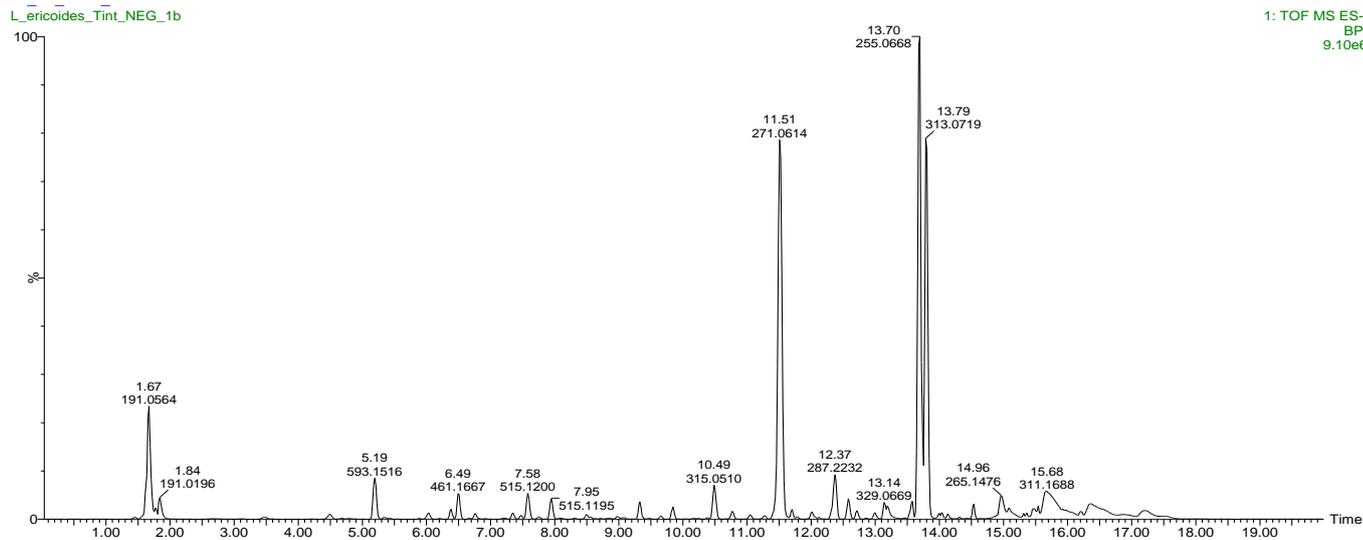
B. *ESI(+)*

Figura 28– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Lychnophora ericoides*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2

A. ESI (-)



B. ESI(+)

L_ericoides_Tint_POS_1b

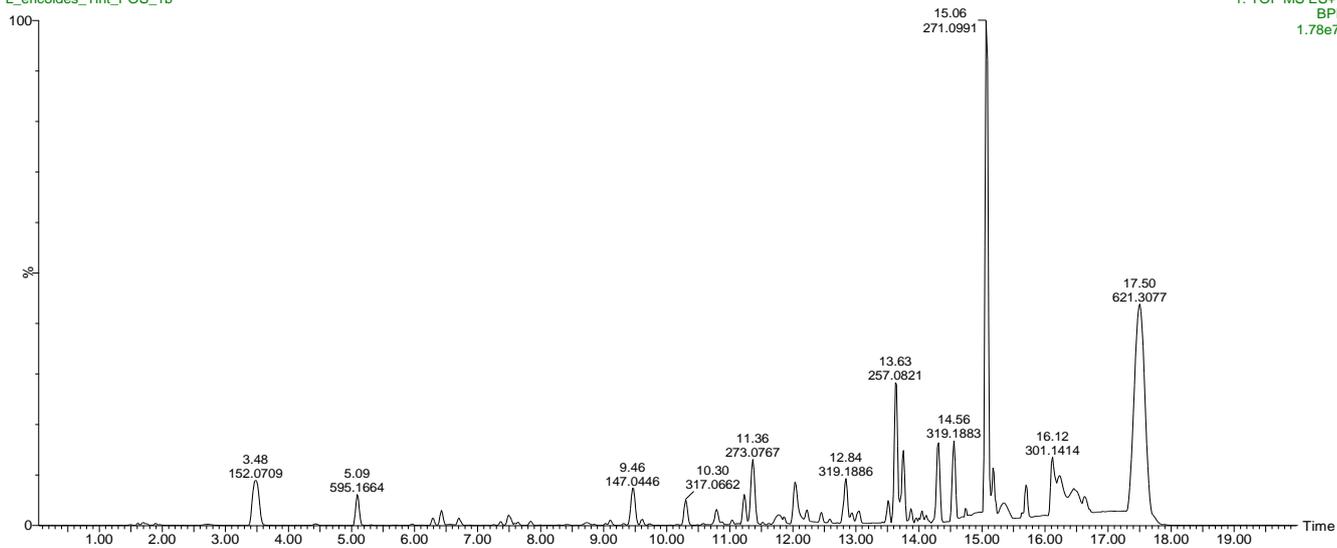
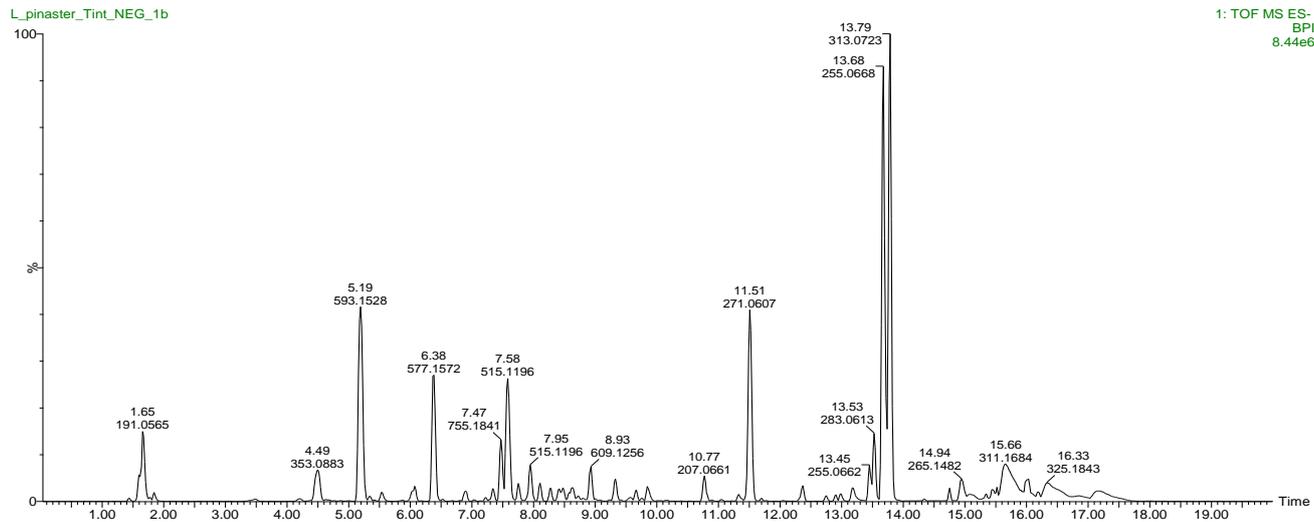
1: TOF MS ES+
BPI
1.78e7

Figura 29– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Lychnophora pinaster*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2

A. *ESI(-)*



B. ESI(+)

L_pinaster_Tint_POS_1b

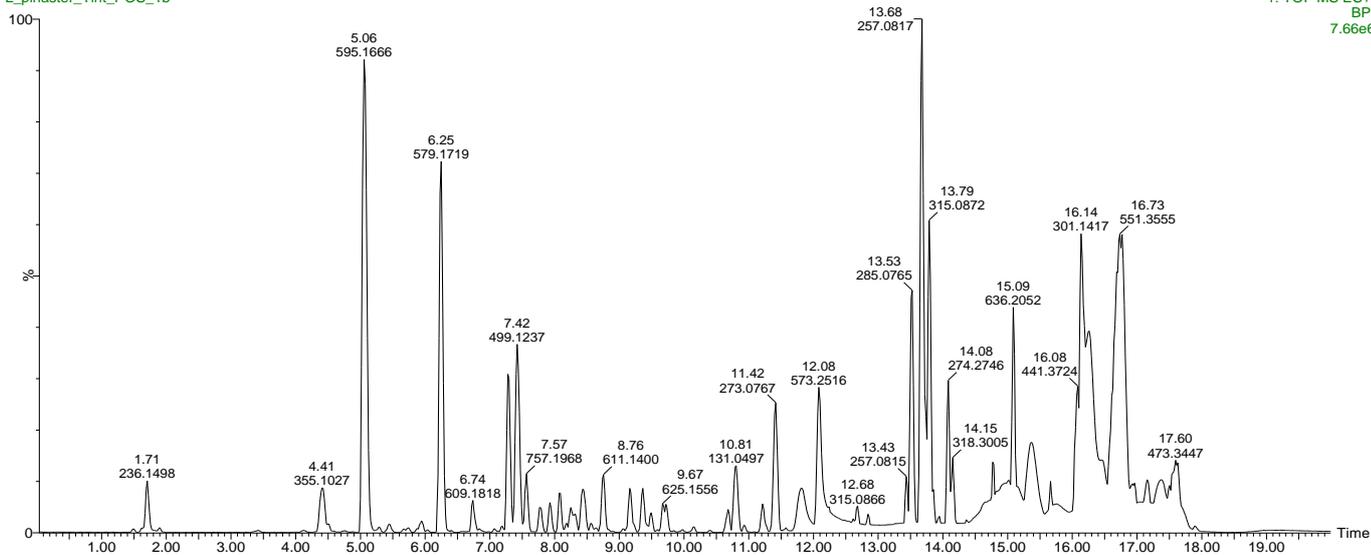
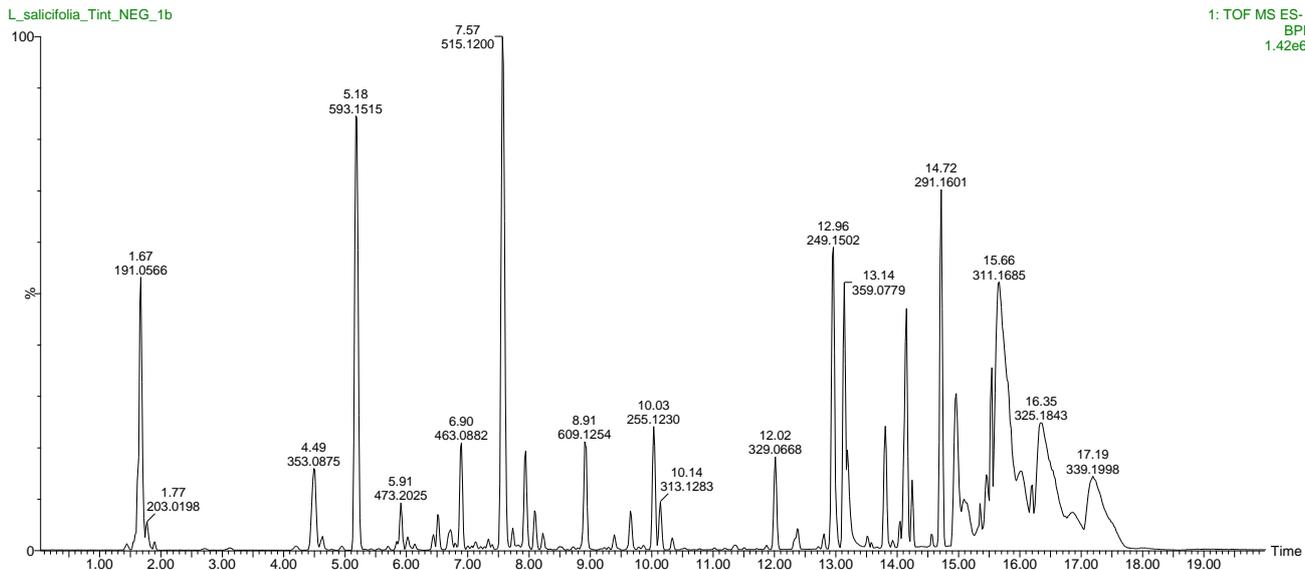
1: TOF MS ES+
BPI
7.66e6

Figura 30– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Lychnophora salicifolia*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.

A. *ESI(-)*



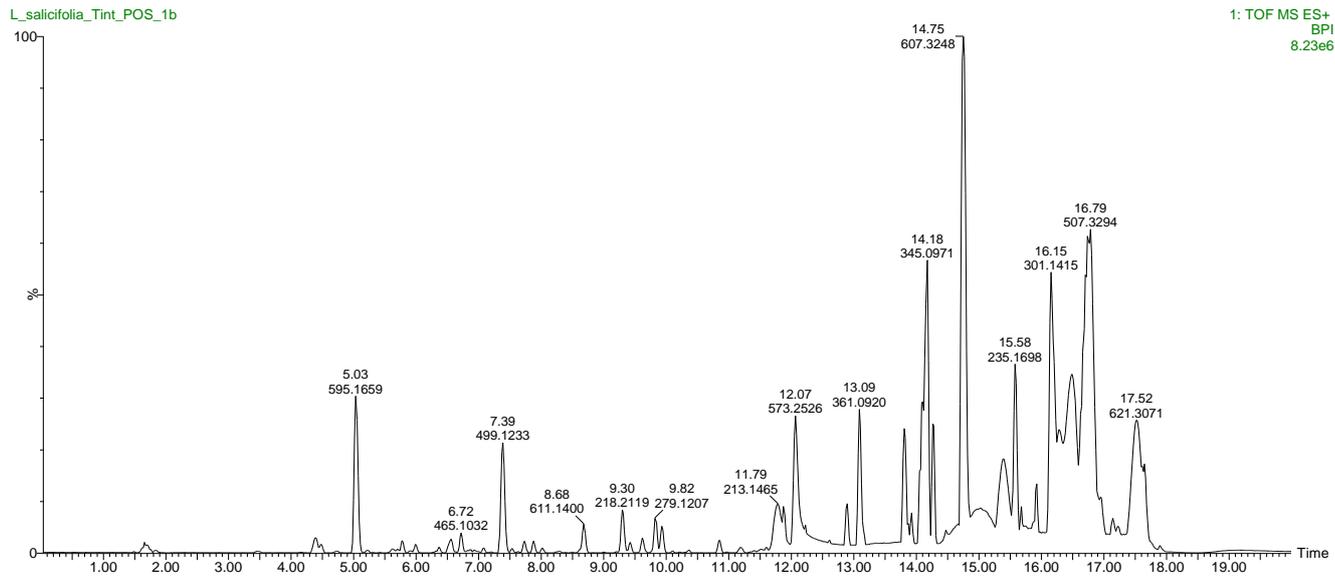
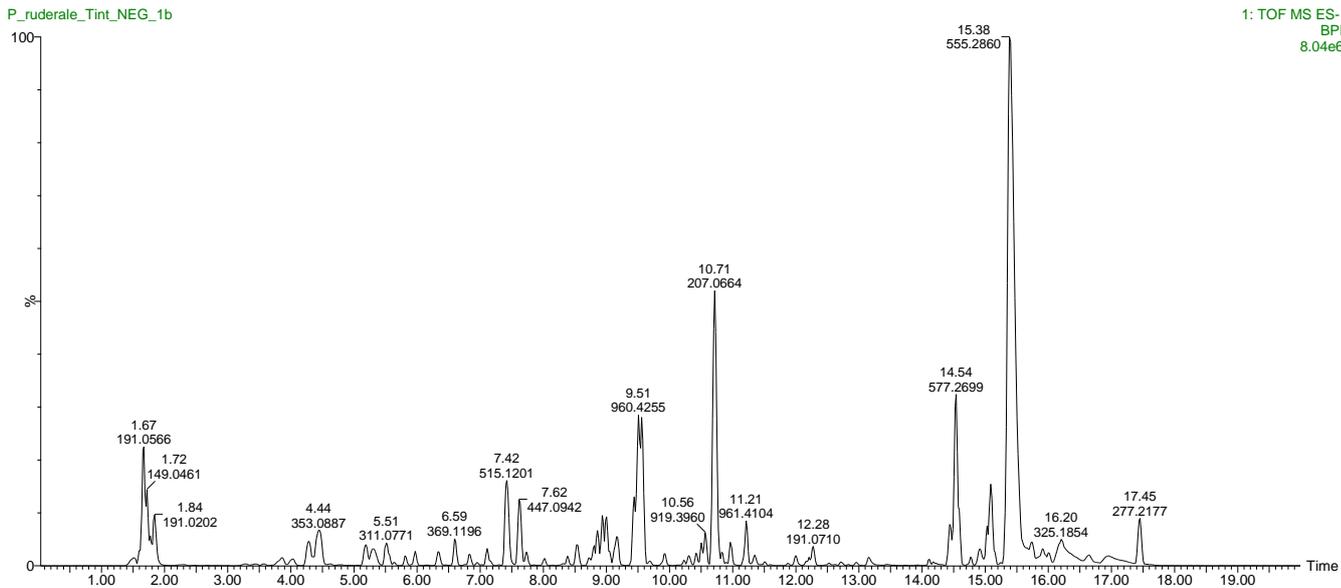
B. ESI(+)

Figura 31– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Porophyllum ruderale*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.

A. *ESI(-)*



B. ESI(+)

P_ruderale_Tint_POS_1b

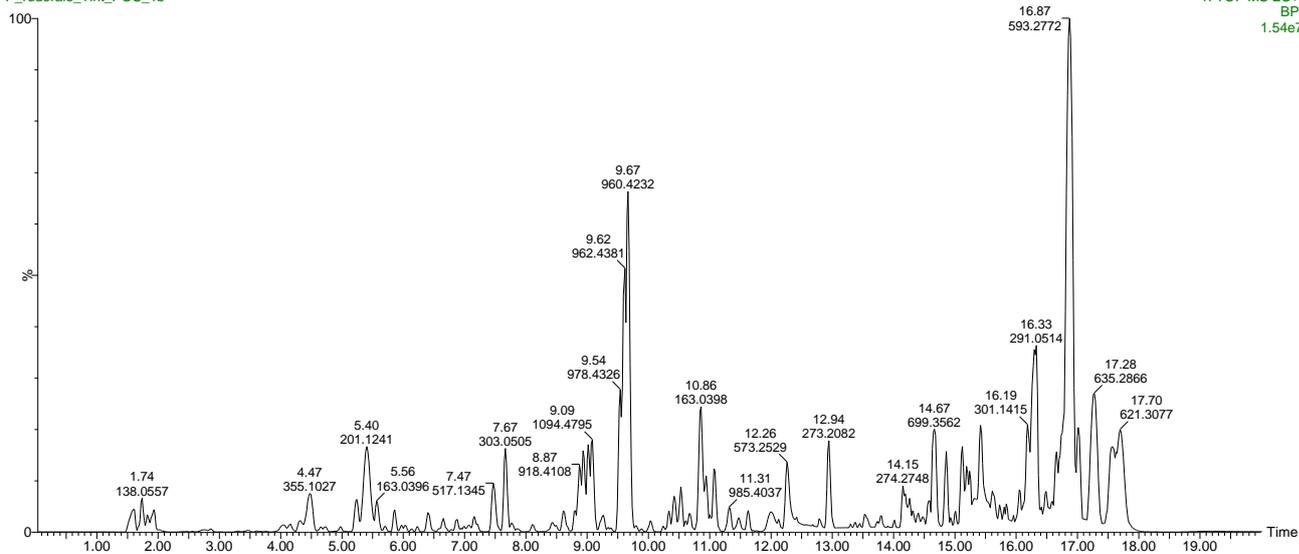
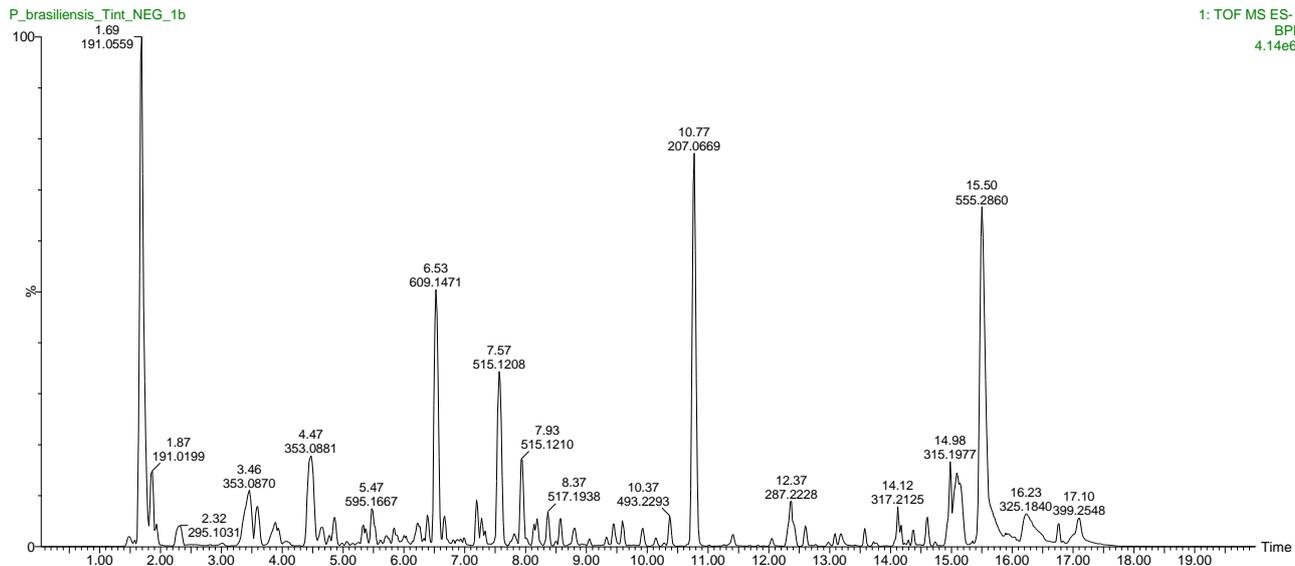


Figura 32– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Pseudobrickellia brasiliensis*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.

A. *ESI(-)*



B. *ESI(+)*

P_brasiliensis_POS_NEG_1b

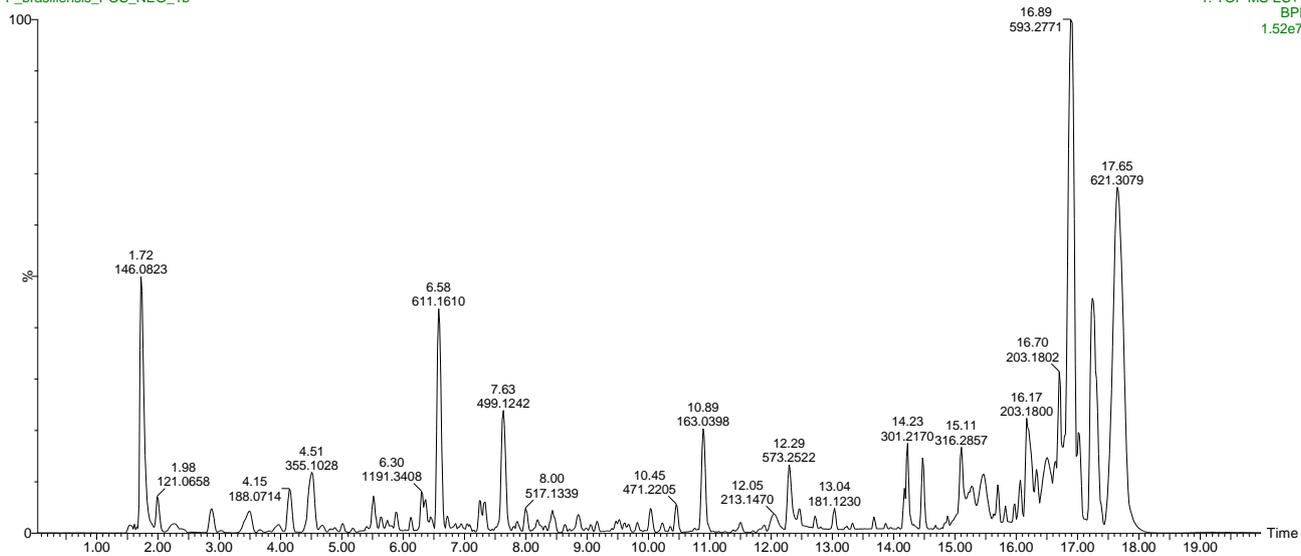
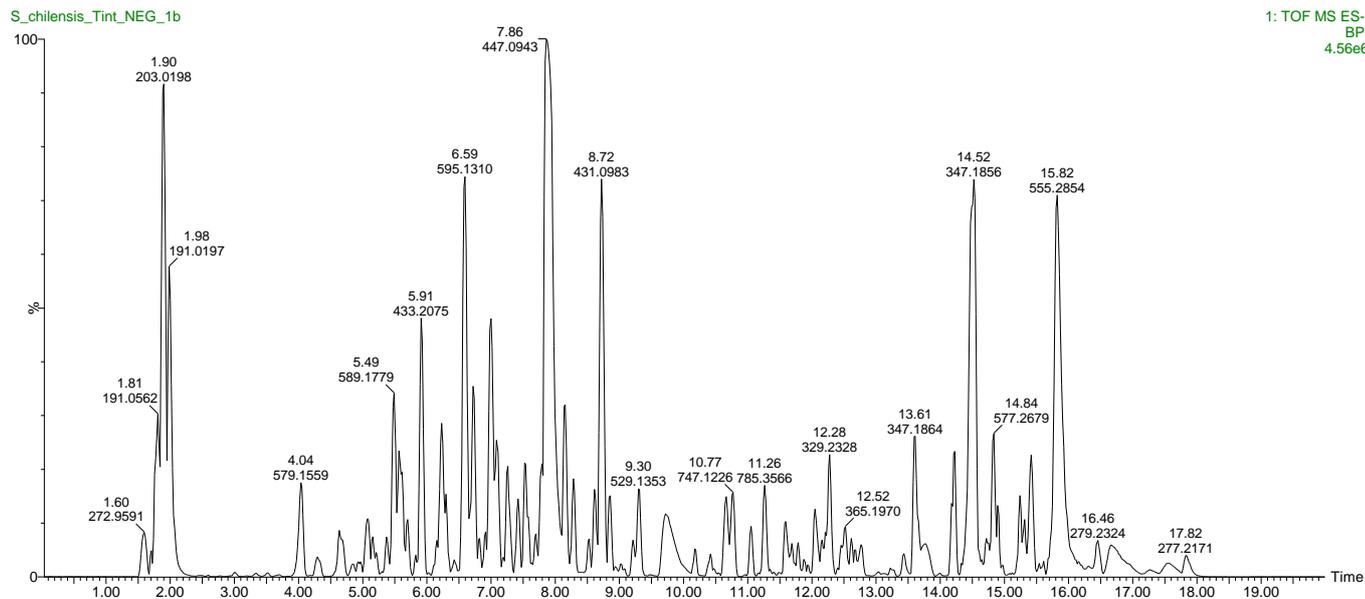
1: TOF MS ES+
BPI
1.52e7

Figura 33– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Solidago chilensis*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2

A. *ESI(-)*



B. *ESI(+)*

S_chilensis_Tint_POS_1b

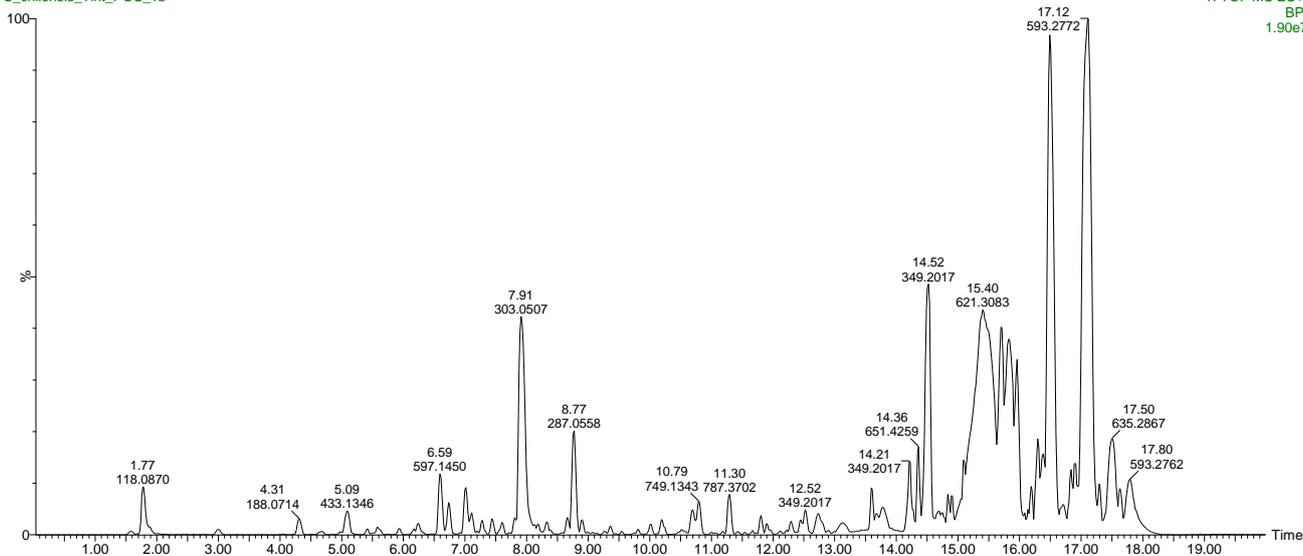
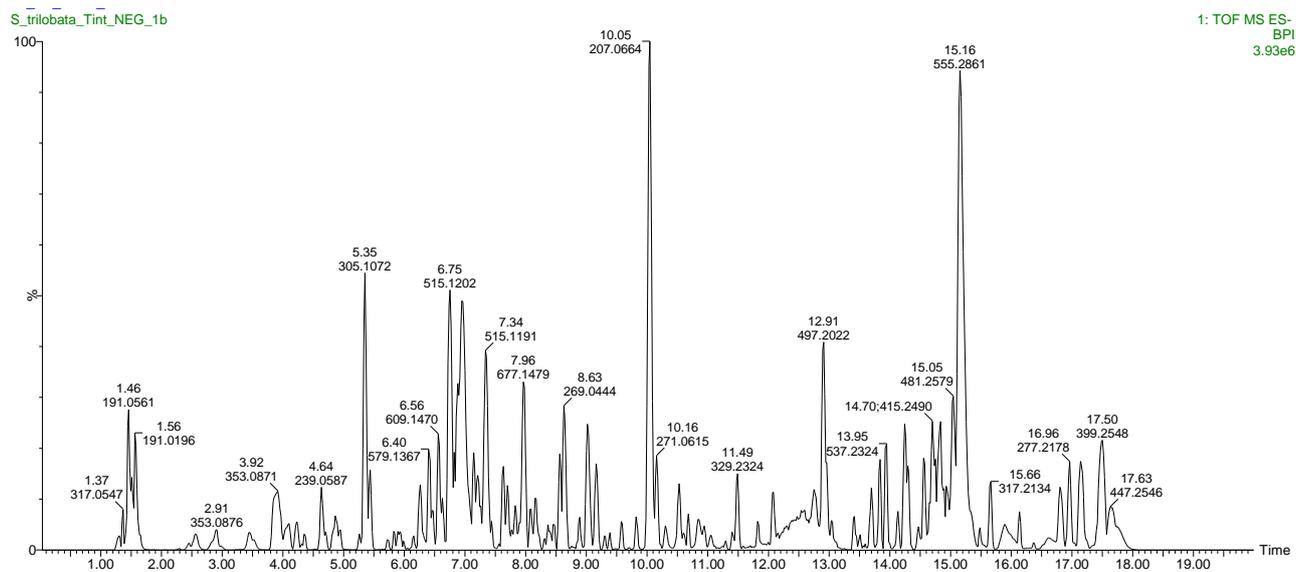
1: TOF MS ES+
BPI
1.90e7

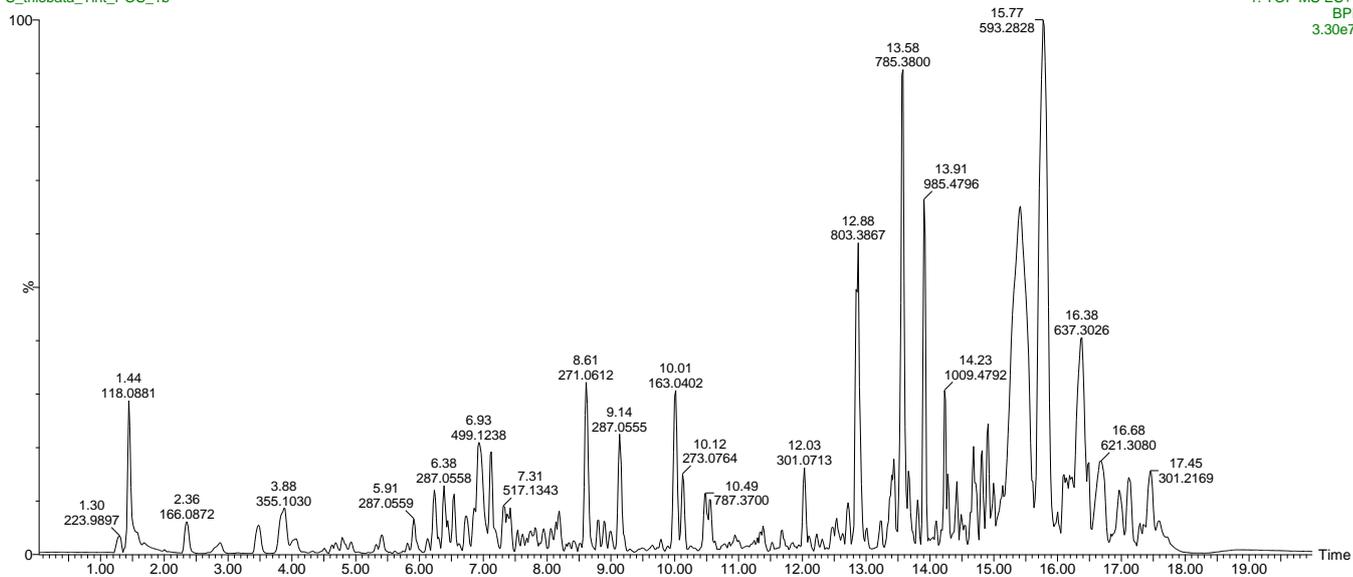
Figura 34– Cromatogramas de picos base obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, respectivamente A e B, das tinturas de *Sphagneticola trilobata*. Injetados conforme as condições descritas no item 4.3.2.

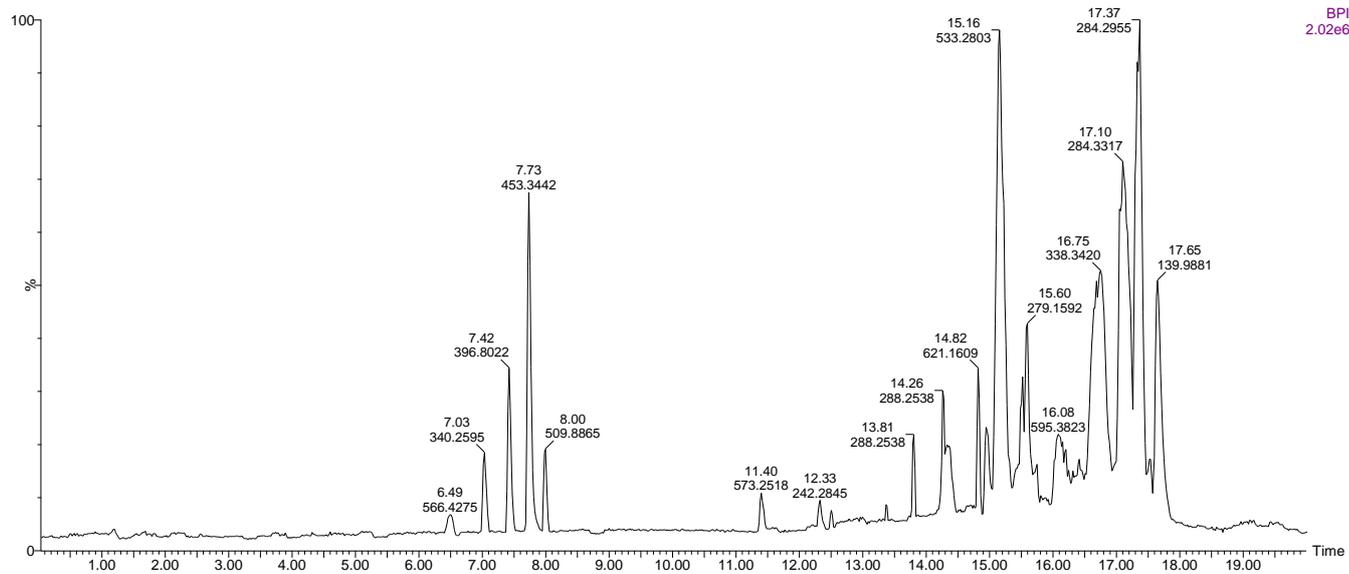
A. *ESI(-)*



B. *ESI(+)*

S_trilobata_Tint_POS_1b

1: TOF MS ES+
BPI
3.30e7

B. ESI(+)BPI
2.02e6

Comparando-se os dados obtidos através da separação cromatográfica, valores de massa (m/z), intensidade dos picos e tempo de retenção das substâncias obtidas das tinturas com os dados obtidos a partir da injeção de padrões analíticos e informações disponíveis na literatura foi possível identificar um total de 45 substâncias nas espécies *Arnica montana*, *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Lychnophora ericoides*, *L. pinaster*, *L. salicifolia*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata*. Dentre as substâncias sugeridas para cada espécie foram identificados: ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, cromenos, cumarinas e diterpenos, descritos a seguir.

Os dados de massas obtidos em modo de ionização positivo *ESI(+)* e negativo *ESI(-)* encontram-se na Tabela 3. As propostas do mecanismo de fragmentação das substâncias identificadas, será apresentado a seguir (Figuras 36 á 77).

Tabela 3 - Substâncias identificadas nas tinturas obtidas a partir das espécies vegetais avaliadas. ESI(+) e ESI(-).

Proposta de Identificação	T _R (min.)	Formula molecular	m/z (erro. ppm)		MS/MS fragmentação dos íons		Detecção
			[M+H]	[M-H]	ESI+	ESI-	
Açúcar	1,37	n.i	-	317,0552 (5,1)	-	-	<i>Sphagneticola trilobata</i>
ácido sinápico	1,48	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	-	223,0612 (4,6)	-	179,0714	<i>Sphagneticola trilobata</i>
ácido cumárico- <i>O</i> -glicosídeo	1,52	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	-	325,0937 (3,2)	-	163,0421; 119,0514	<i>Sphagneticola trilobata</i> , <i>Calea uniflora</i> , <i>Chaptalia nutans</i>
ácido quínico	1,67	C ₇ H ₁₁ O ₆	-	191,055 (1,0)	-	146,9713,	<i>Calea uniflora</i> , <i>Chaptalia nutans</i> , <i>Lychnophoraericoides</i> , <i>L. pinaster</i> , <i>L. salicifolia</i> , <i>Porophyllum ruderale</i> , <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> , <i>Solidago chilensis</i> e <i>Sphagneticola trilobata</i>
ácido cumárico	1, 74	C ₉ H ₈ O ₃	-	163,0424 (2,7)	-	163,0424; 119,0416	<i>Sphagneticola trilobata</i> , <i>Calea uniflora</i> , <i>Chaptalia nutans</i>
ácido cítrico	1,84	C ₆ H ₈ O ₇	-	191,0192 (3,7)	-	111,0085, 173,0078,	<i>Arnica montana</i> , <i>Calea uniflora</i> , <i>Chaptalia nutans</i> , <i>Lychnophoraericoides</i> , <i>L. pinaster</i> , <i>L. salicifolia</i> , <i>Porophyllum ruderale</i> , <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> , <i>Solidago chilensis</i> e <i>Sphagneticola trilobata</i>
ácido daucico	1,90	C ₇ H ₈ O ₇	-	203,0197 (2,5)	-	159,0299; 115,0037	<i>Solidago chilensis</i> , <i>Sphagneticola trilobata</i>
nonioside E	1,92	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₇	-	601,2337 (-2,7)	-	147,0658; 309,1181, 337,1141; 439,1815;	<i>Chaptalia nutans</i>

Derivado de nonioside E	2,34	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₇		601,2337 (-2,7)	-	147,0658;309,1181; 337,1141;439,1815;	<i>Chaptalia nutans</i>
Fenilalanina	2,6	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166,0863	164,0143 (4,3)	120,0808	-	<i>Arnica montana</i>
Ácido hidróxibenzóico glucopiranosídeo	2,74		-	315,072 (4,8)	-	153,0198	<i>Chaptalia nutans</i>
Ácido dihidroxibenzóico	3,02	C ₇ H ₆ O ₄	-	153,0187 (0,00)	-	153,0187	<i>Arnica montana</i>
Ácido cafeoilquínico (Isomero)	3,92	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	353,0873 (0,8)	-	191,0555; 353,0876; 707,1844	<i>Arnica montana, Calea uniflora, Sphagneticola trilobata</i>
Ácido cafeoilquínico (Isomero)	4,04	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	353,0873 (2,4)	-	191,0555; 353,0876; 707,1844	<i>Arnica montana, Calea uniflora, Chaptalia nutans, Porophyllum ruderale, Pseudobrickellia brasiliensis</i>
Ácido cafeoilquínico (Isomero)	4,13	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	353,0873 (1,7)	-	191,0555;	<i>Calea uniflora, Solidago chilensis, Chaptalia nutans, Porophyllum ruderale, Pseudobrickellia brasiliensis</i>
Ácido cafeoilquínico (Isomero)	4,51	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	353,0873 (1,0)	-	191,0555;	<i>Calea uniflora</i>
Substância nitrogenada não identificada	5,09	C ₂₂ H ₂₄ N ₅ O ₉	-	502,1566 (0,8)	-	-	<i>Chaptalia nutans</i>
	5,09	C ₃₄ H ₂₀ N ₃ O ₂	-	502,1566 (2,8)	-	-	

Vicenin-2	5,18	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595,1657;	593,1512 (0,7)	557,1552; 475,1235; 355,0812	575,1479; 473,1089; 353,0667	<i>Lychnophoraericoides, L. pinaster, L. salicifolia</i>
Violanthin ou isoviolanthin	5,18	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579,1703	577,1563	531,1597; 475,1223; 355,0812	; 473,1089; 353,0667	<i>Lychnophorapinaster</i>
Acido cafêico	5,34	C ₉ H ₈ O ₄	-	179,0350 (-0,6)	-	135,0452; 117,0289	<i>Arnica montana, Calea uniflora, Lychnophoraericoides, L. pinaster, Porophyllum ruderale, Pseudobrickellia brasiliensis, Solidago chilensis e Sphagneticola trilobata,</i>
Acido feloroilquinico	6,05	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	-	367,1035	-	191,0551; 193,0506; 173,0455	<i>Calea uniflora, Chaptalia nutans, Lychnophoraericoides, L. pinaster, L. salicifolia,</i>
Isoquercitrina (ISOQ)	6,19	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-	463,0882 (-4,2)	-	301,0354; 273,0405; 151,0037	<i>Calea uniflora, Lychnophorapinaster, L. salicifolia, Porophyllum ruderale</i>
Cromanona glicosilada	6,25	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	-	371,0979 (3,6)	-	209,0543	<i>Chaptalia nutans</i>
Rutina	6,58	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611,1607 (3,2)	609,1461 (4,1)	465,1028; 303,0499	463,0882; 301,0354; 273,0405	<i>Arnica montana, Sphagneticola trilobata</i>
Quercetina-O-Rhamnosideo	6,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449,1078 (4,9)	447,0933 (-4,7)	303,0499; 275,0550	301,0354; 273,0405; 151,0037	<i>Chaptalia nutans, Lychnophor salicifolia, Solidago chilensis; Sphagneticola trilobata</i>

Kaempferol-acetil-rhamnopiranosideo	6,9	-	517,1346 (2,7)	-	287,0550	-	<i>Lychnophorapinaster</i>
Ácido 3,4-dicaffeoilquinico	7,30	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	-	515,1195	-	515,1195; 353,0878; 191,0551; 179,0350	<i>Calea uniflora, Chaptalia nutans, Lychnophoraericoides, L. pinaster, L. salicifolia, Porophyllum ruderale, Pseudobrickellia brasiliensis, Solidago chilensis e Sphagneticola trilobata</i>
Ácido 3,5-dicaffeoilquinico	7,60	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	-	515,1195	-	515,1195; 353,0878; 191,0551; 179,0350	<i>Calea uniflora, Chaptalia nutans, Lychnophoraericoides, L. pinaster, L. salicifolia, Porophyllum ruderale, Pseudobrickellia brasiliensis, Solidago chilensis e Sphagneticola trilobata</i>
Ácido 4,5-dicaffeoilquinico	7,88	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₀	-	515,1195	-	515,1195; 353,0878; 191,0551; 179,0350	<i>Calea uniflora, Chaptalia nutans, Lychnophoraericoides, L. pinaster, L. salicifolia, Porophyllum ruderale, Pseudobrickellia brasiliensis, Solidago chilensis e Sphagneticola trilobata</i>
Buteina	8,4	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	-	271,0612 (2,6)	-	271,0612	<i>Calea uniflora</i>
Hidroxi-cumarina	8,98	C ₁₀ H ₈ O ₃	177,0553 (4,1)	175,0400 (2,7)	175,0400	177,0553	<i>Chaptalia nutans</i>
Campferol	9,18	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287,0550 (1,4)	285,0405 (2,1)	287,0550; 259,0601	107,0139; 177,0193; 257,0455; 151,0037; 151,0400	<i>Sphagneticola trilobata</i>

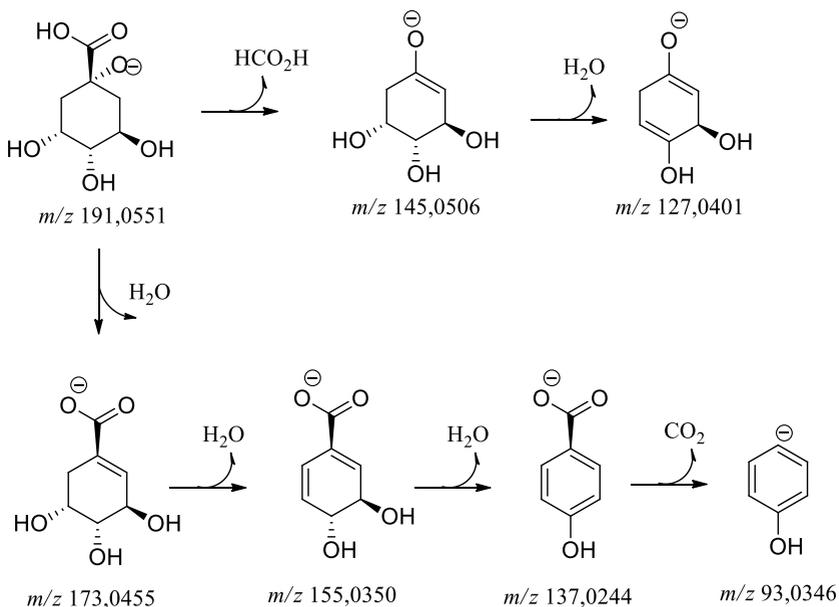
Noreugenin	9,38	C ₁₀ H ₈ O ₄	-	191,0350 (4,9)	-	163,0401; 151,0037;107,01390	<i>Calea uniflora</i>
Luteolina	9,80	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287,0550	285,0405 (3,3)	287,0550; 259,0601	285,0405;107,0139; 177,0193;257,0455; 151,0037; 135,0455	<i>Chaptalia nutans,</i> <i>Lychnophorapinaster</i>
Orobol	9,86	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287,0550	285,0405 (0,0)	287,0550; 259,0601; 108,0206-	285,0405;257,0455; 107,0139;177,0193; 151,0037; 133,0295	<i>Calea uniflora</i>
Cafeato de etila	10,71	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	209,0454 (2,3)	207,0298 (1,4)	209,0454	207,0298; 179,0298	<i>Calea uniflora, Chaptalia nutans,</i> <i>Lychnophoraericoides, L. pinaster, L.</i> <i>salicifolia, Porophyllum ruderales,</i> <i>Pseudobrickellia brasiliensis,</i> <i>Solidago chilensis e Sphagneticola</i> <i>trilobata</i>
Pinobanskin	11,51	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273,0757 (3,6)	271,0685 (3,0)	273,0757; 255,0652; 227,0703	271,0685; 253,0579; 225,0630; 107,0211	<i>Lychnophoraericoides, L. pinaster</i>
Terpeno labdano	12,98	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	349,2010 (5,0)	347,1864 (4,8)	331,1904; 123,1168; 208,0736	347,1864; 329,1758; 285,1860	<i>Solidago chilensis</i>
Terpeno labdano	13,58	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	349,2010 (3,7)	347,1864 (4,0)	331,1904; 123,1168; 208,0736	347,1864; 329,1758; 285,1860	<i>Solidago chilensis</i>

Terpeno labdano	13,66	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	349,2010 (4,3)	347,1864 (1,6)	331,1904; 123,1168; 208,0736	347,1864; 329,1758; 285,1860	<i>Solidago chilensis</i>
Pinocembrim	13,67	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257,0808 (4,2)	255,0663 (5,2)	257,0808; 229,0859	255,0663; 227,0714; 151,0037	<i>Lychnophoraericoides, L. pinaster</i>
Pinostrombim	13,72	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	-	269, 0458 (3,0)	-	269, 0458	<i>Lychnophora ericoide, L. pinaster</i>
Terpeno labdano	13,87	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	349,2010 (4,9)	347,1864 (5,0)	331,1904; 123,1168; 208,0736	347,1864; 329,1758; 285,1860	<i>Solidago chilensis</i>
Quercetin-3- glucuronide	-	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	-	447,0675	-	447,0675; 301,0354; 273,0405	<i>Arnica montana</i>
Quercetin-(p- coumaroyl)- glucopyranoside	-	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	-	609,1250	-	609,1250; 463,0882; 301,0354	<i>Arnica montana</i>

Avaliando os cromatogramas obtidos por *ESI(-)* e *ESI(+)*, foi identificado no modo de ionização negativo, o pico com tempo de retenção (T_R) de 1,37 min. Esta substância demonstra ser composta por moléculas de açúcares, apresentando respectivamente m/z 317,05552, 601,2337 e 601,2337 com perdas sequenciais de moléculas de açúcares correspondentes a hexose (perda de 162Da) e deoxihexose (perda de 146 Da). Para este pico, não foi observado a presença da porção aglicona, sugerindo uma estrutura composta essencialmente por açúcares. Dados da literatura demonstram a presença de moléculas de açúcares (hexoses e deoxyhexose) nas partes aéreas das espécies *Arnica montana* (YUI et al., 1998), *Calea uniflora* (CARVALHO et al., 2016) e *Solidago chilensis* (SMOLAREK et al., 2011). No entanto, no presente estudo foi observado a presença destas moléculas apenas nas espécies *Chaptalia nutans* e *Sphagneticola trilobata*.

Na sequência, foi identificada a presença do ácido orgânico: ácido quínico. O pico referente a esta substância foi observado em todos os cromatogramas, no modo negativo, das tinturas avaliadas, apresentando T_R 1,67 min e m/z 191, 0555 [M-H]⁻. O perfil de fragmentação do ácido quínico por *ESI(-)* apresenta os fragmentos com m/z 145,0506 devido a perda da função ácido (perda de 46Da, ácido fórmico) com posterior desidratação (perda de 18Da), gerando o fragmento de m/z 127,0401. Outros fragmentos detectados que auxiliaram na identificação deste ácido orgânico são os íons m/z 173,0455, 155,0350 e 137,0244 obtido através das sequenciais perdas de moléculas de água provenientes das hidroxilas presentes no ácido quínico. O perfil de fragmentação desta substância encontra-se semelhante ao o proposto por Chornobai (2008) auxiliando na confirmação da identidade do ácido. O perfil de fragmentação proposto para o ácido quínico, considerando os fragmentos encontrados no espectro de massas obtido com energia de 25eV, encontra-se na Figura 36.

Figura 36. Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido quínico em modo de ionização negativo.

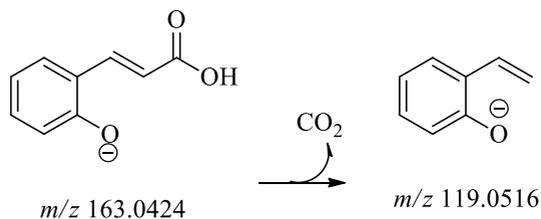


Os derivados do ácido clorogênico (DACs) englobam um grande grupo de compostos de ocorrência natural comumente encontrados em diversas espécies vegetais, incluindo a família Asteraceae (De OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Estes ácidos são sintetizados nas plantas por esterificação do ácido quínico com um ácido cinâmico, podendo ser: ácido caféico, ferúlico, sinápico ou cumárico (De OLIVEIRA; BASTOS, 2011). No presente estudo, a presença destes ácidos hidroxinâmicos bem como os DACs foram identificados em algumas espécies das espécies de “arnica” estudadas. Abaixo encontram-se as descrições do mecanismo de fragmentação, em modo de ionização negativo, proposto para as substâncias.

O pico cromatográfico com tempo de TR 1,74 min e m/z 163,0424 $[M-H]^-$ indica a presença do ácido cumárico. Esta substância precursora da classe das cumarinas, foi identificada nas tinturas obtidas das espécies *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans* e *Sphagneticola trilobata*. Para correta

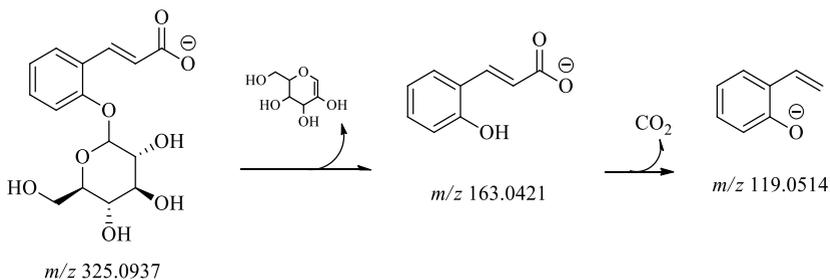
identificação do ácido cumárico, os dados obtidos foram comparados com o perfil de fragmentação e tempo de retenção de padrão analítico, sendo injetado nas mesmas condições das amostras (Item 4.3.2). A fragmentação do íon com m/z 163,0424 $[M-H]^-$, gerou o fragmento com m/z 119,0516 (perda de 44Da), que corresponde a perda de uma molécula de CO_2 do ácido cumárico (FAQUETI, 2016). No modo de ionização positivo, foi confirmada a presença desta substância através da m/z 165,0555 $[M+H]^+$. O perfil de fragmentação proposto para o ácido cumárico, considerando os fragmentos encontrados no espectro de massas obtido com energia de 25eV, encontra-se na Figura 37.

Figura 37 - Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido cumárico.



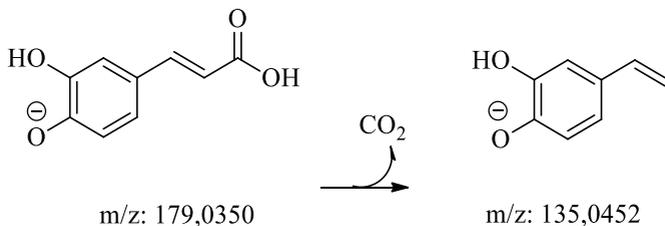
Posterior a identificação do ácido *o*-cumárico, foi identificada a substância ácido cumárico-*O*-glicosídeo com T_R 1,52 min e m/z 325,0937 $[M-H]^-$, sendo presente nas espécies *Calea uniflora* e *Sphagneticola trilobata*. A identidade desta substância foi confirmada através da fragmentação do ácido cumárico-*O*-glicosídeo. O perfil de fragmentação da substância, obtido em modo de ionização negativo, demonstrou a presença dos fragmentos m/z 163,0392 originário da perda de uma hexose (-162Da) e m/z 119,0502 obtido através da perda de uma molécula de CO_2 (-44Da) (FAQUETI, 2016). O mecanismo de fragmentação proposto para a substância, utilizando energia de 25eV encontra-se na Figura 38

Figura 38. Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido cumárico *O*-glicosídeo.



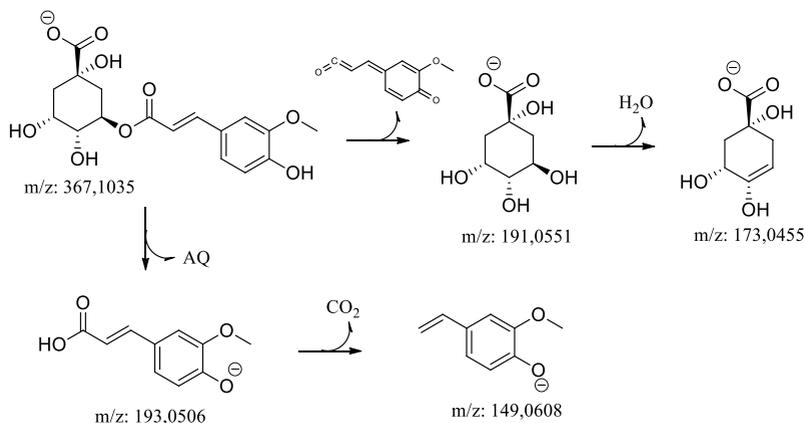
Através do pico cromatográfico com T_R 5,34 min m/z 179,0350 [M-H]⁻, foi verificada a presença do ácido cafêico em modo de ionização negativo nas espécies *Arnica montana*, *Calea uniflora*, *Lychnophora ericoides*, *L. pinaster*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata*. Através da fragmentação da substância, obteve-se o íon fragmento de m/z 135, 0452 [M-H]⁻ correspondente a perda de CO₂ (-44Da) característico para a substância (FAQUETI, 2016). O perfil de fragmentação bem como o tempo de retenção do ácido cafêico foi comparado com padrão analítico injetado nas mesmas condições das amostras (Item 4.3.2). O perfil de fragmentação desta substância, através dos fragmentos encontrados no espectro de massas obtido com energia de 25eV, encontra-se na Figura 39.

Figura 39- Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido cafêico.



O pico indicativo do ácido 3-*O*-feruloilquínico, foi observado através do íon m/z 367,1035 em modo de ionização negativo. O perfil de fragmentação desta substância corrobora com a descrição feita por Clifford et al. (2017) e Faleiro (2014) com a presença dos fragmentos m/z 191,0551 (ion do ácido quínico), m/z 173,0455 (desidratação do íon ácido quínico, através da perda de 18Da) e m/z 193,0506 (íon do ácido feluroil). No presente estudo, a presença do ácido 3-*O*-feruloilquínico foi identificada na espécie *Calea uniflora*, corroborando com o descrito por Carvalho (2016), trabalho no qual o autor isolou e caracterizou esta subatância em extratos metanólicos obtidos da *Calea uniflora*. O perfil de fragmentação proposto para esta substância, através dos fragmentos encontrados no espectro de massas utilizando a energia de 30eV, encontra-se descrito na Figura 40.

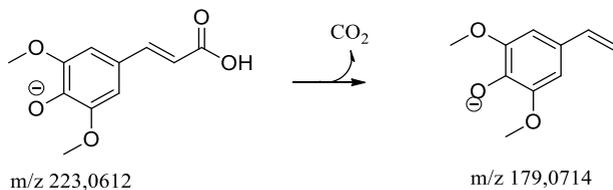
Figura 40 -Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido 3-*O*-feruloilquínico.



A presença do ácido sinápico é sugestiva para a espécie *Sphagneticola trilobata*. Através do cromatograma obtido em modo de ionização negativo, obteve-se o íon pico base m/z 223,0611 [M-H]⁻ e T_R 1,48min. Através da fragmentação deste íon, com energia de 25eV, obteve-se o fragmento com m/z de 179,0714 referente a perda caracteristic de CO₂ da função ácido carboxílico (perda de 44Da). Dados da literatura demonstram a perda de 44Da ser característica para esta

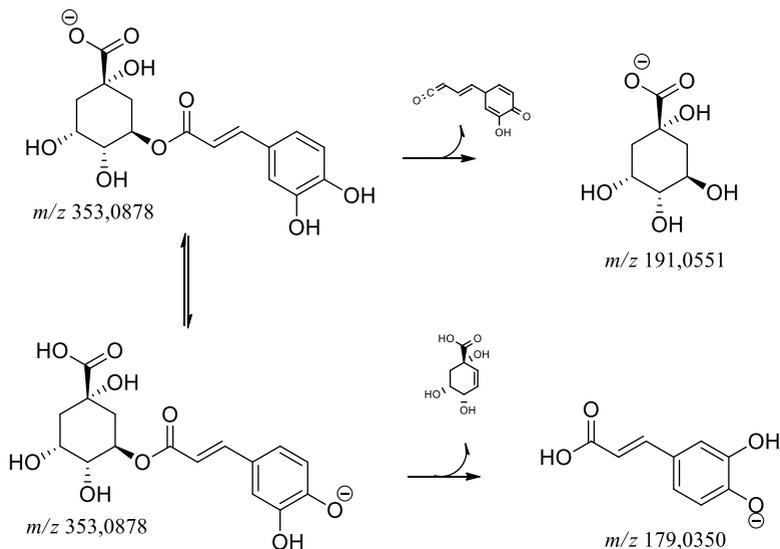
substância, decorrete da descarboxilação do ácido (SERAGLIO, 2016). A fragmentação proposta para o ácido sinápico encontra-se na Figura 41.

Figura 41 - Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido sinápico.



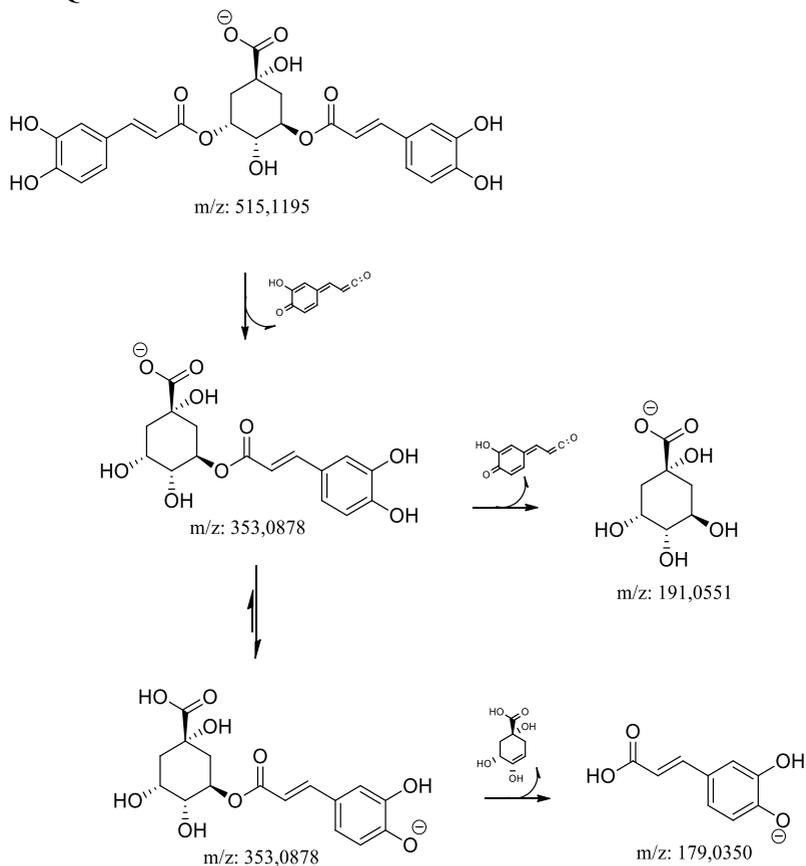
Os picos com m/z 353,0873 $[M-H]^-$ e m/z 355,0873 $[M+H]^+$ correspondem aos isômeros do ácido dicafeoilquínico com T_R 3,92, 4,04, 4,13 e 4,51 min, presentes em todas as arnicas avaliadas. Estas substâncias apresentaram, no espectro de massa, em modo negativo, o íon fragmento de m/z 191,0555 $[M-H]^-$ referente a perda da porção cafeoíla e o íon fragmento de m/z 179,0350 referente a perda da porção correspondente ao ácido quínico. O perfil de fragmentação proposto no presente estudo (Figura 43) corrobora com o descrito pelos autores Faleiro (2014) e Carvalho (2016). O perfil de fragmentação da substância ácido clorogênico em modo de ionização negativo, utilizando energia de 25eV, encontra-se na Figura 42.

Figura 42 -Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido clorogênico.



Ainda no modo de ionização negativo, foram identificados em todas as espécies os isômeros do ácido dicafeoilquinico (diACQ) apresentando os íons pico base de m/z 515,1195 $[M-H]^-$, seguidos de perda de uma molécula de água gerando o fragmento m/z 497,0956. Outros fragmentos diagnósticos são, m/z 353,0878 e m/z 191,0555 correspondendo respectivamente aos íons dos ácidos cafeoilquinico e clorogênico. Segundo Clifford et al. (2017) e Carvalho (2016), a identificação dos isômeros pode ser realizada com base na ordem de eluição dos compostos associado ao padrão de fragmentação dos mesmos. Desta forma, os isômeros identificam-se como 3,4diACQ, 3,5-diACQ e 4,5-diACQ, respectivamente para sua ordem de eluiçã. O perfil de fragmentação dos isômeros, utilizando energia de fragmentação de 30eV, encontra-se na Figura 43.

Figura 43 - Mecanismo de fragmentação em modo negativo do isômero diACQ.

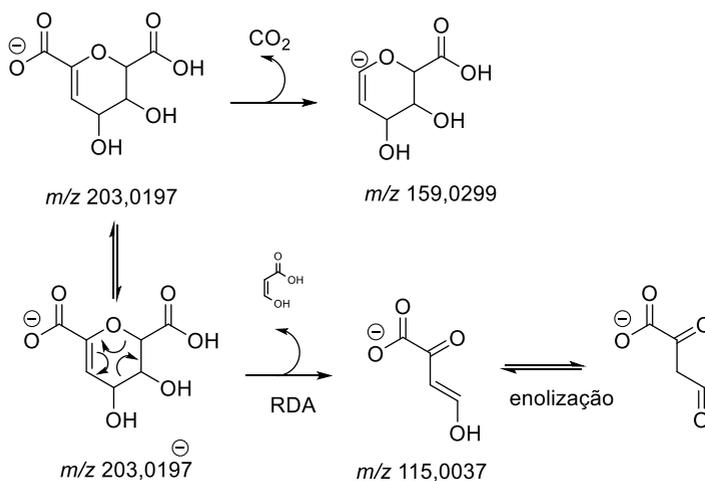


Na sequência, verificou-se a presença do ácido orgânico, ácido cítrico, com T_R 1,84 e m/z 191,01 [M-H]⁻ em todas as espécies de “arnica” avaliadas. O perfil de fragmentação desta substância foi comparado com dados da literatura. O perfil de fragmentação do ácido cítrico em modo de ionização negativo, 25V, sugere a perda de uma molécula de CO₂ e da função COOH presentes na substância. Os dados referentes a

fragmentação da substância encontram-se de acordo com o descrito por Sokeng et al. (2019).

A presença da substância ácido daucico é sugerida nas espécies *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* pela presença do pico com m/z 203,0197 [M-H]⁻ e T_R de 1,90 min. O perfil de fragmentação por ESI(-) desta substância, apresenta o pico de m/z 159,0299 decorrente da perda de CO₂ do ácido daucico (perda de 44Da), assim, gerando uma dupla ligação (entre os carbonos C5-C6). Através da desta dupla ligação formada, observa-se a fragmentação através do mecanismo de Retro-Diels-Alder (RDA), obtendo o fragmento m/z 115,0037. O perfil de fragmentação do ácido daucico, utilizando energia de fragmentação de 25eV, encontra-se na Figura 44.

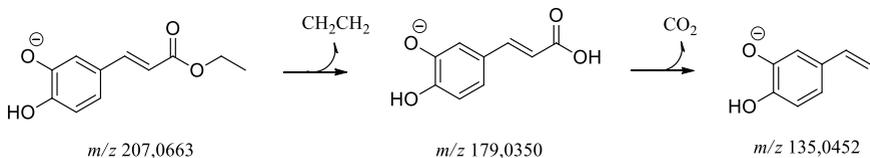
Figura 44. Mecanismo de fragmentação em modo negativo do ácido daucico.



O pico correspondente ao cafeato de etila foi encontrado nos cromatogramas por ESI (-) e ESI (+) com m/z 207,0663 e m/z 209,0454, respectivamente em todas as arnicas avaliadas. No cromatograma em modo negativo obteve-se o íon fragmento m/z 179,0350 correspondente ao ácido caféico ionizado e posterior perda da porção carboxílica (perda de 44Da) gerando o íon m/z 135,0452. O perfil de fragmentação e T_R desta substância foi comparado com padrão analítico injetado nas mesmas condições das amostras e comparado com dados da literatura

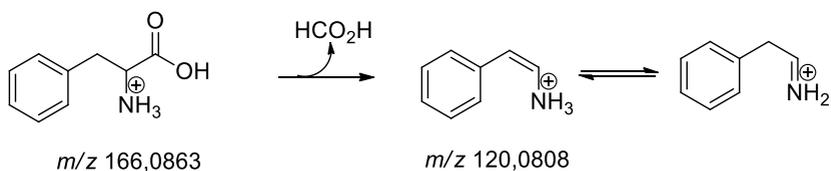
(CARVALHO, 2016). O perfil de fragmentação do cafeato de etila em ESI (-), utilizando energia de fragmentação de 25eV, encontra-se na Figura 45.

Figura 45. Mecanismo de fragmentação do cafeato de etila no modo negativo.



O pico com m/z 166, 0870 $[M+H]^+$ e T_R de 2,6 min é indicativo da substância fenilalanina presente na *Arnica montana*. O mecanismo de fragmentação proposto para a substância fenilalanina no modo positivo sugere a perda de formiato $[HCO_2H]$, gerando o fragmento m/z 120,0808. O valor de massa par confirma a presença de um átomo de nitrogênio na molécula, não sendo observada a perda deste heteroátomo. O perfil de fragmentação proposto para a fenilalanina é apresentado na Figura 46.

Figura 46 – Mecanismo de fragmentação da substância fenilalanina no modo positivo.



Os picos com m/z 315,072 $[M-H]^-$ e m/z 153,0187 $[M-H]^-$, respectivamente com os T_R de 2,74 e 3,02 min são indicativos das substâncias ácido hidróxibenzóico glucopiranosídeo e ácido hidróxibenzóico, respectivamente. O perfil de fragmentação, das substâncias apresenta os fragmentos característicos de m/z 153,0193 referente a perda de uma hexose (162Da) do ácido hidroxi benzoico e o fragmento m/z 109,0295 decorrente da perda de uma molécula de CO_2 (44Da) do ácido hidroxibenzoico. O padrão de fragmentação do ácido hidroxibenzoico e de seu glicosídeo foi comparada com o descrito por

Coutinho et al. (2016) o qual descreve semelhante perfil de fragmentação. A presença destas substâncias foi verificada nas espécies *Arnica montana* e *Chaptalia nutans*. O perfil de fragmentação do ácido hidróxibenzoico glucopiranósido e do ácido hidróxibenzoico encontram-se nas Figuras 47 e 48, respectivamente

Figura 47 - Mecanismo de fragmentação do ácido hidróxi benzoico glucopiranósido no modode ionização negativo.

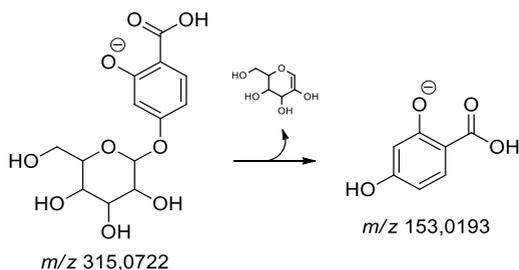
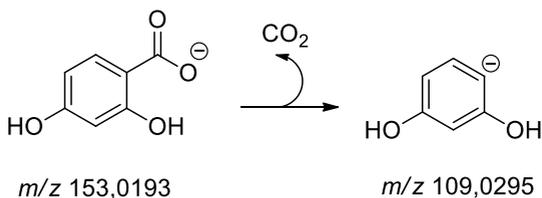


Figura 48 - Mecanismo de fragmentação do ácido hidróxi benzoico no modode ionização negativo.

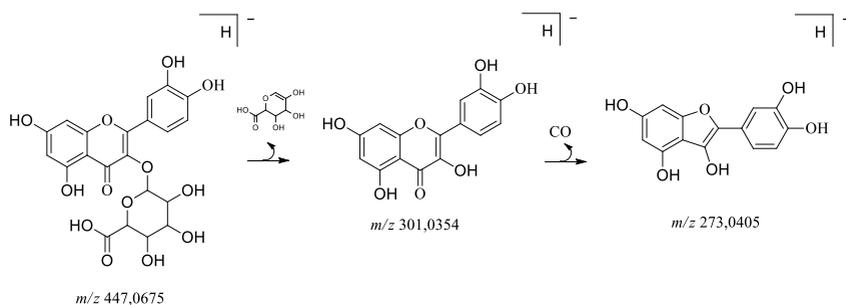


Além dos ácidos fenólicos encontrados, foram identificados 15 flavonóides nos cromatogramas obtido por ESI(-) e ESI (+) das soluções extrativas (tinturas) das arnicas, sendo descritos a segui.

Avaliando-se os dados de EM do íons m/z 477,0675 $[M - H]^-$, sugere-se tratar da substância quercetina-3-glucuronideo. A presença desta substância foi descrita previamente por Simon e colaboradores (2011) para a espécie *Arnica montana* bem e para outras espécies do gênero *Arnica*. No presente estudo, esta substância foi identificada na espécie *Arnica montana*, corroborando o descrito pelos autores.

Através dos fragmentos encontrados verificou-se a perda da porção glucuronide, seguido da perda de uma molécula de CO (perda de 28Da), gerando os fragmentos m/z 301,0354 (ion quercetina) e m/z 273,0405 (perda de uma molécula de CO₂ da porção aglicona). O perfil de fragmentação da substância quercetina-3-glucuronideo em ESI (-), utilizando energia de fragmentação de 30eV, encontra-se proposto na Figura 49.

Figura 49 -Mecanismo de fragmentação da substância Quercetin-3-glucuronide no modo de ionização negativo.



Avaliando-se os dados de EM dos picos íons base m/z 271,0685 [M - H]⁻ e 273,0767 [M + H]⁺ e tempo de retenção de 11,51 min, observou-se a presença da flavanona pinobanksin. Esta substância é descrita para espécies da tribo Vernoniae (Da SILVA et al., 2014) e no gênero *Lychnophora*, incluindo as espécies *Lychnophora ericoides*, *L. pinaster* e *L. salicifolia*, por Semir et al. (2011). No presente estudo, identificou-se esta flavanona nas espécies *Lychnophora ericoides*, *L. pinaster*, estando de acordo com a presença da mesma em espécies do genero, descrita pelos autores citados anteriormente. O mecanismo de fragmentação proposto para esta flavanona apresenta em modo negativo, a desidratação da substância ionizada (perda de 18 Da). Decorrente desta desidratação ocorre a formação de uma dupla ligação no anel C do flavonóide e utilizando-se desta dupla ligação propõe-se a fragmentação pelo mecanismo de retr-Diels-Alder gerando o fragmento m/z 107,0211 observado de forma intensa no espectro de massas. No modo de ionização positivo, o sinal de maior intensidade corresponde a perda de CO (perda de 28 Da) do anel C do flavonóide, gerando o fragmento de m/z 227,0703. O perfil de fragmentação da flavanona pinobanksin utilizando energia de

fragmentação de 30eV, nos modos de ionização negativo e positivo, encontram-se nas Figuras 50 e 51 respectivamente.

Figura 50- Mecanismo de fragmentação da flavanona pinobanksin em modo de ionização negativo.

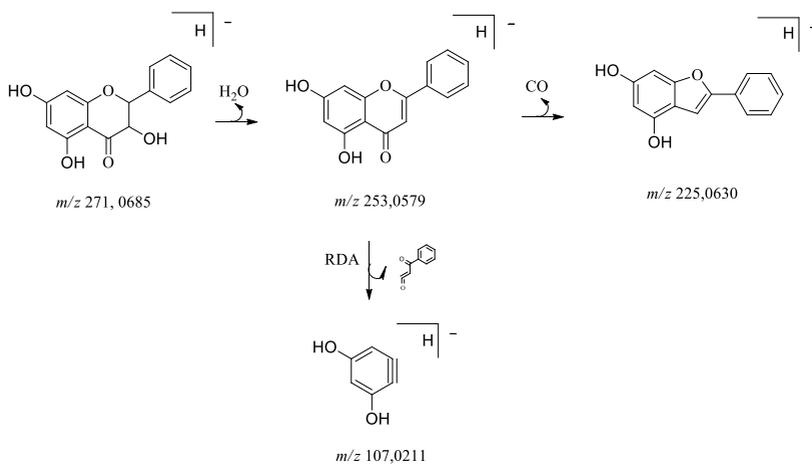
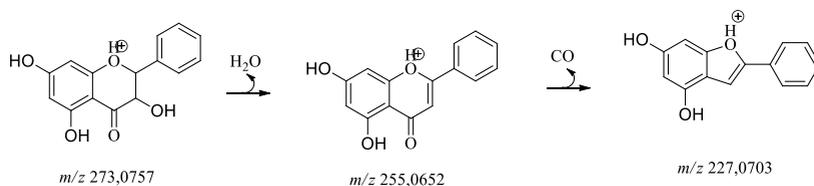


Figura 51 - Mecanismo de fragmentação da flavanona pinobanksina em modo de ionização positivo.



A presença da flavanona pinocembrina foi verificada através dos íons pico base m/z 255,0663 $[M - H]^-$ em ESI(-) e 257,0821 $[M + H]^+$ em ESI(+). A presença deste flavonoide nas espécies do gênero *Lycnophora* já é conhecida (SEMIR et al., 2011; LUSA et al., 2014). O mecanismo de fragmentação proposto para esta substância em modo de ionização positivo indica a perda de uma molécula de CO (perda de 28Da), gerando o fragmento com m/z 229,0859. No modo de ionização negativo, sugere-se a fragmentação da substância através do mecanismo retro-Diels-

Alder, identificando apenas a presença do fragmento com m/z 151,0037 devido a ionização da molécula ocorrer nas hidroxilas do anel A do flavonóide. O perfil de fragmentação da flavanona pinocembrin, utilizando energia de fragmentação de 30eV, nos modos de ionização negativo e positivo, encontra-se nas Figuras 52 e 53 respectivamente.

Figura 52. Mecanismo de fragmentação da flavanona pinocembrin em modo de ionização negativo.

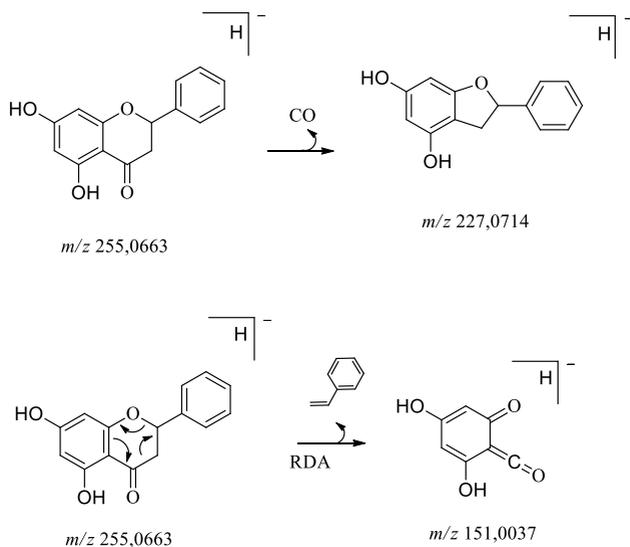
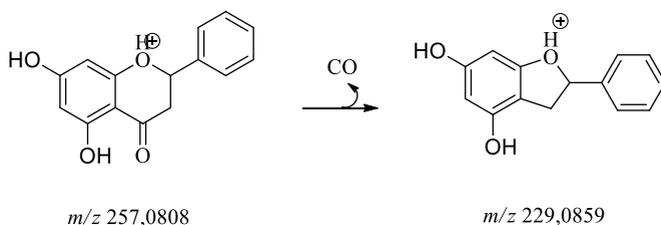


Figura 53. Mecanismo de fragmentação da flavanona pinocembrin em modo de ionização positivo.



Os picos com m/z 593,1512 $[M-H]^-$ e 595,1664 $[M+H]^+$ e T_R 5,09 min, são sugestivos do flavonoide C-glicosilado vicenin-2. A presença deste flavonoide nas espécies do gênero *Lycnophora* já é conhecida (SEMIR et al., 2011, LUSA, 2014). Através do espectro de massas obtido em modo de ionização negativo, foi inicialmente observado que a substância tratava-se de um flavonóide glicosilado decorrente de perda de massa de 120Da, sendo esta, uma perda comumente encontrada em flavonoides C-glicosilados. A fragmentação do vicenin-2 possivelmente ocorreu através da perda de uma molécula de água (18Da) da porção heterosídica gerando a formação de uma dupla ligação entre os carbonos C4 e C5. A partir desta dupla ligação, ocorre o mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) com perda do fragmento $C_4H_6O_3$. Nas Figuras 54 e 55, encontra-se o mecanismo de fragmentação da substância Pinocembrin em modo de ionização negativo e positivo, utilizando energia de 30eV.

Figura 54. Mecanismo de fragmentação da substância vicenin-2 em modo de ionização negativo.

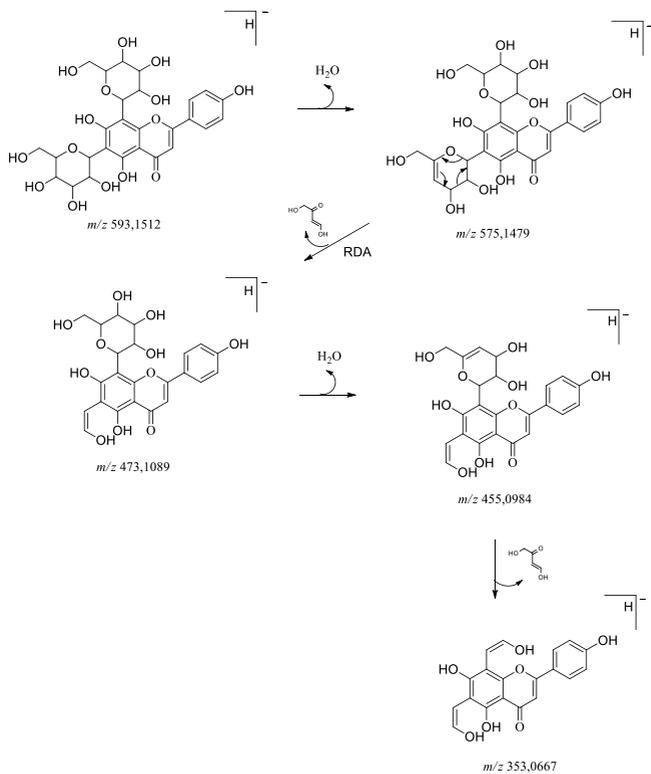
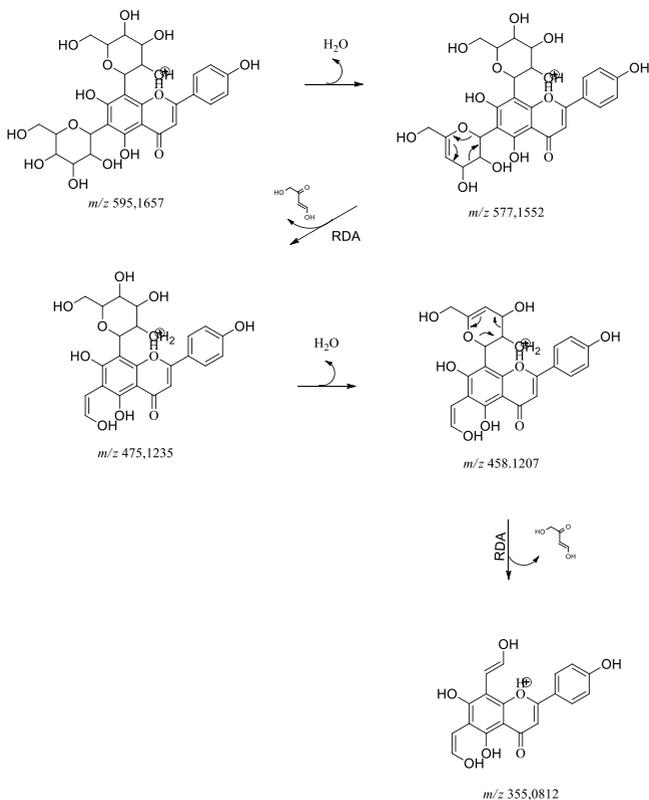


Figura 55 - Mecanismo de fragmentação da substância vicenin-2 em modo de ionização positivo.



Os picos cromatográficos com m/z 577,1563 $[M-H]^-$ e m/z 579,1719 $[M+H]^+$, presentes exclusivamente na espécie *Lychnophora pinaster*, indicaram a presença do flavonóide violantim ou isoviolantim, não sendo possível diferenciar estas substâncias através da técnica proposta. A ocorrência da perda de 120 Da presente no espectro de massas nos modos positivo e negativo, novamente indica a presença de um flavonóide C-glicosilado. Para as substâncias violantim ou isoviolantim observa-se, através do perfil de fragmentação, a perda de uma molécula de água (18Da) da porção heterosídica gerando a formação de uma dupla ligação entre os carbonos C4 e C5. A partir desta dupla ligação, ocorre o mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) com perda do fragmento $C_4H_6O_3$ da hexose e o fragmento $C_4H_6O_2$ pela hexose. Nas Figuras 56 e 57, encontra-se o mecanismo de fragmentação

da substância violantín em modo de ionização negativo e positivo, energia de fragmentação de 30eV.

Figura 56 - Mecanismo de fragmentação da substância violantín em modo de ionização negativo.

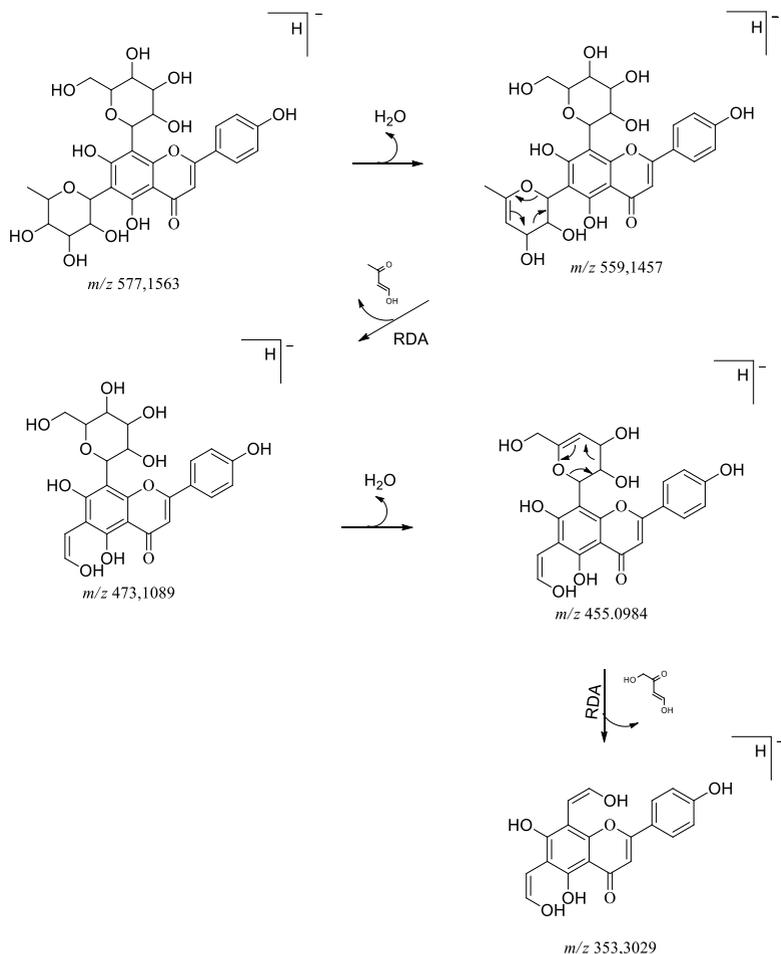
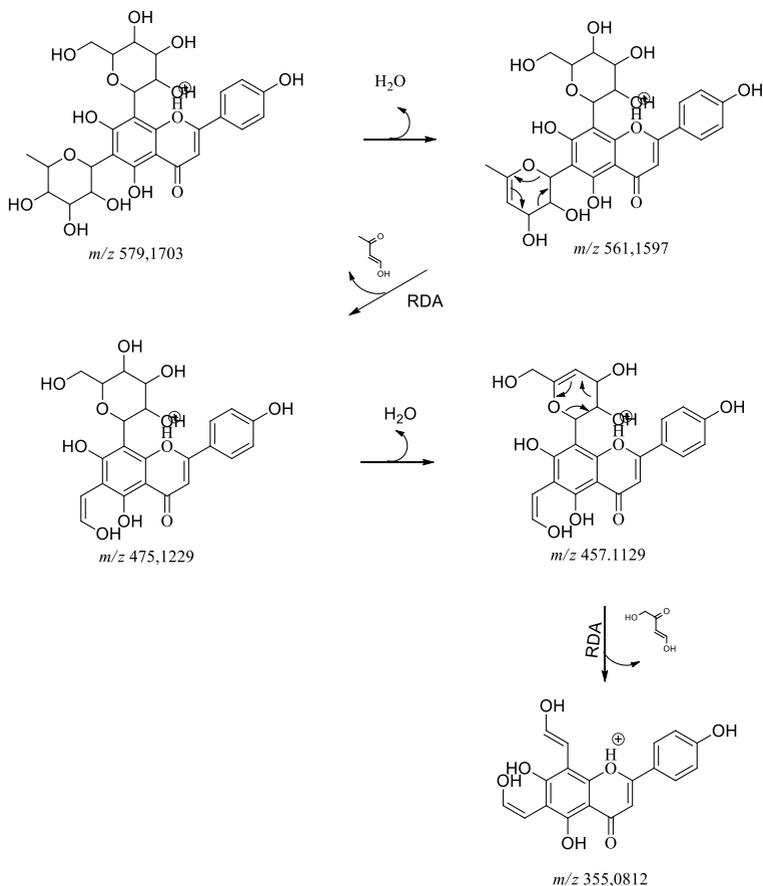


Figura 57 - Mecanismo de fragmentação da substância violantín em modo de ionização positivo.



O flavonóide luteolina (flavona) foi identificado nas espécies *Chaptalia nutans* e *Lychnophora pinaster* através da m/z 285,0405 [M-H]⁻ e m/z 286,0405 [M+H]⁺ com T_R de 9,8min. O perfil de fragmentação, bem como o tempo de retenção desta substância foi comparado com padrão analítico. Através da fragmentação (ESI⁻), observa-se o mecanismo de fragmentação através do mecanismo retro-Diels-Alder (RDA) decorrente das duplas ligações no anel A e anel C presentes na flavona. A perda de uma molécula de CO (-28Da) também mostrou-se presente (ESI⁻ e ESI⁺). O perfil de fragmentação da luteolina é descrito nas Figuras 58 e 59, respectivamente para os modos de ionização negativo e positivo, 30eV.

Figura 58 - Mecanismo de fragmentação da substância luteolina em modo de ionização negativo.

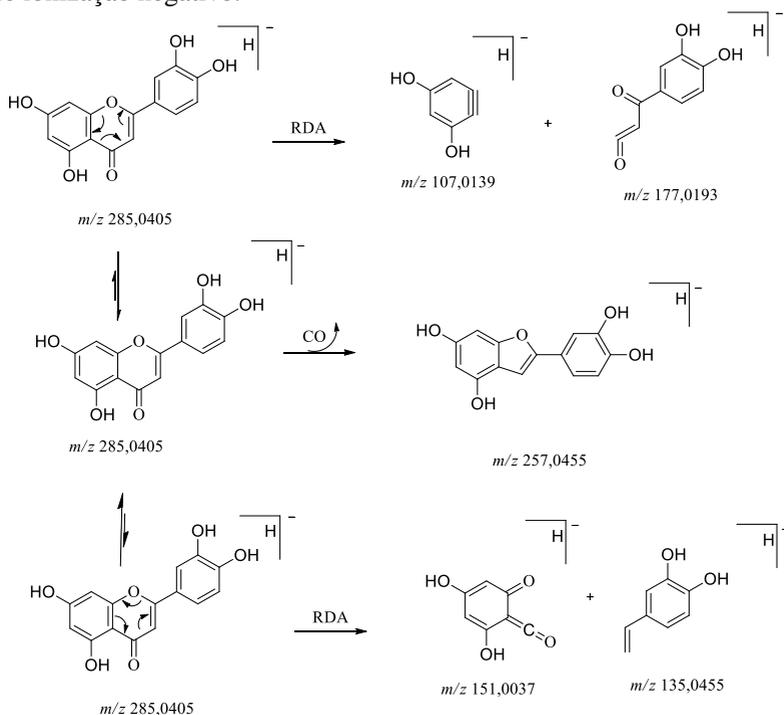
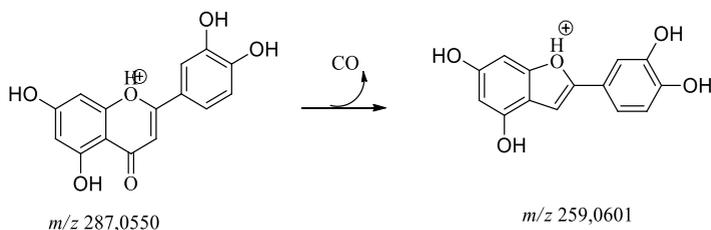


Figura 59. -Mecanismo de fragmentação da substância luteolina em modo de ionização positivo.



O pico com m/z 285,0405 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e 287,0550 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e T_R de 9,18 min, visualizado na espécie *Sphagneticola trilobata* é indicativo do flavonol caempferol. A presença do caempferol identificado por CL-EM

na espécie já foi relatada por Lang e colaboradores (2017). O perfil de fragmentação deste flavonóide se dá por perda de uma molécula de CO gerando o fragmento m/z 257,0455 e através do mecanismo retro-Diels-Alder (RDA) gerando dois fragmentos, m/z 151,0037 e m/z 135,0452. O perfil de fragmentação do flavonol caempferol é descrito nas Figuras 60 e 61, respectivamente para os modos de ionização negativo e positivo, 25eV.

Figura 60 - Mecanismo de fragmentação do flavonol caempferol em modo de ionização negativo.

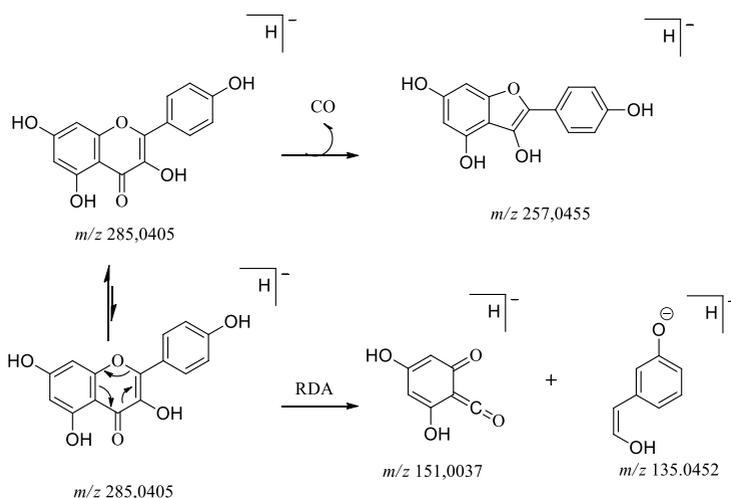
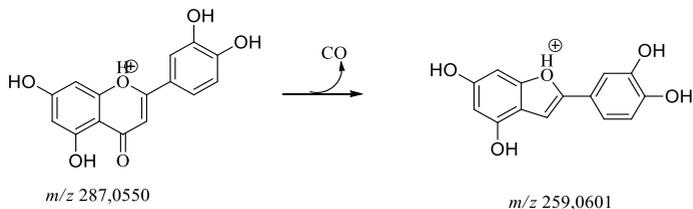


Figura 61. Mecanismo de fragmentação do flavonol caempferol em modo de ionização positivo.



A presença do flavonol glicosídico rutina nas espécies *Arnica montana* e *Sphagneticola trilobata* é sugerida através do pico com m/z 609,1461 e T_R 6,58min em modo de ionização negativo. O perfil de fragmentação e tempo de retenção (T_R) desta substância foi comparado com padrão analítico, injetado nas mesmas condições da amostra. O perfil de fragmentação da rutina demonstra a em modo negativo e positivo a perda de uma molécula de hexose (162Da) gerando o fragmento m/z 301,0354 ESI (-) e m/z 303,0499 ESI(+) referentes a porção aglicona da substância. O perfil de fragmentação do flavonol glicosídico rutina é descrito nas Figuras 62 e 63, respectivamente para os modos de ionização negativo e positivo, 30eV.

Figura 62 - Mecanismo de fragmentação da substância rutina em modo de ionização negativo.

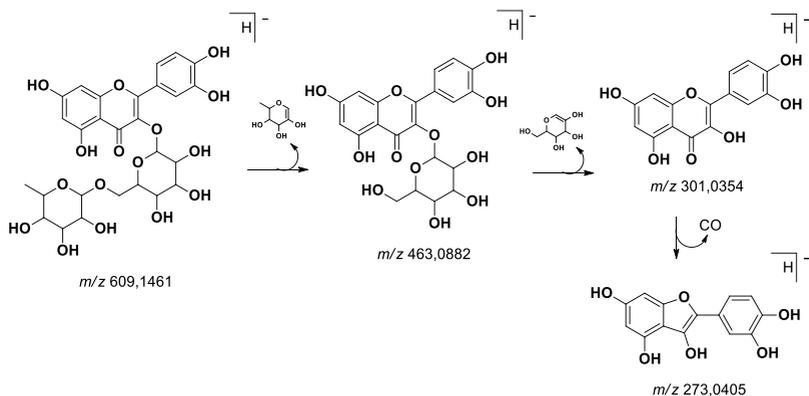
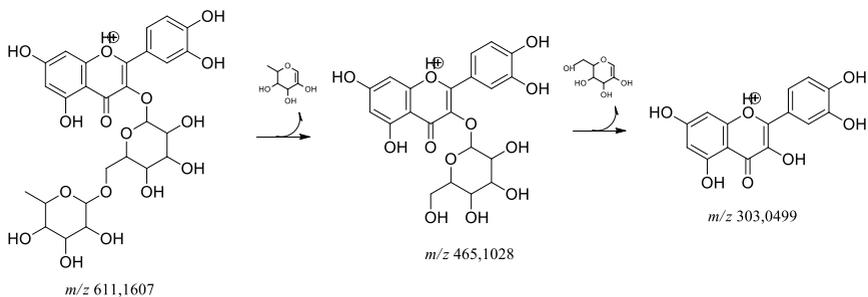


Figura 63. Mecanismo de fragmentação da substância rutina em modo de ionização positivo.



Através do pico cromatográfico de m/z 447,0933[M-H]⁻ e 449,1078[M+H]⁺ e T_R é sugestivo da quercetina-o-raminosídeo (quercitrina). A identificação desta substância foi realizada através do perfil de fragmentação, com padrão analítico da quercetina e a perda de massa correspondente a porção deoxihexose (-146 Da). A presença desta substância já é descrita para diversas espécies da família Asteraceae, sendo utilizada como marcador fitoquímico na espécie *Solidago chilensis* (VECHIA et al., 2016). No presente estudo, foi observada sua presença nas espécies *Chaptalia nutans*, *Lychnophor salicifolia*, *Solidago chilensis*; *Sphagneticola trilobata*. O perfil de fragmentação da quercitrina, 30eV, encontra-se nas Figuras 64 e 65.

Figura 64- Mecanismo de fragmentação da substância quercitrina em modo de ionização negativo.

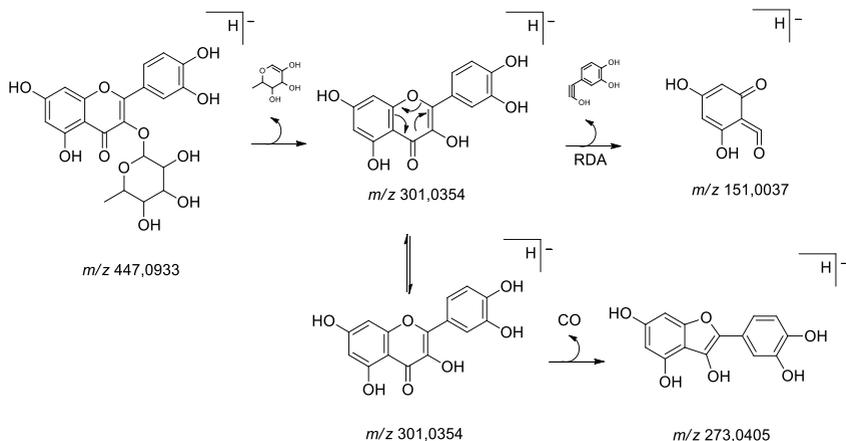
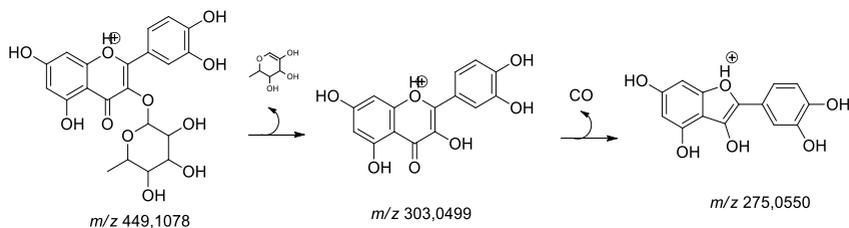
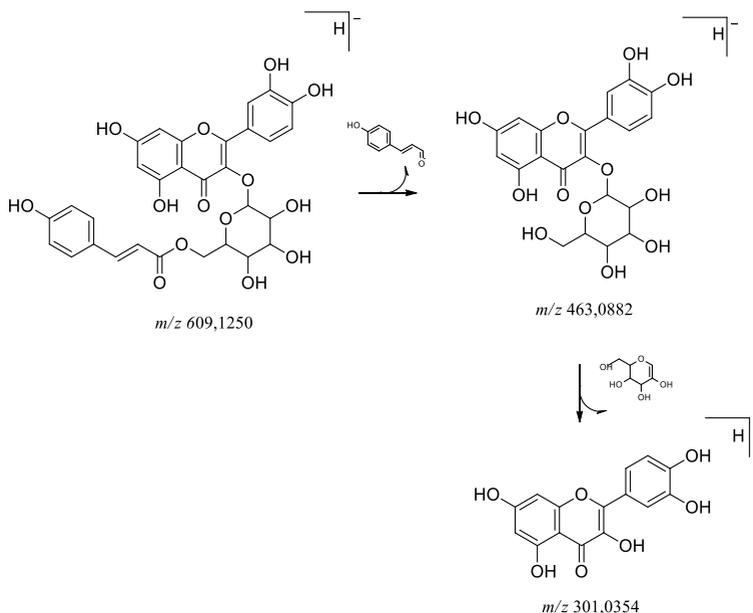


Figura 65- Mecanismo de fragmentação da substância quercetina em modo de ionização positivo.



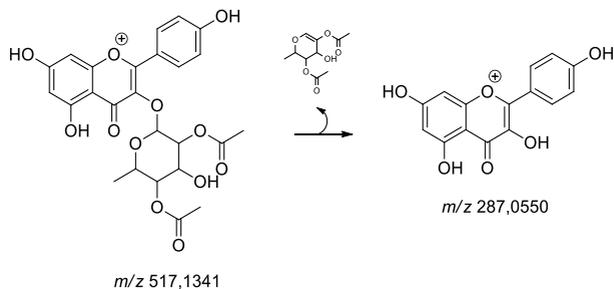
Entre os flavonoides sugeridos para as espécies, encontra-se o flavonol glicosilado, quercetina-(p-coumaroil)-glicopiranosídeo, sugerida através da m/z 609,1250 [M-H]⁻ no modo de ionização negativo. Esta substância é descrita presente na parte aéreas da espécie *Helichrysum stoechas*, apresentando flores amarelas e sendo pertencente a família Asteraceae (LAVAUT; RICHOMME, 2004). O mecanismo de fragmentação proposto para a quercetina-(p-coumaroil)-glicopiranosídeo em modo de ionização negativo demonstra a perda da porção coumaroil, gerando o fragmento m/z 463,0882 e posterior perda de hexose (162Da) gerando a aglicona m/z 301,0354. O perfil de fragmentação da da substância quercetina-(p-coumaroil)-glicopiranosídeo, 30eV, encontra-se na Figuras 66.

Figura 66 - Mecanismo de fragmentação da substância quercetina-(p-coumaroil)-glicopiranosídeo em modo de ionização negativo.



O flavonol campferol-acetil-ramnopiranosídeo é sugerido para a espécie *Lychnophora pinaster* através da m/z 517,1346 e T_R de 6,9 min. O perfil de fragmentação da substância proposta apresenta em modo de ionização positivo a perda da porção da estrutura referente a raminose acetilada (-230Da), o mecanismo de fragmentação da substância campferol-acetil-ramnopiranosídeo em modo de ionização negativo, 30eV, encontra-se na Figura 67.

Figura 67- Mecanismo de fragmentação do flavonol kaempferol-acetil-ramnopiranosídeo em modo de ionização positivo.



A presença da isoflavona orobol é sugerida a partir dos picos com m/z 285,0405 $[M-H]^-$ e 286 $[M+H]^+$ e T_R de 9,86min observada na espécie *Calea uniflora*. Para esta substância já se tem a confirmação de sua presença em diferentes espécies vegetais, tais como as espécies *Calea uniflora* (LIMA, 2016) e *Eclipta prostrata* (TEWTRAKUL et al., 2011), *Dalbergia odorifera* (LEE et al., 2013), *Litsea guatemalensis* Mez. (SIMÃO DA SILVA et al., 2012), entre outras. Para esta isoflavona são atribuídas diversas atividades farmacológicas, principalmente atividade anti-inflamatória (SIMÃO DA SILVA et al., 2012; TEWTRAKUL et al., 2011). A fragmentação proposta para o orobol demonstra perda de CO e fragmentação através do mecanismo retro-Diels-Alder (RDA). A fragmentação proposta em modo de ionização negativo e positivo, utilizando a energia de fragmentação de 25eV encontra-se nas Figuras 68 e 69.

Figura 68- Mecanismo de fragmentação da substância orobol em modo de ionização negativo

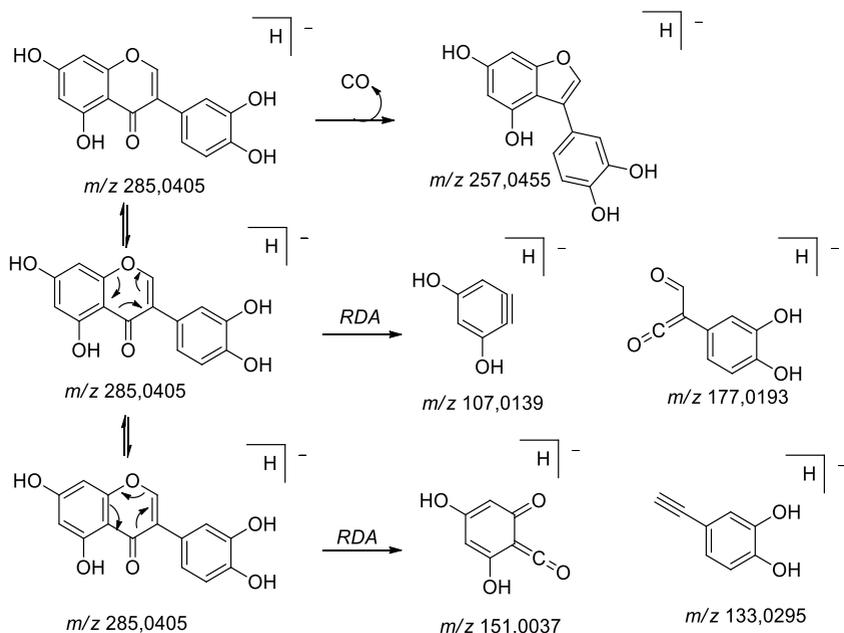
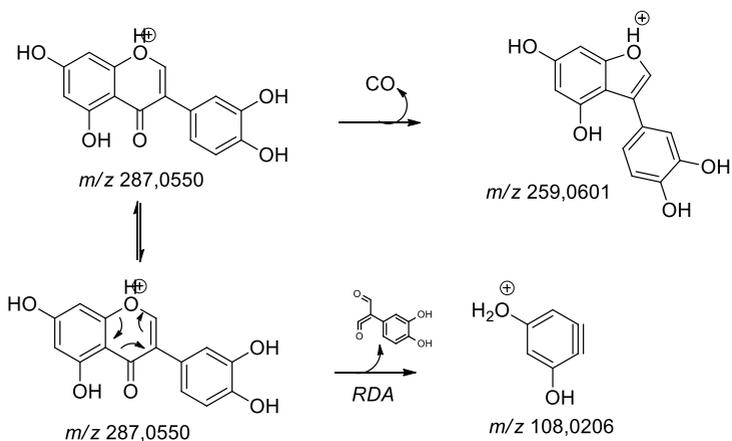


Figura 69 - Mecanismo de fragmentação da substância orobol em modo de ionização positivo.



A chalcona buteína foi identificada através do pico de m/z 271,0612 $[M-H]^-$ e T_R 8,4min, presente na espécie *Calea uniflora*. Esta

chalcona já foi previamente descrita para diferentes gêneros, principalmente o gênero *Calea* (CAVALCANTE et al., 2012; LIMA et al., 2015). Além disso, a buteína vem demonstrando grande potencial biológico anti-inflamatório, antinociceptivo e atumoral (JANG et al., 2012). O mecanismo de fragmentação proposto para esta substância segue o proposto por Padarthi e Namasivayam (2013) observando-se os fragmentos de m/z 136,0166 e 162,0322 decorrentes da fragmentação através de α -clivagem a carbonila. Outro mecanismo proposto é a ciclização da chalcona em catequina. Os mecanismos de fragmentação sugeridos para chalcona buteína em modo de ionização negativo e positivo, 25eV, encontram-se nas Figuras 70 e 71.

Figura 70 - Mecanismo de fragmentação da chalcona buteína em modo de ionização negativo.

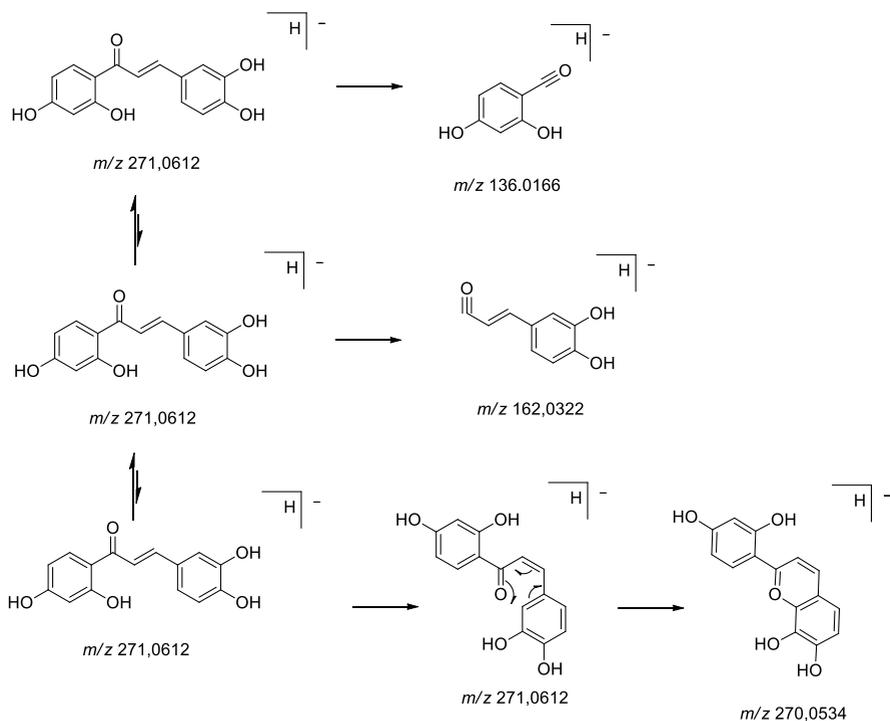
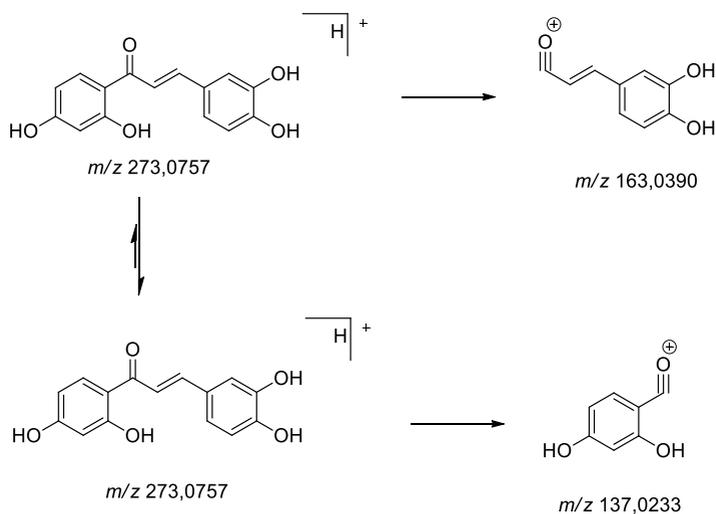


Figura 71 - Mecanismo de fragmentação da chalcona buteína em modo de ionização positivo.



Finalizando assim, a descrição dos diferentes flavonoides encontrados nas espécies populares conhecidas como arnica no Brasil.

Outra classe de metabólitos observada nas espécies, foi a presença de uma cromona, sendo sugestiva a presença da cromona noreugenina na espécie *Calea uniflora*. A identificação desta substância foi realizada inicialmente através da presença do pico cromatográfico 191,0350 [M-H]⁻ no modo de ionização negativo e de forma menos intensa no modo positivo 193,1755 [M+H]⁺, ambos em T_R 9,38 min. Os mecanismos de fragmentação da cromona noreugenin no modo de ionização negativo e positivo encontram-se respectivamente nas Figuras 72 e 73.

Figura 72 - Mecanismo de fragmentação da cromona noreugenin em modo de ionização negativo.

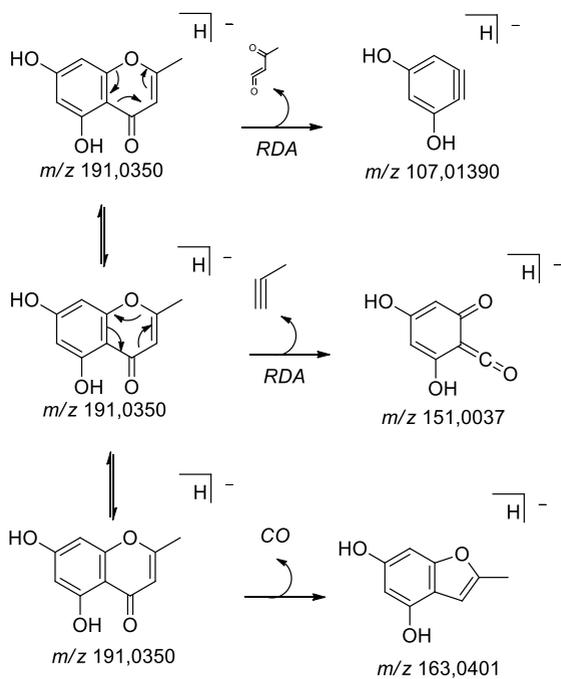
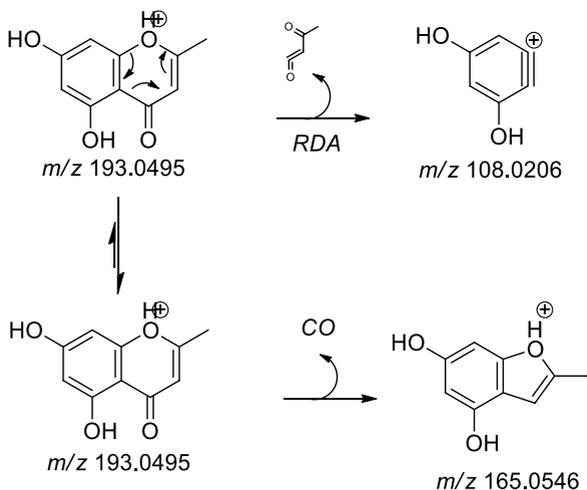
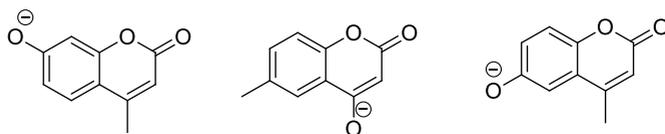


Figura 73 - Mecanismo de fragmentação da cromona noreugenin em modo de ionização positivo.



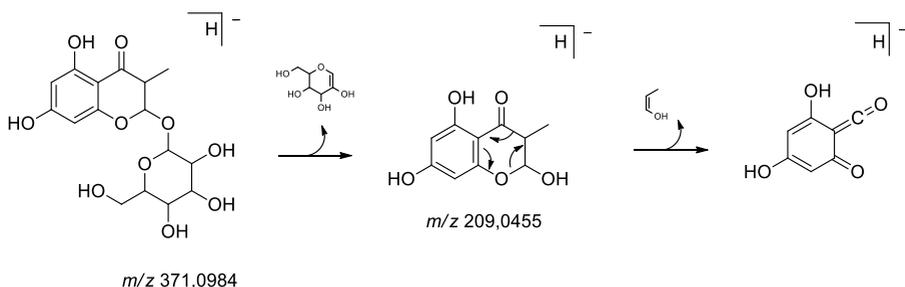
A presença de cumarinas foi observada na espécie *Chaptalia nutans* através da m/z 175,0400 [M-H]⁻ e 177,0553 [M-H]⁻, possivelmente tratando-se de uma hidroxí-cumarina. A identificação completa da substância não foi possível devido a dificuldade de estabelecer em qual carbono a hidroxila estaria ligada. A fragmentação da substância não foi conclusiva. Algumas das propostas encontram-se abaixo, Figura 74.

Figura 74 – Propostas de hidroxí-cumarinas para a espécie *Calea uniflora* em modo de ionização negativo.



Outra proposta de substância observada apenas na espécie *Calea uniflora* seria a sugestiva presença de uma cromanona glicosilada através da m/z 371,0979 e T_R 6,4 min em modo de ionização negativo. O mecanismo de fragmentação da cromanona glicosilada em modo de ionização negativo encontra-se na Figura 75.

Figura 75 - Mecanismo de fragmentação da cromanona glicosilada em modo de ionização negativo.



A classe dos terpenos, especificamente os diterpenos lábdanos, mostraram-se presentes na “arnica-erva-lanceta” *Solidago chilensis*, apresentando a m/z de 347,1864 $[M-H]^-$ e m/z 348,2010 $[M+H]^+$ em modo de ionização negativo e positivo, respectivamente. O esqueleto lábdano é sugerido através do perfil de fragmentação observado para a substância proposta (Figuras 76 e 77, respectivamente para ESI- e ESI+). Bohmann e colaboradores (1980), descrevem a presença e o perfil de fragmentação de derivados de diterpenos lábdanos em 15 espécies do gênero *Solidago*, corroborando com os achados no presente estudo.

Figura 76. Mecanismo de fragmentação do terpeno labdano em modo de ionização negativo.

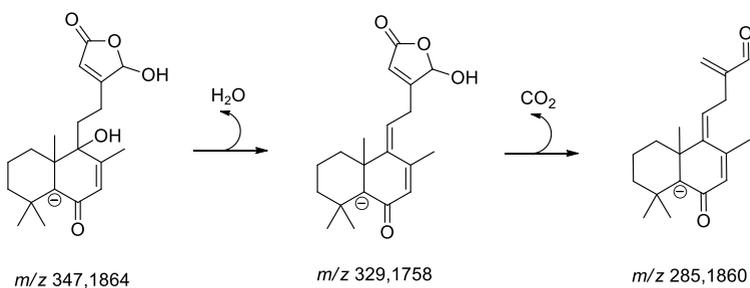
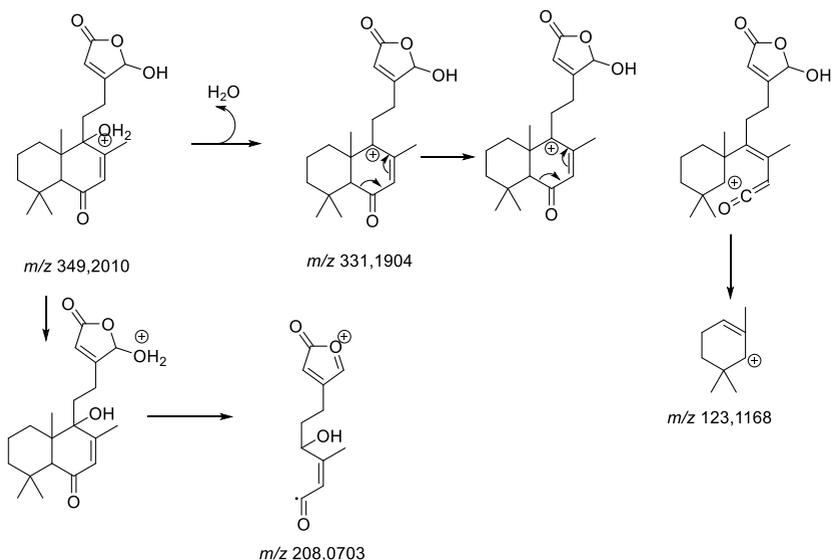


Figura 77. Mecanismo de fragmentação do terpeno labdano em modo de ionização positivo.



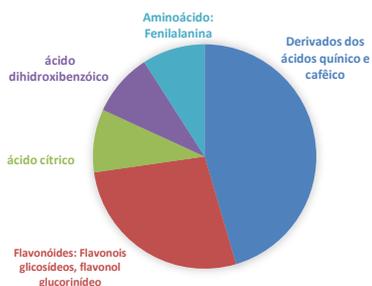
O perfil cromatográfico das tinturas foi comparado com o perfil cromatográfico dos chás de cada uma das espécies, realizados conforme o uso tradicional (infusão). A análise dos chás mostrou semelhança com o perfil químico obtido das tinturas. A principal diferença entre os chás e as tinturas é que nos chás, foi extraído maior quantidade de glicosídeos e a intensidade dos picos referentes aos ácidos quínico, ácido cítrico, caféico e derivados do ácido clorogênico foi superior. Assim como nas tinturas, também foi verificado nos chás, a presença dos flavonoides: orobol (isoflavona), buteína (chalcona), quercetina-(p-coumaroil)-glicopiranosídeo, quercetina-o-ramnosídeo (quercitrina), rutina (flavonol glicosídico), caempferol (flavonol), luteolina (flavona), violantin ou isoviolantin (flavona heterosídeo), vicenin-2 (flavona glicosilada), pinocembrin (flavanona), pinobanksin (flavanona), pinostrobim (monohidroxi-flavanona), quercetina-3-glucuronídeo. Presença de cromanona (cromanona glicosilada), cromona (noreugenin), cumarinas (hidroxi-cumarinas) e terpenos (lábdanos).

Através da análise de desreplificação dos extratos (tinturas e chás), foi possível identificar as principais classes de substâncias presentes nos preparos de uso tradicional. Assim, foram plotados gráficos

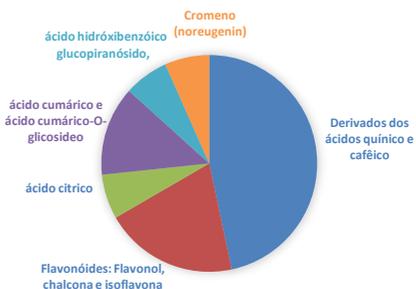
pizza com as proporções referentes a cada classe de metabólitos identificadas para cada uma das arnicas (Figura 78).

Figura 78 – Gráfico pizza das classes químicas identificadas nas 10 espécies de “arnica” através da análise de desreplicação dos extratos hidroalcoólicos (tinturas) e aquosos (chás).

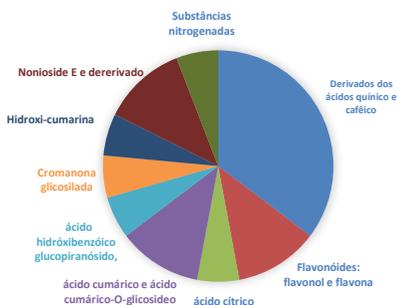
Arnica montana



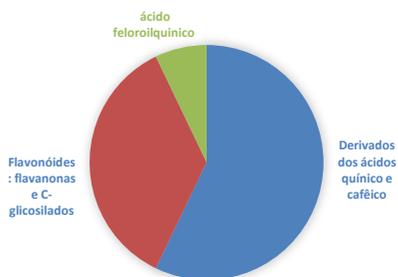
Calea uniflora

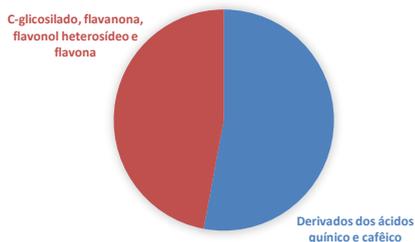
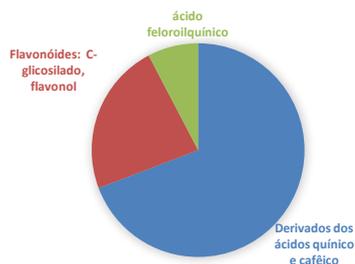
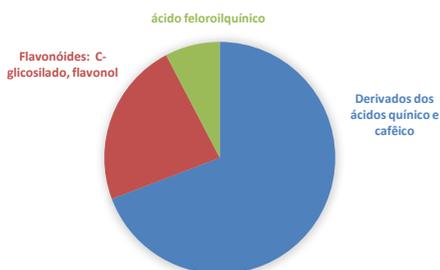
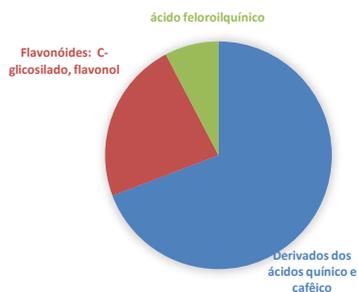
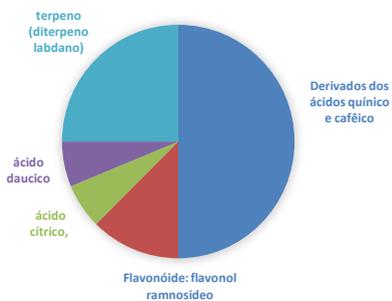
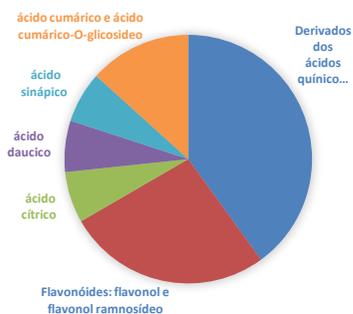


Chaptalia nutans



Lychnophora ericoides



Lychnophora pinaster*Lychnophora salicifolia**Porophyllum ruderal**Pseudobrickellia brasiliensis**Solidago chilensis**Sphagneticola trilobata*

Através dos dados de identificação das substâncias nos extratos obtidos de cada uma das espécies observou-se uma extração mais seletiva para compostos polares, com destaque para os derivados dos ácidos quínico e caféico (demarcados em azul escuro), seguido de flavonoides (vermelho) e posteriormente outras substâncias extraídas em menor quantidade (Figura 78).

Algumas substâncias nitrogenadas foram encontradas nas espécies *Chaptalia nutans* e *Porophyllum ruderale*, entretanto pela falta de dados disponíveis na literatura da composição química destas duas espécies e também dos gêneros nos quais elas se encontram, não foi possível identificar estas substâncias através da metodologia utilizada, visto que, não houve relação entre a composição elemental obtida no espectro de massas das substâncias quando confrontadas com dados disponíveis nas bases de dados utilizadas (Reaxys, SciFinder). Por este motivo, o estudo fitoquímico mais detalhado destas duas espécies ainda é necessário.

Substâncias pertencentes a classe dos terpenos foram identificadas apenas nos extratos da espécie *Solidago chilensis* (4 diterpenos com esqueleto lábdano, descritos previamente). Segundo estudos realizado por Simplicio et al (2015), diterpenos da subclasse labdano podem ter ação sobre o relaxamento do músculo liso vascular e desta forma podem induzir a queda da pressão arterial. Esta informação corrobora com o uma das aplicações populares da “arnica-erva-lanceta” (*Solidago chilensis*) para redução da pressão arterial descrita pelo mesmo autor.

Outra classe de substâncias pertencente aos terpenos e que apresentam grande valor medicinal, são as lactonas sesquiterpênicas (LS). Sabe-se que as espécies: *Arnica montana*, *Calea uniflora*, *Lychnophora ericoides*, *L. pinaster*, *L. salicifolia*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata* apresentam em sua composição química, a presença de LS. Estas substâncias isoladas reconhecidamente apresentam atividade biológica, principalmente anti-inflamatória (SEMIR et al., 2011, PRUDENCIO, 2012, CARVALHO, 2016). As principais LS descritas pela literatura para as espécies citadas são respectivamente: helenalina e seus derivados metacrilato e isobutirato (PERRY et al., 2009); 11,13-diidroxi-calaxina (CARVALHO, 2016); lychnopholide, eremantina e outras LS com esqueletos furanoheliangolideos presentes nas espécies de *Lychnophora* (SEMIR et al., 2011); helenalina e dihidrohelenalina (PRUDENCIO, 2012); paludolactona e wedelolactona (FILHO, 2000). Entretanto, no presente estudo não foram encontrados nos cromatogramas picos referentes a presença de lactonas sesquiterpênicas, obtidos em modo de ionização positivo e negativo, nos extratos das espécies de “arnica” avaliadas. Este fato provavelmente explica-se porque os líquidos

extratores de caráter polar utilizados: etanol 45% (tintura) e água aquecida (chá) não foram suficientes para extração destas substâncias de características apolares de seus respectivos sítios de produção e acúmulo na droga vegetal (ver Tabela 02). De forma geral a extração de lactonas sesquiterpênicas é realizada utilizando como líquidos extratores: acetona, metanol ou a associação de metanol e diclorometano/clorofórmio (FALEIRO, 2014; CARVALHO, 2016). Isto é corroborado pela indicação da presença de lactonas sesquiterpênicas sugerida pelos testes histoquímicos no presente trabalho.

Alguns autores sugerem para extração de LS o processo denominado de lavagem foliar, visto que o acúmulo principal destas substâncias é realizada nos tricomas glandulares presentes na superfície foliar. Este procedimento, descrito por Faleiro (2014), Da Silva (2015), Lusa (2016) utiliza de folhas secas e íntegras imersas em acetona sob leve agitação.

De forma geral, a ação anti-inflamatória descrita para as arnicas preparadas na forma de tinturas e chás parece não estar relacionada somente a presença de lactonas sesquiterpênicas, mas sim a presença de compostos fenólicos como ácido orgânicos e diversos flavonoides (Tabela 03 e 04). A ação anti-inflamatória dos flavonoides é descrita por diversos autores (FAQUETI, 2016, SANTOS; RODROGUEZ, 2017). Uma abordagem realizada por Mariño e colaboradores (2019) sugere que componentes antioxidantes como os flavonoides e derivados de ácido clorogênico, podem ter ação sob lesões de mucosas, pelo seu potencial anti-inflamatório e cicatrizante. Em trabalho realizado por YUI e colaboradores (1998), avaliando a ação anti-inflamatória da *Arnica montana* utilizando o modelo de edema de pata de ratos demonstrou que a *Arnica* tem em sua composição química flavonóides e que estes estão relacionados a ação interferente de enzimas relacionadas a mediadores do processo inflamatório como é o caso da Fosfolipase A2 e C e da lipo e ciclogênase. No estudo, os autores demonstram que o edema de pata dos ratos provocado pela administração de formalina foi igualmente reduzido pela aplicação de tintura de arnica e pelo controle (betametazona).

No presente estudo, através da identificação das substâncias presentes nas tinturas e chás, foram selecionados possíveis fitomarcadores para diferenciação das espécies de arnica na forma de tinturas ou chás, conforme indicadas na Tabela 4.

Tabela 04 – Fitomarcadores ou classes químicas sugeridas para diferenciação das espécies conhecidas popularmente como “arnica” no Brasil através da análise das tinturas e chás das respectivas espécies.

Espécie vegetal	Classe química	Marcadores sugeridos	Nível de confiança*
<i>Arnica montana</i>	Flavonol glucoronídeo	Quercetina-glucuronídeo	Nível 2
	Flavonol glicosídeo	Rutina	Nível 1
<i>Calea uniflora</i>	Chalcona	Buteina	Nível 2
	Isoflavona	Orobol,	Nível 2
	Cromeno	Noreugenin	Nível 2
<i>Chaptalia nutans</i>	Cumarina	Hidroxi-cumarina	Nível 3
	Cromanona	Cromanona glicosilada	Nível 3
<i>Lychnophora ericoides</i>	Flavanonas	Pinobanskin, pinocembrim, pinostrombim	Nível 2
	Flavona glicosilada	C- Vicenin-2	Nível 2
<i>Lychnophora pinaster</i>	Flavanona	Pinobanskin, pinocembrim, pinostrombim,	Nível 2
	Flavona glicosilada	C- Vicenin-2	Nível 2
	Flavona heterosídica	C- isoviolanthin	Nível 2 ou
<i>Lychnophora salicifolia</i>	Flavonol ramnosídeo	Caempferol-acetil-raminopiranosídeo	Nível 2
	Flavona glicosilada	C- Vicenin-2	Nível 2
<i>Porophyllum ruderale</i>	n.e.	n.e.	
<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	n.e.	n.e.	
<i>Solidago chilensis</i>	Diterpeno	Diterpeno lábdano	Nível 3
<i>Sphagneticola trilobata</i>	Flavonol	Caempferol	Nível 2
	Flavonol glicosídeo	Rutina	Nível 1

Esta comparação é válida apenas entre as espécies avaliadas no presente estudo nas formas extrativas de extratos hidroalcoólicos (45%) e aquosos (chá). N.e – não encontrado. * Sistemas de nível de confiança na identificação de metabólitos para estudos metabolômico, proposto por “Chemical Analysis Working Group (CAWG) of the Metabolomics Standards Initiative (MSI)”, adotando a classificação de 0-5 (in Godzien et al., 2018).

A fim de avaliar a presença de lactonas sesquiterpênicas, no presente estudo realizou-se a lavagem foliar das espécies *Calea uniflora*, *Popophyllum ruderale*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata*. As espécies do gênero *Lychnophora* e *Pseudobrickellia brasiliensis* não foram avaliadas devido à falta de material disponível. Para a lavagem, cerca de 5 folhas inteiras de cada “arnica” selecionada foram imersas em acetona P.A e submetidas a movimentos circulares durante 10 min a 15rpm e em temperatura ambiente conforme o método proposto por Da Silva (2015). Os cromatogramas obtidos encontram-se nas Figuras 79, 80 e 81.

Este procedimento levou a extração de lactonas sesquiterpênicas (LS) das espécies: *Calea uniflora* (LS 11,13-diidroxi-calaxina), *Solidago chilensis* (LS 6-0-isobutiril-tetrahidrohelenalina e diterpeno solidagenona) e *Sphagneticola trilobata* (LS Wedelóide A e Trilobolideo-6-*O*-isobutirato). A identificação destas substâncias foi realizada comparando a massa exata das LS e a composição elemental das mesmas, considerando erro de até 6ppm. A presença destas substâncias nas espécies já é conhecida, sendo descrita por Carvalho (2016) a presença da lactona 11,13-diidroxi-calaxina em *Calea uniflora*; Prudencio (2012) descreve a presença da LS helenalina e diterpeno solidagenona em *Solidago chilensis*; Duc et al. (2016) e Filho (2005) apresentam respectivamente as LS Wedeloide A e Trilobolideo-6-*O*-isobutirato em *Sphagneticola trilobata*. Desta forma é confirmada a presença de lactonas sesquiterpênicas nas espécies *Calea uniflora*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata*. Por fim, concluiu-se que os extratos preparados com etanol (45%) e água aquecida não são eficientes para a extração das LS mas que as mesmas encontram-se presentes nas espécies.

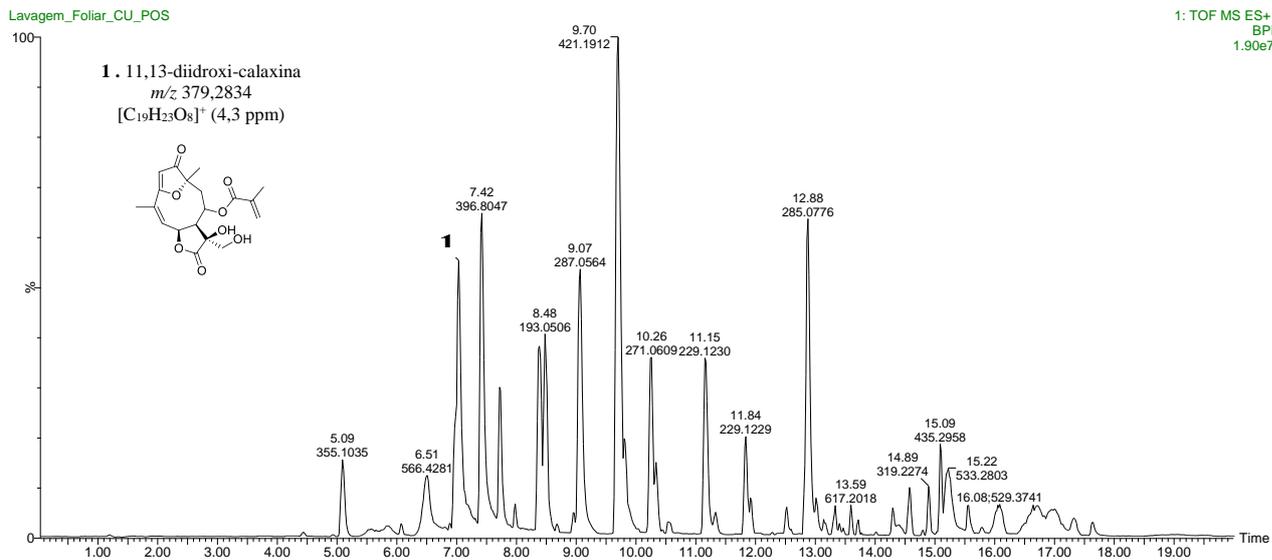
Figura 79 - Cromatograma de picos base obtidos por *ESI(+)* dos extratos acetônicos das folhas de *Calea uniflora*.

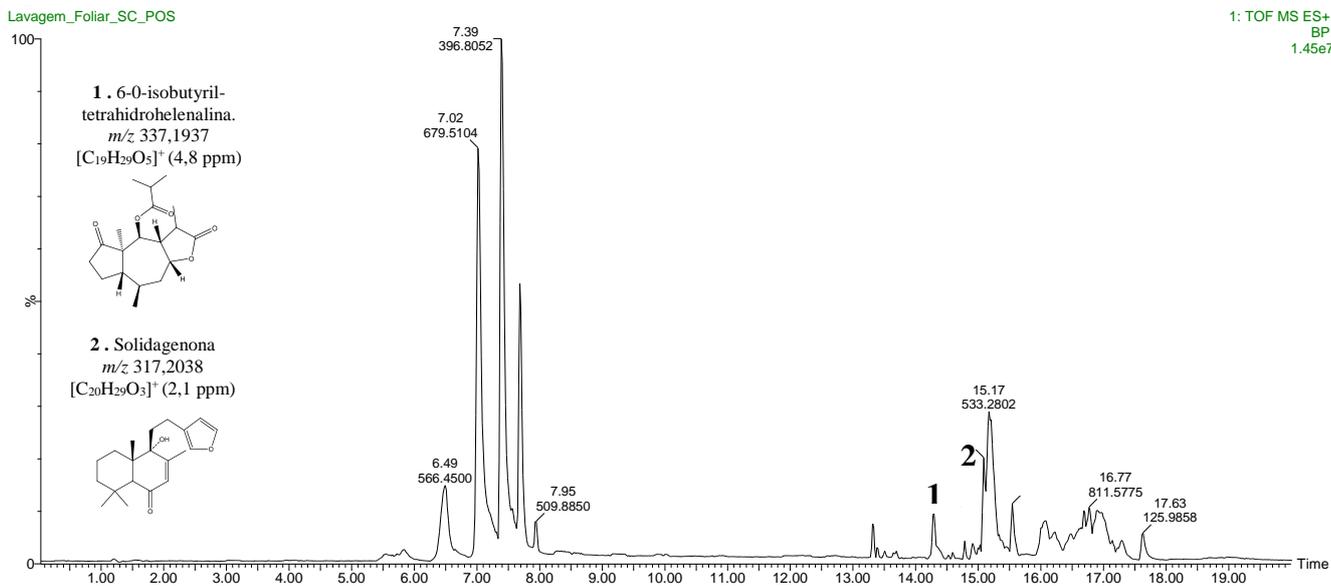
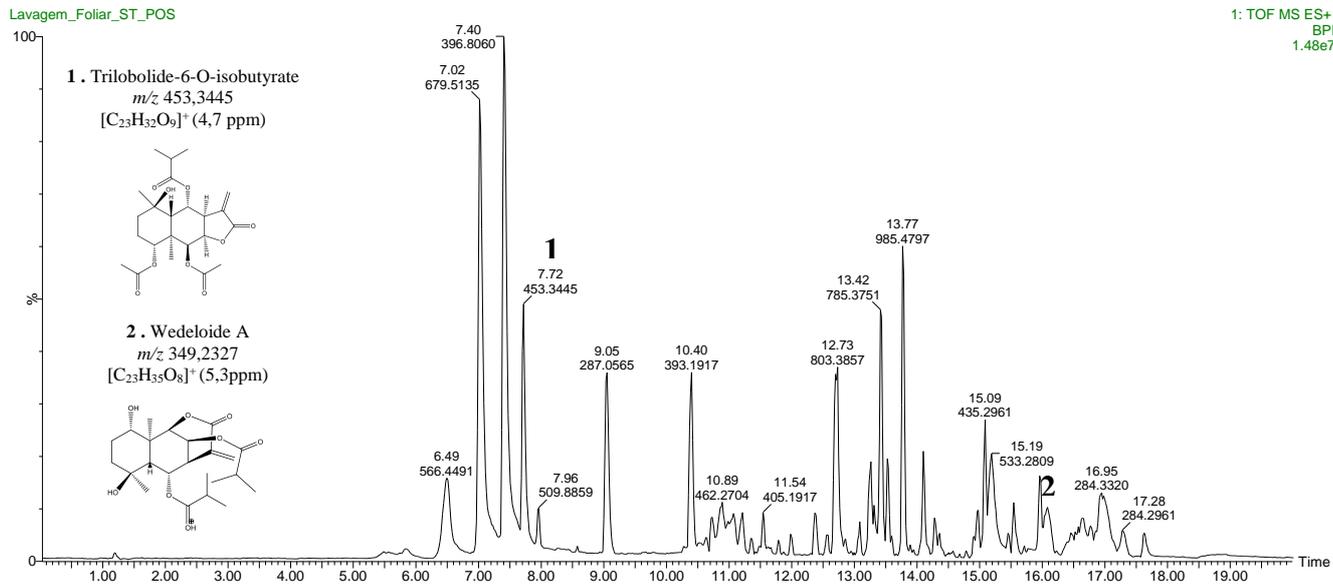
Figura 80 - Cromatograma de picos base obtidos por *ESI(+)* dos extratos acetônicos das folhas de *Solidago chilensis*.

Figura 81 - Cromatograma de picos base obtidos por *ESI(+)* dos extratos acetônicos das folhas de *Sphagneticola trilobata*.



6 CONCLUSÕES

- Através da avaliação morfoanatômica e química de selecionadas espécies utilizadas no Brasil como “arnica”, sendo elas *Calea uniflora*, *Chaptalia nutans*, *Lychnophora diamantinana*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora pinaster*, *Lychnophora salicifolia*, *Porophyllum ruderale*, *Pseudobrickellia brasiliensis*, *Solidago chilensis* e *Sphagneticola trilobata*, foram identificadas estruturas anatômicas características presentes nas folhas das espécies e marcadores químicos específicos para cada uma das espécies.

- Os resultados revelaram caracteres anatômicos essenciais para o diferenciação e identificação das arnicas, sendo estes: Nervura central, anexos epidérmicos (tricomas glandulares, não glandulares e estômatos), parênquima clorofiliano, formato dos feixes vasculares e estruturas secretoras. A técnica de microscopia eletrônica de varredura possibilitou complementar a avaliação da superfície foliar.

- Através dos testes histoquímicos (cloreto férrico, sudam, ácido sulfúrico e vermelho de rutênio) conclui-se que o principal sitio de produção/acumulo de substâncias nas espécies avaliadas são os tricomas glandulares, seguido de estruturas secretoras internas e células parenquimáticas do mesofilo. Através destes testes, foi identificada a presença de compostos fenólicos, composto lipofílicos, possíveis lactonas sesquiterpênicas e compostos pécticos. Os dados mostraram-se de acordo com o descrito em literaturas para as classes de substâncias já identificadas nas espécies.

- Através da desreplicação dos extratos (tinturas e chás), foram identificadas 45 substâncias, entre eles: o flavonoide buteina e o cromeno noreugenin em *Calea uniflora*; hidroxi-cumarina e cromanona glicosilada em *Chaptalia nutans*; flavonoides pinobanskin e vicenin-2 para *Lychnophora ericoides*; flavonoides vicenin-2, violanthin/isoviolanthin para *Lychnophora pinaster*; flavonoides campferol-acetil-rhamnopyranosídeo e vicenin-2 para *Lychnophora salicifolia*; diterpenos lábdanos para *Solidago chilensis* e os flavonoides campferol e rutina para *Sphagneticola trilobata*. Sendo estes possíveis marcadores para diferenciação e identificação das arnicas entre as espécies avaliadas.

- Por fim, conclui-se que este estudo gerou importantes subsídios para identificação e diferenciação das arnicas utilizadas popularmente no

Brasil, visto que são poucos os estudos sobre a química dos preparos tradicionais, bem como dados sobre a morfomatômia vegetal das referidas espécies.

7 REFERÊNCIAS

ABREU V. G. C. **Estudo fitoquímico e biológico das folhas, caules e flores de *Lychnophora pinaster* Mart.** Dissertação (mestrado) - Programa de pós graduação em química. Universidade Federal de Minas Gerais, BH. p.104, 2009.

ALCÂNTARA, A. F. C.; SILVEIRA, D.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; GUIMARÃES, J. E.; RASLAN, D. S. Comparative analysis of the trypanocidal activity and chemical properties of E-lychnophoric acid and its derivatives using theoretical calculations. **Eclética Química**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 37-45, 2005

ALFREDO, P.P.; ANARUMA, C.A.; PIÃO, A.C.S.; JOÃO, S.M.A.; CASAROTTO, R.A. Qualitative analysis of effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 15, p. 273-279, 2008.

ALMEIDA, V.G. et al. Inhibitory effect of the *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R.M. King & H. Rob. aqueous extract on human lymphocyte proliferation and IFN- γ and TNF- α production in vitro. **Brazilian Journal of Medical And Biological Research**, v. 50, n. 8, p.5163-5173, 10 jul. 2017.

AMORIM, M.L.L.; GODINHO, W. M.; ARCHANJO, F. C.; GRAEL, C. F. F. Chemical constituents of *Pseudobrickellia brasiliensis* leaves(Spreng.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. S.i, v.18, n. 2, Abril/jun. 2016.

ANDENBERG, A.A.; BALDWIN, B.G.; BAYER, R.G.; BREITWIESER, J.; JEFFREY, C.; DILLON, M.O.; ELDEÑAS, P.; FUNK, V.; GARCIA-JACAS, N.; HIND, D.J.N.; KARIS, P.O.; LACK, H.W.; NESON, G.; NORDENSTAM, B.; OBERPRIELER, CH.; PANERO, J.L.; PUTTOCK, C.; ROBINSON, H.; STUESSY, T.F.; SUSANNA, A.; URTUBEY, E.; VOGT, R.; WARD, J.; WATSON, L.E. **Compositae**, p. 61- 588, 2007. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey (Eds.). Flowering Plants Eudicots Asterales, Vol. VIII. The Families and Genera of Vascular Plants, K. Kubitzki (Ed.). Springer – Verlag.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. 3. ed. rev. e atual. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2012. 404 p

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Medicinal plants: popular culture versus science. **Vivências**, v.7, n.12: p.51-60, 2011.

BACCARIN, T.; CZEPULA, A.I.; FERREIRA, R. A.; LUCINDA, R.M.. Análise morfoanômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. **Brazilian Journal Of Pharmacognosy**, v. 2, n. 19, p.612-616, 2009.

BADILLA, B.; MORA, G.; POVEDA, L.J. Antiinflammatory activity of aqueous extracts of five Costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats. **Revista de Biologia Tropical**, v.47, n.4, p.723-727, 2000.

BARROS, R. F. M.; ESTEVES, R. L. Nova espécie de *Stilpnopappus* Mart. ex DC. (Asteraceae - Vernonieae) para o Piauí, Brasil. **Boletim do Museu Nacional**, n. 125, v. 1-6, 2004.

BARROS, R.F.M, SEMIR, J. Uma nova espécie de *Elephantopus* L. (Asteraceae) do estado do Piauí, Brasil. **Ernstia**, v.1, p. 95-99, 2003.

BATISTA, R.; GARCÍA, P.A.; CASTRO, M.A.; CORRAL, J.M.; FELICIANO, A.; OLIVEIRA, A. ***Iso-Kaurenoic acid from *Wedelia paludosa* D.C.*** Academia Brasileira de Ciências, v. 82, p. 823-831, 2010.

BENTHAM, G. Notes on the classification, history and geographical distribution of the Asteraceae. J. Linn. **Société Botanique**, v. 13, p. 335-577, 1873.

BENYAHIA, S.; BENAYACHE, F.; BENAYACHE, S. Flavonoids from *Artemisia arborescens*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 6, p. 1132-1133, 2014.

BIESKI, I. G. C.; LEONTI, M.; ARNASONC, J.T.; FERRIER, J.; RAPINSKI, M.; VIOLANTE, I.M.P.; BALOGUN, S.O.; PEREIRA, J.F.A.; FIGUEIREDO, R. C. F.; LOPES, C. R. A. S.; SILVA, D. R.; PACINI, A. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of

Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, s.l., v. 173, p.383-423, 2015.

BLUM-SILVA, C. H.; LUZ, A.B.; NASCIMENTO, M.V.; DE CAMPOS FACCHIN, B.M.; BARATTO, B.; FRÖDE, T.S.; SANDJO, L.P.; DALMARCO, E.M; REGINATTO, F.H. Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. **Data In Brief**, v. 8, p.295-299, 2016.

BOHLMANN, F.; FRITZ, U.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2655-2661, 1980.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H., A hydroxygermacrene and other constituents from *Pseudobrickellia brasiliensis*. **Phytochemistry**, n. 23, p. 1798-1799, 1984.

BRASIL, **Farmacopéia Brasileira**, 5. ed., 2010. São Paulo: Atheneu.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Timber Press, Portland, OR; 1994.

BORELLA, J. C., LOPES, J. L. C., VICHNEWSKI, W., CUNHA, W. R., HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, 671 - 676. 1998.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M.R.; FARAGO, P.V.; TAKEDA, I.J.M. Caracteres anatômicos de folha e caule de *Calea uniflora* Less., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Paraná, v. 1, n. 16, p.53-60, 2006.

CARVALHO, T.C.L. **Estudo fitoquímico e de bioatividade de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. E *Calea uniflora* Less. (ASTERACEAE)**. 2016. 301 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CASANOVA, D. **Identificação de espécies vegetais por meio de análise de textura foliar**. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Computação e Matemática Computacional, Ciências da

Computação e Matemática Computacional, Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, São Carlos, 2008.

CAVALCANTE, M. G. B.; et al. Furanoflavones and other chemical constituents of *Lonchocarpus obtusos*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 301-305, 2012.

CHADWICK, Martin et al. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p.12780-12805, 2013.

CHEN, Shilin et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p.1237-1244, 2014.

CHORNOBAI, C.A.M. **Peterminação do ácido quínico e derivados antioxidantes da erva mate (*Ilex paraguariensis*)**. Tese (Doutorado), 2008. 174f. Programa de Pós-Graduação em Química. Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR, 2008.

CHRISTENSEN, L. P.; LAM, J. Acetylenes and related compounds in Heliantheae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-49, 1991.

CLIFFORD, M. N.; JAGANATH, I. B.; LUDWIG, I. A.; CROZIER, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. **Natural product reports**, v. 34, n. 12, p. 1391-1421, 2017.

COLLINS, C.H; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, SP: Ed. da Unicamp, 2006.

COUTINHO, I. D.; BAKER, J. M.; WARD, J. L.; BEALE, M. H.; CRESTE, S.; CAVALHEIRO, A. J. Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 21, p. 4198-4206, 2016.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia, University Press, v.1, p. 1261, 1988.

CUTLER, D. F.; BOTHA, C. E. J.; STEVENSON, Dennis Wm. **Anatomia vegetal: uma abordagem aplicada.** Porto Alegre: Artmed, 2011. 304 p.

DA SILVA, L.A.L. **Investigação fitoquímica da espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob.** 2016. 184 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DE OLIVEIRA, D.M ; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras** **Aplicações e preparação de amostras:** Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. Rio Grande do Sul: Edipucrs, 2007. 60 p.

DUARTE, M.R.; SIEBENROK, M.C.N.; EMPINOTTI, C.B. Anatomia comparada de espécies de arnica: *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. e *Chaptalia nutans* (L.) Pohl. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, Curitiba, v. 28, n. 2, p.192-201, 2007.

DUC, T. P.; THIEN, T.V.N.; JOSSANG, A.; KIM, P.P.N.; GRELLIER, P.; JAUREGUIBERRY, G.; THAT, Q.T. New wedeloides, (9R)-eudesman-9,12-olide δ -lactones, from *Wedelia trilobata*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 304-309, 2016.

ELIZABETZBY, E. "Etnofarmacologia como Ferramenta na Busca de Substâncias meloAtivas". 1999

EMERENCIANO, V. P.; et al. Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 5, p. 891-899, 2007

EMPINOTTI, C. B. **ESTUDO ANATÔMICO FOLIAR E CAULINAR DE ESPÉCIES MEDICINAIS DE ASTERACEAE: *Chaptalia nutans* (L.) POL., *Elephantopus mollis* KUNTH E *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A. GRAY.** 2005. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

EMPINOTTI, C. B; DUARTE, M. R. Caracteres Anatômicos de arnica-do-campo: *Chaptalia nutans*. **Acta Farm. Bonaerense**, Curitiba, v. 3, n. 25, p.333-338, 2006.

FALEIRO, D. P. V. **Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama La llave* (Asteraceae) e inibição das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase**. Dissertação (Mestrado). 2014. 161f. Programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto/USP. 2014.

FAQUETI, L.G. **Quantificação por Cromatografia líquida de ultra eficiência de marcadores presentes no extrato aquoso de *Ageratum Conyzoides* L. (Asteraceae)**. 2016. 152f. Programa de pós graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

FERRARI, F. C.; et al. Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Lychnophora trichocarpha*, Brazilian arnica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1104-1110, 2012.

FERNANDES, Y. S. **Morfoanatomia, tricomas glandulares e análise fitoquímica DE *Trichogonia eupatorioides* (Gardner) R. M. King & H. Rob (ASTERACEAE/EUPATORIEAE) OCORRENTE EM ÁREA DE CERRADO RUPESTRE**. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

FERREIRA, A. A. ; AZEVEDO, A. O.; SILVEIRA, D.; OLIVEIRA, P. M.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituents of *Lychnophora pinaster* hydroalcoholic extract. **Chemistry of Natural Compounds**, v.41, n. 1, p. 466-466, 2005.

FILHO, V. C.; BLOCK, L. C.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Paludolactone: A new Eudesmanolide Lactone from *Wedelia Paludosa* Dc. (*Acmela Brasiliensis*). **Natural Product Research**, v. 18, n. 5, p.447-451, out. 2004.

FILHO, V.C. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Quimica Nova**, v. 23, p. 680-685, 2000.

Flora do Brasil. Arecaceae in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB53>>. Acesso em: 13 Mai. 2019.

FONSECA, M.C.M.; MEIRA, R.M.S.A.; CASALI, V.W.D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha**, n. 24, p.707-713, 2006

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium Oxalate in Plants: Formation and Function. **Rev. Plant Biol.**, Si, n. 56, p.41-71, 2005.

FREIRES, I. D. A.; L. A. ALVES, V. D. C.; JOVITO, L. D. F. D. D.; ALMEIDA, R. D. D.; CASTRO AND W. W. N. PADILHA. "Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário." **Odontologia Clínica-Científica**, v.9, n 2, p.139-143, 2010.

FUNK VA, SUSANNA A, STUESSY TF, ROBINSON H. CLASSIFICATION OF COMPOSITAE. IN: FUNK VA, SUSANNA A, STUESSY TF E BAYER RJ, eds. Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: **International Association for Plant Taxonomy** (IAPT), p.171-189, 2009.

FUNK, V. A.; BAYER, S.; KEELEY, R. CHAN, L.; WATSON, B; GEMEINHOLZER, E.; SCHILLING, J. L.; PANERO, B. G.; BALDWIN AND N. GARCIA-JACAS. Everywhere but Antarctica: Using a super tree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, v. 55, p. 343-374, 2005.

GALLETTO, RICARDO. História da Farmácia: do surgimento da espécie humana ao fim da Antiguidade Clássica. **Revista Uningá**, S.i, v. 10, n. 1, out. 2017.

GASTALDI, B.; CATALÁN, C. A.; SILVA-SOFRÁS, F. M.; GONZÁLEZ, S. B. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), a medicinal plant from South America. A comprehensive review: ethnomedicinal

uses, phytochemistry and bioactivity. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, v. 17, n.1, p.17-29, 2018.

GEISSMAN, T. A.; GRIFFIN, T. S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. *Phytochemistry*, v.10, n.10, p.2475-2485, 1971.

GOBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; LOPES, J.L.C.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Evaluation of the anti-Inflammatory and antioxidant Activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). *Planta Medica*, n. 71, p. 3-6, 2005.

GODZIEN, Joanna et al. Metabolite Annotation and Identification. *Comprehensive Analytical Chemistry*, [s.l.], p.415-445, 2018

GOUVEA, D.R.; MELONI, F.; RIBEIRO, A.B.B.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. A new HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart. (Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation. *Analytica Chimica Acta*, v. 748, p. 28-36, 2012.

GUILLET, G.; BELANGER, A.; ARNASON, J. Volatile monoterpenes in *Porophyllum gracile* and *p. Ruderale* "Asteraceae identification\ localization and insecticidal synergism with terthienyl. *Phytochemistry*, v. 38, n. 1, p.312-318, 1998.

JANG, J.H.; YANG, E.S.; MIN, K.J.; KWON, T.K. Inhibitory effect of butein on tumor necrosis factor α -induced expression of cell adhesion molecules in human lung epithelial cells via inhibition of reactive oxygen species generation, NF κ B activation and Akt phosphorylation. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 30, n. 6, p. 1357-1364, 2012.

JENSEN, W. A. 1962. *Botanical histochemistry (principles and practice)*. San Francisco: W. H. Freeman and Company.

JOHANSEN, D.A 1940. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw Hill Book.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2007. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3 Ed., 508-515.

KATINAS, L.; GUTIÉRREZ, D. G.; CRISCI, J. V. Panorama de la familia Asteraceae (=Compositae) em la Republica Argentina. **Boletim Sociedade Argentina de Botânica**, v. 42, n. 1-2, p. 113-129, 2007.

KATINAS, L.; GUTIÉRREZ, D. G.; CRISCI, J. V. **Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) em la Republica Argentina. Boletim Sociedade Argentina de Botânica**, v. 42, n. 1-2, p. 113-129, 2007.

KELES, L.c. et al. Antibacterial activity of 15-deoxygoyazensolide isolated from the stems of *Minasia alpestris* (Asteraceae) against oral pathogens. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.326-331, fev. 2010.

KHALLOUKI, F.; HAUBNER, R.; RICARTE, I.; ERBEN, G.; KLIKA, K.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Identification of polyphenolic compounds in the flesh of Argan (Morocco) fruits. **Food chemistry**, v. 179, p. 191-198, 2015.

KHAN, A. L.; HUSSAIN, J.; HAMAYUN M.; GILANI, S.A.; AHMAD S.; REHMAN, G.; YON, S.; LEE, K.A. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. **Molecules**, v. 15, p. 1562-1577, 2010.

KIM, K. J.; JANSEN, R. K. Two chloroplast DNA inversions originated simultaneously during the early evolution of the sunflower family (Asteraceae). **Molecular biology and evolution**, v. 22, n. 9, p1783-1792, 2005.

KOWALSKI, R.; SUGIER, D.; SUGIER. P.; KOLODZIJ, B. Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry. **Industrial Crops and Products**, n. 76, p. 857-865, 2015.

LANÇAS, F. M.. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?. **Scientia Chromatographica**, São Paulo, v. 2, n. 1, p.35-61, 2009.

LANG, K.; CORRÊA, J.; WOLFF, F.; DA SILVA, G.F.; MALHEIROS, A., FILHO, V.C., SILVA, R.M.L.; QUINTÃO, N.L.M.; SANDJO, L.P.; BONOMINI, T.J.; BRESOLIN, T.M.B. Biomonitoring UHPLC-ESI-QTOF-MS 2 and HPLC-UV thermostability study of the aerial parts of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, Asteraceae. **Talanta**, v. 167, p.302-309, 2017.

LAVAUULT, M.; RICHOMME, P. Constituents of *Helichrysum stoechas* variety olonnense. **Chemistry of natural compounds**, v. 40, n. 2, p. 118-121, 2004.

LEE, S. H.; KIM, J. Y.; SEO, G. S.; KIM, Y. C.; SOHN, D. H. Inhibitory constituents of the heartwood of *Dalbergia odorifera* on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 14, p. 4263-4266, 2013.

LIMA, Cintia Maria. **Pithecellobium cochliocarpum (Gomez) Macbr. Da teoria medicinal a investigação toxicológica e utilização terapêutica**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2007.

LIMA, T.C.; SOUZA, R.J.; MORAES, M.H.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M.W. New furanoheliangolide sesquiterpene lactone from *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (Asteraceae) and evaluation of its trypanocidal and leishmanicidal activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 28, p.367-375, 2017.

LIMA, T.C.; SOUZA, R.J.; SANTOS, A.D.C.; MORAES, M.H.; BIONDO N.E.; BARISON, A.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M.W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Natural Product Research**, v. 30, p. 551-557, 2015.

LIMA-NETO, D.A. **Estudo fitoquímico e efeitos analgésicos da *Porophyllum ruderale***. Tese (doutorado), 1996. Curso de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba. 1996.

LOPES, N.P. **A essência da arnica**. Pesq. FAPESP, São Paulo, n64, p 42-44, 2001.

LÜ, H. T. ; LIU, J.; DENG, R.; SONG, J.Y. Preparative isolation and purification of Indigo and Indirubim from *Folium isatidis* by High-speed Counter-current Chromatography. **Phytoch. Analysis**, Chichester, 2012.

LUSA, M. G. "**Morfoanatomia e fitoquímica de espécies da subtribo Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) como subsídios para as análises filogenéticas do grupo**". 2014. 303 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Vegetal, Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

LUSA, M.G.; COSTA, F.B; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Histolocalization of chemotaxonomic markers in Brazilian *Vernonieae* (Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 182, p. 581-593, 2016.

LUSA, M.G.; MARTUCCI, M.E.P.; LOEUILLE, B.F.P.; GOBBONETO, L.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; COSTA, F.B. Characterization and evolution of secondary metabolites in Brazilian *Vernonieae* (Asteraceae) assessed by LC-MS fingerprinting. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.182, n. 594-61, 2016.

MACIEL, R. L.; CAMPOS, L. M. M.; SILVA, B. C.; BRANDÃO, M. G. L., Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 99-104, 2006.

MALDONADO, E.; MARQUEZ, C. L.; ORTEGA, A. A thymol derivative from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2527-2528, 1992.

MARIN, R. **Solidago chilensis Meyer: desenvolvimento de métodos analíticos, extratos secos qualificados, avaliação farmacológica in vivo e produção de comprimidos**. 2014. 216 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MARIOSIA, R. M. **Tratamento e Doenças de Escravos da Fazenda Santo Antonio do Paiol 1850-1888**. 2006. 177 f. Dissertação (Mestrado)

- Programa de Mestrado em História, Universidade Severino Sombra, Vassouras, 2006.

MELO, L. Q.; CIAMPI, A. Y.; VIEIRA, R. F. Análise da variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) usando marcadores RAPDs. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p.259-266., 2009.

MELO, M. R. C. S.; PEREIRA, R. D. C. A. Revisão histórica da tribo Vernonieae Cass. (Familia Asteraceae) para o Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 11, p.172-192, 2016.

MERCADO, M. I.; ARÁOZ, M. V. C.; MANRIQUE, I.; GRAU, A.; CATALÁN, C. A. Variability in sesquiterpene lactones from the leaves of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) accessions of different geographic origin. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, n. 6, p. 1209-1217, 2014.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons. Oxford: Claredon Press, v.I, n. 2, 1988.

MILAN, P.; HAYASHI, A. H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.. Comparative Leaf Morphology and Anatomy of Three Asteraceae Species. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 49, n. 1, p.135-144, 2006.

MIYAZAKI, C. M. S., B. C. K. HIROTA, C. P. DELIMA, M. C. DOS SANTOS, C. D. PAULA, S. C. CHAVES, P. M. N. PAVAN, M. D. MIGUEL AND O. G. MIGUEL. Coumarin isolation and comparative study of biological activities of *Pterocaulon alopecuroides* DC and *Pterocaulon lorentzii* Malme. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 298-301, 2013.

MONKS, N. R.; et al. In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 7, p. 494-500, 2002.

NASCIMENTO, A.M.; COSTA, F.C.; THIEMANN, O.H.; OLIVEIRA, D.C.R. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Eitschrift für Naturforschung C**, n. 62, p.353-356, 2007.

OBÓN, C.; RIVERA, D.; VERDE, A.; FAJARDO, J.; VALDÉS, A.; ALCARAZ, F.; CARVALHO, A. M. Árnica: A multivariate analysis of the botany and ethnopharmacology of a medicinal plant complex in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p.44-56, 2012.

Oliveira, F. C.; Albuquerque, U. P.; Fonseca-Krueel, V. S.; Hanazaki, N. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta botânica brasileira**, v.23, n. 2, p. 590-605, 2009.

PADARTHI, P. K., NAMASIVAYAM, E. Synthesis and biological evaluation of chalcones from 2-acetyl-5-methylfuran. **IJPSR**, v. 4(7), 2629-2638, 2013.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 757-782, 2008.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 757-782, 2008.

PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. A Ecologia Química e a Biossíntese dos Terpenos Voláteis das “Arnicas-da-Serra” (*Lychnophora* spp.). **Rev. Virtual Quimica**. v. 8, p. 242-261, 2016.

PERRY, N. B., E. J.; BURGESS, M. A. R.; GUITIÁN, R. R.; FRANCO, E. L. MOSQUERA, B. M.; SMALLFIELD, N. I.; JOYCE AND R. P. LITTLEJOHN. Sesquiterpene Lactones in *Arnica montana*: Helenalin and Dihydrohelenalin Chemotypes in Spain. **Planta Medica**, v. 75, n. 06, p.660-666, 23 fev. 2009.

POLLO, L. A., BOSI, C. F., LEITE, A. S. ., RIGOTTO, C. ., KRATZ, J. , SIMÕES, C. M., FONSECA, D. E., COIMBRA, D., CARAMORI, G. AND A. NEPEL. Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375-383, 2013.

POLYANSKAYA, E. V.; KOROLYUK, E. A.; TKACHEV, A. V. Composition of essential oil from *Artemisia glauca* from western Siberia. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 5, p. 544-547, 2007.

PRUDÊNCIO, R. 2012, 45f. **Levantamento etnofarmacológico de *Solidago chilensis* Meyen. “arnica-brasileira” (Asteraceae).** Especialista em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 2012.

PRUSKI, J. F.; SANCHO, G. **Asteraceae or Compositae.** In: Smith, N., Mori, S.A., Hendersib, A. Stevenson D.W. & H, 2004.

RAMOS, R. R. P. A família Asteraceae Bercht. e J. Presl em afloramentos rochosos da caatinga paraibana? Morfologia, riqueza e distribuição. Trabalho de conclusão de curso Taxonomia de Fenerógramas. Ciências Biológicas. Universidade estadual da Paraíba. 2011. 80f.

RAGGI, L. **Teor, composição química e atividade biológica de óleos voláteis de *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski e *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (Asteraceae).** 2013. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Plantas Vasculares em Análises Ambientais, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente,, São Paulo, 2013.

RODRÍGUEZ-CHÁVEZ, J. L.; EGAS, V.; LINARES, E.; BYE, R.; HERNÁNDEZ, T.; ESPINOSA-GARCÍA, F.J.; DELGADO, G. Mexican *Arnica* (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p.39-63, jan. 2017.

ROMANO, E.; RASCHI, A. B.; BENAVENTE, A. M.; GONZALEZ, A. M.; PIRO, O. E. Characterization and crystal structure of 2R-(-)-6 hydroxytremetone from *Xenophyllum poposum* (Phil.) V.A. Funk. **Natural Product Research**, v. 22, n. 2, p. 124-135, 2008.

SABIR, S. MM, AHMED, S. H.; HAMID, A.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compound. **Food Chemistry**. Santa Maria, v. 3, n. 131, p.741-747, abril 2012

SAKAI, W.S., 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technol* 43: 247-249.

SAKAMOTO, H.T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E.E.; STARK, C.B.W.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, n. 66, p. 963-995, 2003.

SANDINI, T. M.; UDO, M. S. B.; SPINOSA, H. S. Senecio brasiliensis e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p.1-13, 2013.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v.7, n. 3, 29-35, 2017.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v 81, p.111-115, 2002.

SEMIR, J; REZENDE, A. R.; MONGE, M; LOPES, N. P. **As arnicas endêmicas das serras do Brasil: Uma revisão sobre a biologia e a química das espécies de Lychnophora (Asteraceae)**. Ouro Preto (mg): Ufop, 2011. 2012 p.

SERAGLIO, S.K.T. **Desenvolvimento e validação analítica para determinação de compostos fenólicos utilizando lc-esi-ms/ms, bioacessibilidade in vitro de compostos fenólicos e capacidade antioxidante de mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)**. **Dissertação (Mestrado)**. 2016. 139f. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

SILVA, M. P., BARBOSA, F. S. Q., BARROS, R. F. M. Estudo taxonômico e etnobotânico sobre a família Asteraceae. **Gaia Scientia**, volume especial Populações Tradicionais, p. 110-123, 2014.

SILVA, P.S.S.; LINHARES, J.F.P.; MARQUES, M.O.M.; Caracterização morfológica, perfil químico, atividade biológica e

conservação *in situ* do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae), Brasil. **Biotemas**, v. 26, p. 201-203, 2013.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B.; et al. Anti-inflammatory and antihyperalgesic evaluation of the condiment laurel (*Litsea guatemalensis* Mez.) and its chemical composition. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1980-1986, 2012.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P. A Pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: A necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, p.35- 40, 2002.

SIMON J.G.; BOLGAR, M.S.; RIBA, I.; SUMMERFIELD, S.P.; (AUTH.), CAPRIOLI, R.M.; MALORNI, A.; SINDONA, S (EDS.). Selected Topics in Mass Spectrometry. **Biomolecular Sciences**, n. 1, p. 275, 2011.

SIMPLICIO, J. A., SIMÃO, M. R., AMBROSIO, S. R., & TIRAPELLI, C. R. The Labdane Ent-3-Acetoxy-Labda-8(17), 13-Dien-15-Oic Decreases Blood Pressure In Hypertensive Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p.0-00, 2016.

SKOOG, D, A. HOLLER, F.J. CROUCH, S, R. **Princípios de análise instrumental**. 6ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SMITH, F. H.; SMITH, E. C. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. **American Journal of Botany**, v. 29, p. 464471, 1942.

SMOLAREK, F. S. F.; CANSIAN, P. M. P.; MERCALI, F. C.; CARVALHO, J. L. S.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G. ABORDAGEM FITOQUÍMICA E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Solidago microglossa* D.C. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.77-82, 30 jun. 2009.

SOFOWORA, A. Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1982.

SOKENG, A. J. T.; SOBOLEV, A. P.; DI LORENZO, A.; XIAO, J.; MANNINA, L.; CAPITANI, D. E.; DAGLIA, M. Metabolite characterization of powdered fruits and leaves from *Adansonia digitata*

L.(baobab): A multi-methodological approach. **Food chemistry**, v. 272, p. 93-108, 2019.

SOUZA, V.C. e LORENZI, H. "**Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III.**" p. 476, 2005.

SOUZA, D.M.f.; DE SOUZA, R. D.; SÁ, E. L.; ARAÚJO; KARINA, P; RANDAU. Anatomical, phytochemical and histochemical study of *Solidago chilensis* Meyen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p.1-14, 2017.

Spring, O., Zipper, R., Reeb, S., Vogler, B. e Da Costa, F. B. 2001. Sesquiterpene lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). **Phytochemistry** 57: 267-272

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; MIZERSKA-DUDKA, M.; DANILUK, J.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF κ B, p38, and JNK 287 signaling pathways and inhibition of oxidative stress. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 2, p. 222-237, 2013.

TAKAHASHI, H.T.; NOVELLO, C.R.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; PALAZZO DE MELLO, J.C.; NAKAMURA, C.V. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. **Molecules** n.16, p. 3469-3478, 2011.

TAMURA, E. K., R. S.; JIMENEZ, K.; WAISMAM, L.; GOBBO-NETO, N. P. LOPES, E. A.; MALPEZZI-MARINHO, E. A.; Marinho and S. H. Farsky. "Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation." **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 478-485, 2009.

TEWTRAKUL, S.; et al. Anti-inflammatory constituents from *Eclipta prostrata* using RAW264.7 macrophage cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 9, p. 1313-1316, 2011.

TIDJANI, S.; OKUSA, P. N.; ZELLAGUI, A.; BANULS, L. M.; STEVIGNY, C.; DUEZ, P.; RHOUATI, S. Analysis of pyrrolizidine alkaloids and evaluation of some biological activities of Algerian *Senecio delphinifolius* (Asteraceae). **Natural Product Communications**, v. 8, n. 4, p. 439-440, 2013.

TORRES, V. R. N. **Avaliação fitoquímica, citotóxica e farmacológica de *Calea uniflora* less.** 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós - Graduação em Ciências Ambientais, Ciências Ambientais, Universidade do Extremo Sul Catarinense - Unesc Unidade Acadêmica Humanas C IÊ Ncias Edu, Criciuma, 2014.

VALVERDE, S. S.; OLIVEIRA, T. B.; SOUZA, S. P. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Fitos**, Si, v. 7, n. 3, p.131-136, 2012.

VECHIA, C.A.D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A.P.; DIEL, K.A.P.; FAUST, C., MENIN, C.; GOMES, D.B.; ROMAN JUNIOR, W.A. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, v. 18, 288-296, 2016.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M.; PIZZOLLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química nova*, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERMA, R.S.; PADALIA, R.C.; CHAUHAN, A., SUNDARESAN, V. Essential oil composition of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski from India. **Journal of Essential Oil Research**, v, 26, p. 29-33, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Regional office for the Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila: WHO, 1993. 86 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Medicina tradicional: necesidades crecientes y potencial. Policy perspectives on medicines**, Genebra, n. 2, p. 1-6, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **“Traditional medicine”**. WHO, 2008

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 12p.

WILDNER, L.M. **Atividade antimicrobacteriana *in vitro* de lactonas sesquiterpênicas e investigação do seu mecanismo de ação**. Tese (Doutorado) 2016. Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

YULIANA, N. D.; et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research*, v. 25, p. 157-169, 2011.

YUI, F.; LINARELLI, M. C. B.; ZALANTE, P. M. Atividade anti-inflamatória de *arnica montana*. **Revista de Ciências Médicas**, v. 7, n.1, 2012.

ZHOU, B.; XIAO, J. F.; TULI, L.; RESSOM HW. LC-MS-based metabolomics. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 2, p.470-481, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).