



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



**Isolamento de produtos naturais de extratos bioativos da
espécie vegetal *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*
(Anemiaceae)**

Amanda Cristina Vasconcelos Oliveira

MACAÉ – RJ
NOVEMBRO 2016



**Isolamento de produtos naturais de extratos bioativos da
espécie vegetal *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*
(Anemiaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Farmácia da Universidade Federal
do Rio de Janeiro – Campus
Macaé como requisito para
obtenção do título de
farmacêutico.

Orientador: Shaft Corrêa Pinto

Co-orientador: Willian Jones
Andrioli

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus, por ser à base de todas minhas conquistas.

Agradeço a minha mãe Marisa Vasconcelos e meus familiares que acreditaram na minha escolha e me incentivaram todos estes anos que estive na Universidade.

Ao professor Dr. Shaft C. Pinto por sua orientação, incentivo, colaboração e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dra. Michelle Muzitano e Dr. Vitor Todeschini, por aceitarem fazer parte da banca examinadora e dedicação do seu tempo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de iniciação científica e pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desta etapa conclusiva em minha vida.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Bandas de absorção de UV em Flavonoides	19
Tabela 2	Gradiente de Eluição para Frações acetato de etila	32
Tabela 3	Gradiente de Eluição para Frações butanólicas	32
Tabela 4	Gradiente de Eluição CLAE Preparativa	33
Tabela 5	Peso e Rendimento dos Extratos Derivados da Extração Líquido-líquido	34
Tabela 6	Peso das frações butanólica	36
Tabela 7	Peso das frações de Acetato de Etila	45
Tabela 8	Comparação dos dados espectroscópicos de RMN ^1H obtidos com os dados da literatura	49

Lista de Abreviações e Siglas

AcN	Acetonitrila
ATAcF1-4	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 1 a 4
ATAcF5	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 5
ATAcF6	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 6
ATAcF7	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 7
ATAcF8	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 8
ATAcF9	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 9
ATAcF10	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 10
ATAcF11	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 11
ATAcF12	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 12
ATAcF13	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 13
ATAcF14-15	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 14 e 15
ATAcF16-17	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 16 e 17
ATAcF18-20	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 18 a 20
ATAcF21	<i>A. tomentosa</i> Acetato de etila fração 21
ATBF1-4	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 1 a 4
ATBF5-7	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 5 a 7
ATBF8	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 8
ATBF9-10	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 9 e 10
ATBF11	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 11
ATBF12-25	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 12 a 25
ATBF8F'9-12	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 8 subfração 9 a 12
ATBF9-10F'4,5	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 9 e 10 subfração 4 e 5
ATBF9-10F'4,5II	<i>A. tomentosa</i> Butanol fração 9 e 10 subfração 4 e 5 II
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
g	Gramas
H ₂ O	Água
Hz	Hertz

<i>J</i>	Acoplamento Escalar
KCl	Cloreto de Potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NP/PEG	Borinato de 2-aminoetil-difenila/Polietilenoglicol 4000
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear
Ppm	Parte por milhão
v/v	Volume por volume
δ	Deslocamento químico
μ	Micrograma

Lista de Figuras

Figura 1	Mapa de distribuição das espécies do gênero <i>Anemia</i>	16
Figura 2	<i>A. tomentosa</i> var. <i>anthriscifolia</i>	17
Figura 3	Exemplos de estruturas de flavonoides na forma livre e na forma de heterosídeos	18
Figura 4	Estrutura básica de flavonoides com demonstração dos anéis responsáveis pelas bandas de absorção de UV	19
Figura 5	Partes aéreas da <i>A. tomentosa</i>	25
Figura 6	Percolador	26
Figura 7	Evaporador rotatório	26
Figura 8	Extração Líquido-líquido	27
Figura 9	Aplicação da amostra, elucidação da amostra pela coluna e frações coletadas	29
Figura 10	Aparelho de CLAE	31
Figura 11	Cromatoplaça do extrato butanólico observada nos comprimentos de onda de 254nm, 365nm e com NP-PEG no comprimento de 365nm, respectivamente.	35
Figura 12	Perfil Cromatográfico e espectro UV do Extrato de butanólico da <i>A. tomentosa</i>	37
Figura 13	Perfil cromatográfico e espectro UV da fração ATBF11	38
Figura 14	Perfil Cromatográfico da fração ATBF8, ATBF9-10 e ATBF12-25	39
Figura 15	Perfil Cromatográfico e espectro UV da fração ATBF8F'9-12	40
Figura 16	Perfil Cromatográfico e espectro UV da fração ATBF9-10F'4,5	41
Figura 17	Perfil Cromatográfico da subfração ATBF9-10F'4,5II	42
Figura 18	Fluxo da coleta á obtenção de extratos e frações butanólicos.	43
Figura 19	Cromatoplaça do extrato acetato de etila observada nos comprimentos de onda de 254nm, 365nm e com NP-PEG no comprimento de 365nm, respectivamente.	44
Figura 20	Perfil cromatográfico e espectros UV do extrato de Acetato de etila	46
Figura 21	Perfil cromatográfico e espectro UV da fração ATAcF5	47

Figura 22	Perfil cromatográfico e espectro UV da fração ATAcF10	48
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H da fração ATAcF10 em MeOD	50
Figura 24	Expansão do espectro de RMN ¹ H, enfatizando a região de 3 a 4ppm	50
Figura 25	Expansão do espectro de RMN ¹ H, enfatizando a região de 5 a 8ppm	51
Figura 26	Flavonol glicosilado isolado da <i>A. tomentosa</i> , Isoquercetrina	51
Figura 27	Fluxo da coleta à identificação da substância do extrato acetato de etila	53

Resumo

O uso de plantas para fins medicinais trata-se de uma cultura milenar, passadas de geração em geração. A espécie vegetal *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia* é uma pteridófito terrestre encontrada principalmente em habitats abertos e locais bem drenados, utilizada como antigripal, digestiva, expectorante e anti-hipertensiva. Além disso, em estudo recente, o óleo essencial extraído dessa espécie apresentou atividade antimicrobiana. Em triagem realizada para atividade vasodilatadora da espécie *A. tomentosa*, o extrato etanólico obtido das suas folhas apresentou ação de relaxamento nas aortas dos ratos de $75,96\% \pm 2,99\%$ na concentração de $30 \mu\text{g/mL}$. Tendo em vista este resultado e o fato da hipertensão arterial sistêmica acometer grande parcela da população brasileira e mundial, o presente trabalho justifica-se frente a necessidade de obtenção de novos candidatos a fármacos anti-hipertensivos, objetivando o isolamento de produtos naturais bioativos das folhas da *A. tomentosa*. O extrato etanólico obtido por percolação foi fracionado por extração líquido-líquido com solventes orgânicos seguindo uma ordem crescente de polaridade. Das frações obtidas, todas foram testadas para atividade vasodilatadora, mas somente as frações butanólica e acetato de etila apresentaram atividade semelhante ao extrato bruto na concentração de $30 \mu\text{g/mL}$, com um relaxamento máximo de $77,08\% \pm 5,44\%$, e $64,5\% \pm 3,77\%$, respectivamente. Estas frações foram submetidas a cromatografia em coluna para fracionamento, e as frações obtidas analisadas por Cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo Diodo (CLAE-DAD). De acordo com os índices de retenção e espectros de UV obtidos na análise do perfil cromatográfico obtido por CCD e CLAE-DAD verificou-se a possível presença de flavonoides glicosilados. As seguintes frações apresentaram substâncias isoladas, após análise de CLAE-DAD, com máximos de absorção de UV variando dentro da faixa esperada para flavonoides de 240-400nm: ATAcCF5 (255-355nm), ATAcCF10 (255-355nm), ATBCF11 (276-386nm), ATBF8C₁₈9-12 (271-336nm) e ATBF9-10C₁₈4-5 (254-358nm). Após análise destas frações por RMN ¹H a substância presente na fração ATAcCF10, foi caracterizada como sendo o flavonol glicosilado, a quercetina 3-O-glicosídeo.

Palavras-chave: Anemiaceae, *Anemia tomentosa*, Flavonoides, Isolamento e Vasodilatação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Plantas Medicinais	12
1.2 Pteridófitas	14
1.3 Família ANEMIACEAE	15
1.4 Gênero Anemia	15
1.5 Espécie <i>Anemia tomentosa</i>	17
1.6 Flavonoides	18
1.7 Hipertensão	20
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	
3.1 Gerais	24
3.2 Específicos	24
4 METODOLOGIA	
4.1 Coleta da espécie vegetal	25
4.2 Preparação do extrato etanólico	25
4.2.1 Percolação	25
4.2.2 Evaporação do solvente	26
4.3 Fracionamento do extrato etanólico	26
4.4 Atividade vasodilatadora	27
4.5 Perfil cromatográfico dos extratos	28
4.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	28
4.5.2 Cromatografia em coluna	29
4.5.2.1 Sephadex	29
4.5.2.2 Sílica C18	30
4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	30
4.6.1 Preparo das amostras	30
4.6.2 Condições para a CLAE	31
4.6.2.1 Analítico	31
4.6.2.2 CLAE Preparativa	32
4.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	

5.1 Extratos orgânicos	34
5.1.1 Obtenção e rendimentos dos extratos	34
5.1.2 Avaliação da atividade vasodilatadora dos extratos	34
5.2 Extrato Butanol	35
5.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	35
5.2.2 Isolamento de Constituintes Fenólicos do Extrato butanólico	36
5.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	36
5.3 Extrato Acetato de Etila	44
5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	44
5.3.2 Isolamento de Constituintes Fenólicos do Extrato Acetato de etila	44
5.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	45
5.3.4 Caracterização da Substância presente na fração ATAcF10	48
6 CONCLUSÃO	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 Introdução

1.1 Plantas Medicinais

A definição de planta medicinal, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (1978), é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. É inegável o uso milenar de plantas medicinais pela humanidade. Há indícios de que as civilizações mais antigas já faziam uso das mesmas para cura, tratamento e prevenção de doenças. Seu tradicional uso representa a influência cultural de um povo, sendo baseada apenas no conhecimento popular. Vale ressaltar que, alguns medicamentos utilizados na medicina tradicional, como os salicilatos e os digitálicos, foram descobertos através do uso popular (FIRMO *et al.*, 2011).

O primeiro registro do uso de plantas para fins medicinais data do período de 2838-2698 a.C, no qual o imperador chinês Shen Nung cataloga 365 ervas medicinais e venenos (FRANÇA *et al.*, 2008). No Brasil, a prática de se usar plantas já é feita pelos índios há vários séculos, uma vez que os mesmos faziam utilização de plantas para o tratamento do corpo e da alma. Quando os portugueses chegaram ao Brasil, os índios já apresentavam um etnoconhecimento sobre as espécies nativas. Eles por exemplo não só usavam o urucum para pintar e proteger o corpo das picadas de insetos, como também usavam para tingir seus objetos cerâmicos (MATA *et al.*, 2009).

Atualmente, percebe-se um aumento no uso indiscriminado de plantas, devido a população pensar erroneamente que por ser natural o mesmo não acarretará em prejuízos a sua saúde. A falta de conhecimento sobre as propriedades farmacológicas e toxicológicas assim como as possíveis adulterações e interação com outras drogas, acabam acarretando em um risco para a população (JUNIOR *et al.*, 2005; FIRMO *et al.* 2011).

As plantas possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os primários são compostos essenciais a plantas, que auxiliam na fotossíntese e na respiração. Já os metabólitos secundários estão relacionados a interação da planta com o ambiente, protegendo-as de ataques de patógenos, herbivoria, exposição a

luz, radiação UV, mudanças de temperatura, entre outras. Fazem parte deste grupo os terpenos, os alcaloides e as substâncias fenólicas (PERES, 2016). O metabolismo secundário das plantas varia de acordo com vários fatores, tornando a concentração deles inconstante, entre eles pode-se destacar: a sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, temperatura, altitude e nutrientes. Diante disso fica evidente o estudo para detecção das condições e época de cultivo e coleta visando obter as concentrações desejáveis dos princípios ativos da espécie vegetal (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

As substâncias presentes nas plantas medicinais podem apresentar potencial tóxico. Os efeitos mais comumente causados por tais substâncias são: hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, citotoxicidade e dermatites (JUNIOR *et al.*, 2005). Os produtos naturais presentes nas plantas podem interagir com outros fármacos acarretando em uma anulação do efeito terapêutico, ou no não tratamento da doença ou na aparição de uma série de reações adversas que podem culminar na hospitalização do usuário. Efeitos de algumas dessas interações são citados por Junior (2005), como por exemplo o efeito potencializado da warfarina quando usada concomitantemente com o ácido acetilsalicílico, derivado semissintético da salicilina isolada de *Salix alba*, que pode aumentar o risco de hemorragias e levar a óbito.

Em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou a produção e comercialização de algumas espécies vegetais que já eram utilizadas de acordo com a cultura popular, estabelecendo informações sobre modo de uso, para que serve e os efeitos adversos, levando em conta o que já foi cientificamente comprovado. Entre elas pode-se destacar a camomila (*Matricaria recutita*) muito utilizada para ansiedade e insônia, o guaco (*Mikania glomerata*) para problemas respiratórios, o boldo (*Peumus boldus*) para problemas digestivos, o quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) para cálculos renais e infecção urinária, a cavalinha (*Equisetum arvense*) e o chapéu de couro (*Echinodorus macrophyllus*) usados como diuréticos para tratamento de hipertensão (ANVISA, 2010).

1.2 Pteridófitas

As pteridófitas são plantas vasculares que não possuem sementes e tem sua estrutura dividida em sistemas de tecidos: sistema dérmico, sistema vascular e sistema parenquimatoso. O sistema dérmico tem a função de proteção, enquanto que o sistema vascular tem a função de levar água e nutrientes para a folha. Elas foram as primeiras plantas a apresentarem esse sistema de vaso condução, o que favoreceu sua adaptação em todos os ambientes terrestres e o surgimento de plantas de porte elevado (SIMÕES *et al.*, 2002; LOUSÃ *et al.*, 2007). Podem apresentar poucos milímetros de comprimento quanto chegar até 20 metros de altura. Isto vai depender da interferência de fatores externos como o clima, a umidade, o solo e a pluviosidade (PINTO, 2011).

As pteridófitas surgiram há mais de 400 milhões de anos e podem ser encontradas nos mais diversificados ecossistemas, tanto em baixas quanto altas altitudes, em climas frios e subdesérticos, em regiões rochosas ou mangues. Mas com destaque para regiões de floresta tropicais úmidas (MELO & SALINO, 2002). São plantas adaptáveis podendo ser rupícolas, terrestres, epífitas ou aquáticas (GOETZ & XAVIER, 2015).

As 12.000 espécies de pteridófitas estão compreendidas em dois filos vivos: *Lycophyta* e *Pteridophyta*. O filo *Lycophyta* é o filo mais antigo das plantas vasculares, com 10 a 15 gêneros e cerca de 1.200 espécies, sua principal característica que o difere do outro filo é que possuem micrófilo, folhas com uma única nervura. O filo *Pteridophyta* é o segundo maior grupo de plantas, representa cerca 11.000 espécies, e é macrofilo (LOUSÃ *et al.*, 2007).

As samambaias e as licófitas são as principais representantes das pteridófitas, possuindo um ciclo reprodutivo com alternância de gerações, ou seja, uma fase gametofítica e a outra esporofítica, sendo esta a fase dominante. Além disso, todas as pteridófitas vão apresentar também reprodução assexuada, feita por brotamento (SIMÕES *et al.*, 2002; GOETZ & XAVIER, 2015). As samambaias estão inseridas em 11 ordens, dentre elas está a ordem Schizaeales (GOETZ & XAVIER, 2015).

1.3 Família Anemiaceae

A Ordem da Schizaeales é constituída de três famílias que são diferenciadas principalmente pela sua morfologia, sendo elas: Lygodiaceae, Anemiaceae e Schizaeaceae (CASARINO *et al.*, 2009).

A família Lygodiaceae possui o hábito escandente e raque volúvel, enquanto as famílias Anemiaceae e Schizaeaceae possuem hábitos herbáceos e raque erétil. A família Schizaeaceae possui esporângios localizados na margem da lâmina e com esporos monoletes, enquanto a Anemiaceae possui esporângios em pinas basais modificadas, com esporos triletes (CASARINO *et al.*, 2009).

Segundo Mickel (1982), as espécies da família Anemiaceae são caracterizadas pelos caules eretos ou curto-rasteiros, com tricomas castanho-alaranjados. As folhas geralmente são eretas e dimórficas, com os esporângios localizados em duas pinas ou segmentos basais modificados e com esporos tetraédrico-globosos, triletes.

Os membros da família Anemiaceae são conhecidos por serem encontrados em ambiente com clima tropical ou temperado (CASARINO *et al.*, 2009). Plantas dessa família são terrestres ou rupícolas, representada por apenas um gênero, *Anemia*, sendo assim classificada como monotípica (FERREIRA *et al.*, 2009). São encontradas em áreas de caatinga, cerrado, matas e entre rochas localizadas as margens de rios (FERREIRA *et al.*, 2009). Essa variação de adaptação desse grupo de plantas deve-se as suas características morfológicas, anatômicas e fisiológicas (SOUZA *et al.*, 2007). Com um registro de mais de 100 espécies no mundo, são amplamente distribuídas pelo continente americano. Sendo o Brasil o país de maior ocorrência de espécies dessa família, detendo aproximadamente 51 espécies, com destaque para a região sudeste com uma representatividade de 40 espécies, seguida da região centro-oeste com 30 espécies e do nordeste com 20 (GOETZ & XAVIER, 2015).

1.4 Gênero *Anemia*

As plantas pertencentes ao gênero *Anemia* são frequentemente encontradas em áreas abertas, perto de córregos, em encostas ou entre rochas. São encontradas

geralmente associadas a outras pteridófitas ou angiospermas (SAKAGAMI & EVANGELISTA, 2003).

O gênero *Anemia* possui cerca de 120 espécies distribuídas pelo continente Americano, dez na África e apenas uma na Ásia (Figura 1) (MICKEL, 1982).

O Brasil é o país com maior diversidade de espécies desses gêneros, com aproximadamente 70 espécies (MICKEL, 1982), com destaque para o planalto de Goiás e Minas Gerais e para as montanhas e florestas úmidas localizadas do Espírito Santo a Santa Catarina (FERREIRA *apud* MICKEL, 2009). Sendo o sul e o sudeste os possíveis locais pioneiros do desenvolvimento dessas espécies. Já o México é o segundo na abrangência desse gênero, com cerca de 20 espécies (MICKEL, 1982).

Em 2010, o Jardim Botânico liberou a lista de espécies da flora brasileira, a qual constatou a presença desse gênero por todo o território nacional, com um total de 69 espécies, sendo 40 endêmicas (DUARTE *et al.*, 2012).

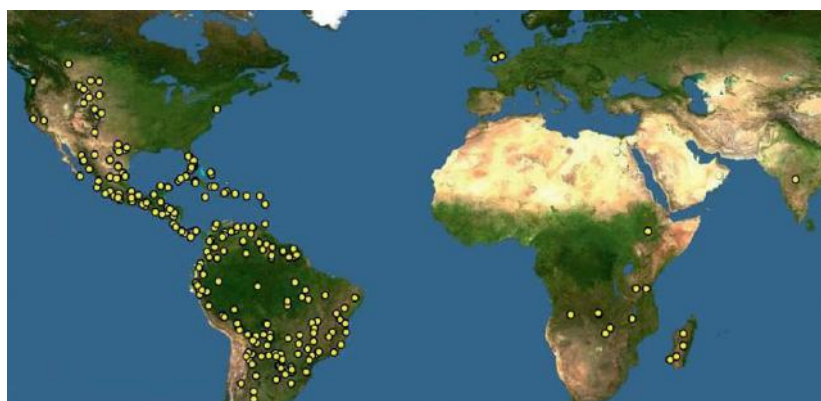


Figura 1: Mapa de distribuição das espécies do gênero *Anemia*. Fonte: Duarte *et al.*, 2012.

As plantas desse gênero possuem folhas parcialmente dimorfas, na qual a folha fértil se diferenciara da folha estéril devido a presença de esporângios em suas pinas e seu longo pecíolo (GOETZ & XAVIER, 2015). Além disso, costumam ser bastante aromática, devido à produção do óleo essencial, substância volátil e lipofílica, por pêlos glandulares existentes na folha (SANTOS *et al.*, 2006).

No Brasil, entre as espécies pertencentes a esse gênero têm-se a *A. collina*, *A. gardneri*, *A. hirsuta*, *A. mandioccana*, *A. oblongifolia*, *A. phyllitidis*, *A. raddiana*, *A. radicans*, *A. rotundifolia*, *A. tomentosa* e *A. villosa*, que vão se diferir

anatomicamente uma da outra (SAKAGAMI & EVANGELISTA, 2003; JASCONE & SANTOS, 2005).

1.5 Espécie *Anemia tomentosa*

No Brasil são encontradas duas das quatro variedades reconhecidas para essa espécie: a variedade *A. tomentosa* (Sav.) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel e a *A. tomentosa* (Sav.) Sw. var. *tomentosa*. Sendo a *A. tomentosa* (Sav.) Sw. var. *anthriscifolia* a principal variedade, distribuindo-se não só no Brasil, mas também pelo México, Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai (JULIANI *et al.*, 2003; JASCONE & SANTOS, 2005).

A espécie *A. tomentosa* (Figura 2) é uma pteridófita que se desenvolve preferencialmente em lugares úmidos sombreados, geralmente entre rochas. Seu caule é curto, com tricomas castanho-alaranjados. Suas folhas são eretas, cespitosas e com nervuras livres e furcadas. Os esporângios são delgados e dispostos em duas pinas basais modificadas (CASARINO *et al.*, 2009).

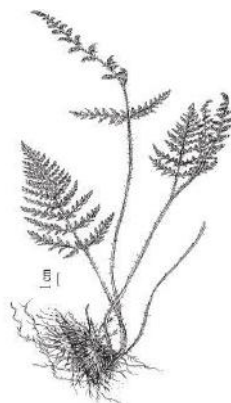


Figura 2: *A. tomentosa* var. *anthriscifolia*. Fonte: Casarino et al., 2009

As folhas desta espécie apresentam aroma pronunciado, confirmando a presença de óleos essenciais na mesma (SANTOS *et al.*, 2006). Em estudos recentes sobre componentes dos óleos essenciais da *A. tomentosa* foram comprovados a presença de monoterpenos e sesquiterpenos (PINTO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2006).

Segundo Pinto *et al.* (2007), foram verificados sesquiterpenos do tipo silfiperfoleno, pré-silfiperfolanol, pré-silfiperfoleno, isocomeno, cariofileno, pré-nopsano e nopsano. Sendo o 9-epi-pré-silfiperfolan-1-ol o componente majoritário.

Enquanto que no estudo de Santos *et al.* (2006) o constituinte majoritário era o isoafricanol e no de Juliane *et al.* (2004) o majoritário era o α -bisabolol.

As atividades biológicas de uma planta estão relacionadas às substâncias e classes químicas que compõe a mesma. Em estudo feito por Martinez *et al.* (2005) acerca da comercialização de plantas medicinais, o mesmo comentou o uso da *A. tomentosa* como antigripal, digestiva e expectorante. Além disso, estudos *in vitro* sugerem que o óleo essencial dela tem tanto potencial antimicrobiano contra o *Bacillus cereus* (DEMO *et al.*, 2005) quanto antimicobacteriano contra *Mycobacterium tuberculosis* (PINTO *et al.*, 2009).

1.6 Flavonoides

Flavonoide deriva do latim *flavus*, que significa amarelo. É uma classe amplamente distribuída no reino vegetal e constitui um dos grupos fenólicos mais importantes. No entanto, sua variabilidade estrutural é muito escassa em pteridófitas (SIMÕES *et al.*, 2002).

A maioria dos flavonoides possui um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono com dois anéis benzênicos ligados por um anel pirano heterocíclico. Podem ser encontrados na forma livre, sem o açúcar, ou na forma de heterosídeos, formado por uma parte glicona (açúcar) e outra aglicona (SIMÕES *et al.*, 2002) (Figura 3).

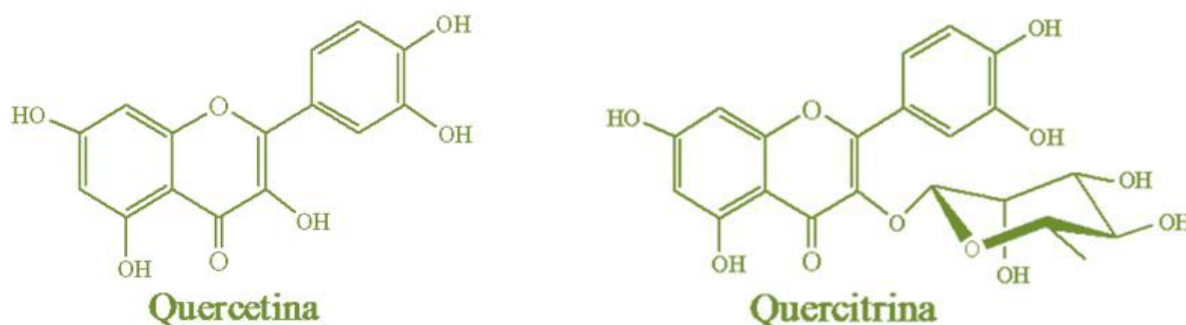


Figura 3: Exemplos de estruturas de flavonoides na forma livre e na forma de heterosídeos.

São conhecidas mais de 4.200 estruturas de flavonoides e estas são agrupadas de acordo com suas características e estruturas químicas em: flavonas, flavonóis, isoflavonoides, antocianinas, chalconas, auronas, dihidroflavonoides, neoflavonoides e bisflavonoides (SIMÕES *et al.*, 2002). Estes grupos de flavonoides são

identificados por métodos espectroscópicos, geralmente o UV. O espectro de UV visível das plantas se difere devido a presença de cromóforos, responsável pela diferença de coloração. Flavonoides vão ter dois máximos de absorção, um de 240-280nm (banda II) e outro de 300-400nm (banda I), no qual o responsável pela absorção da banda II é anel A e o da absorção da banda I é o anel B da estrutura básica do flavonoide (BHAT *et al.*, 2006) (Figura 4).

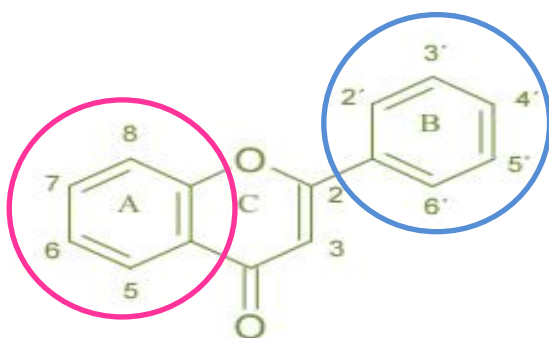


Figura 4: Estrutura básica de flavonoides com demonstração dos anéis responsáveis pelas bandas de absorção de UV.

De acordo com a tabela 1 podemos observar os máximos de absorção de cada componente do grupo dos flavonoides.

Tabela 1: Bandas de absorção de UV em Flavonoides

	Banda I	Banda II
Flavona	304	240-285
Flavonol	352	240-285
Flavanona	300	270-295
Dihidroflavonol	300-320	270-295
Chalcona	340-390	220-270
Aurona	370-430	-
Antocianidina	465-550	270-280

Em samambaias, os grupos de flavonoides mais comumente encontrados são flavonois, flavonas e flavanonas. Podendo outros grupos também serem encontrados, só que de forma mais esporádica (PINTO *apud* WALLACE, 2011).

A presença de flavonoides nas plantas possibilita a proteção da mesma contra os raios UV, proteção contra micro-organismos nocivos, ação antioxidante, atração de animais polinizadores, controle hormonal, ação alelopática e inibição de enzimas (SIMÕES *et al.*, 2002).

Além disso, flavonoides são conhecidos por sua gama de atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, anticancerosa, antioxidante, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, hipolipidêmica, anti-inflamatória e antiplaquetária (MACHADO *et al.*, 2008).

Estudos relatam que dietas ricas em flavonoides são benéficas para prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, uma vez que ela tem efeitos sobre a pressão arterial, vasodilatação e os níveis de lipídeos plasmáticos. Os flavonoides agem relaxando os músculos dos vasos, proporcionando uma melhora na circulação sanguínea. Além de agir reduzindo os níveis séricos e inibindo a oxidação de LDL evitando a progressão de aterosclerose (MINETTO, 2009).

1.7 Hipertensão

A hipertensão é uma doença silenciosa, não apresentando sintomas característicos no início. Os sintomas mais relacionados são: dor de cabeça, sangramento nasal, tontura, fraqueza etc. A hipertensão ocorre quando os músculos dos vasos sanguíneos se contraem e o fluxo de sangue exerce uma pressão sobre a parede desses vasos acima do valor considerado normal, geralmente acima de 140 por 90 mmHg. No entanto para uma pessoa ser diagnosticada como hipertensa deve-se aferir sua pressão repetidas vezes em diferentes períodos de tempo, levando em consideração a presença de fatores de risco, lesões nos órgãos-alvo e as comorbidades presentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SBC, 2008). Sendo considerada um fator de risco para todas as outras doenças cardiovasculares e estando relacionada a complicações como acidente vascular cerebral e insuficiência renal (SBC, 2008).

As pessoas que já tenham casos de hipertensão na família, que estejam acima do peso, consumam álcool, sejam tabagistas, sejam sedentárias, consumam grande quantidade de sal, alto nível de colesterol, entre outros, estão mais propensas a ter essa doença. Além disso, sabe-se que negros, idosos e diabéticos formam o maior grupo de risco desta doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Estudos feitos por Passos *et al.* (2006), demonstram uma necessidade de criação de programas de saúde voltados para a prevenção da hipertensão, uma vez que os

dados coletados apresentaram uma prevalência de 20% de casos de hipertensão na população, aumentando conforme idade e associação com fatores de risco.

A hipertensão não tem cura, mas pode ser controlada por tratamento tanto medicamentoso quanto não medicamentoso, que se feito adequadamente, prolonga e melhora a qualidade de vida do paciente.

Terapias não medicamentosas envolvem a mudança de estilo de vida do paciente, objetivando diminuir a necessidade do uso de medicamentos anti-hipertensivos. Essa terapia envolve mudança de hábitos alimentares, prática de atividades físicas, diminuição do consumo de sal e álcool, abandono do tabagismo e redução de peso (LOPEZ & MORAES, 2012).

O tratamento medicamentoso envolve o uso de medicamentos anti-hipertensivos, a fim de não apenas reduzir a pressão a níveis normais como também evitar o surgimento de complicações cardiovasculares. Os medicamentos utilizados estão inseridos em 5 classes: diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores, antagonistas do sistema renina-angiotensina e bloqueadores de canais de cálcio. Podendo ser usados em monoterapias ou terapias combinadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Com a disseminação cultural do uso de plantas medicinais, muitas plantas foram usadas nas formas de chá, infusão e maceração no tratamento e prevenção da hipertensão. A pesquisa feita por Lopes *et al.* (2010) reuniu 8 espécies de plantas utilizadas por hipertensos, a maioria idosos, que faziam uso dessas plantas como método alternativo ao tratamento hipertensivo. As plantas utilizadas popularmente eram: pitanga, berinjela, urucum, erva-cidreira, erva-doce, boldo, pata de vaca e camomila.

As folhas da pitanga, o suco da berinjela, fruto seco da erva-doce e as folhas da pata de vaca possuem ação diurética. Já as flores de camomila, sementes de urucum e folhas e raízes de erva-cidreira agem no sistema cardiovascular diminuindo a pressão arterial. Enquanto que o boldo, utilizado por muitos dos pacientes, possui como efeito secundário a elevação da pressão arterial, confirmando uma necessidade de estudos mais aprofundados a cerca do uso de plantas no tratamento de doenças a fim de garantir uma maior segurança ao paciente (LOPES *et al.*, 2010).

Em estudo feito por Teixeira & Amaral (2011) constatou-se que as atividades de algumas plantas sobre a pressão arterial era devido à presença de metabólitos secundários na mesma. Aquelas que apresentaram ação anti-hipertensiva em ensaios farmacológicos estavam relacionadas a um efeito vasodilatador devido à presença de flavonoides nas espécies estudadas. Ainda não se sabe o real mecanismo de ação dos flavonoides nesta doença cardiovascular, mas o mecanismo que pode explicar o efeito anti-hipertensivo observado na presença de flavonoides estaria relacionado a sua capacidade de promover a liberação do óxido nítrico pelo endotélio vascular, um componente que tem efeito vasodilatador e anti-plaquetário (MINETTO, 2009).

2 Justificativa

Em testes preliminares acerca da atividade vasodilatadora da espécie *A. tomentosa*, realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa sob orientação da Prof^a. Dra. Juliana Montani, o extrato etanólico obtido das folhas da espécie apresentou ação de relaxamento de $75,96\% \pm 2,99\%$ nas aortas dos ratos quando na concentração de $30 \mu\text{g/mL}$. Sabendo-se que ainda não há estudos descritos sobre os efeitos da espécie no sistema cardiovascular, fez-se primordial a elaboração de um estudo a fim de isolar e identificar substâncias presentes na planta que possam estar relacionadas a tal atividade.

3 Objetivos

3.1 Geral

Isolamento de produtos naturais dos extratos bioativos da espécie vegetal *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*.

3.2 Específicos

- ✓ Fazer a coleta da espécie *A. tomentosa* e preparar o seu extrato etanólico.
- ✓ Realizar o fracionamento por extração líquido-líquido e por Cromatografia em Coluna.
- ✓ Realizar ensaios biológicos para avaliação da atividade anti-hipertensiva para escolha dos extratos/frações ativos.
- ✓ Isolar e identificar os produtos naturais derivados das frações ativas.

4 Metodologia

4.1 Coleta da espécie vegetal

As partes aéreas da espécie vegetal, *Anemia tomentosa* (Anemiaceae), foram coletadas pelo Prof. Dr. Shaft Corrêa Pinto e identificadas Prof.^a Dr.^a Claudine Mynssen (Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro) no município de Vila Velha, no Estado do Espírito Santo.



Figura 5: Partes aéreas da *A. tomentosa*.

4.2 Preparação do extrato etanólico

4.2.1 Percolação

A percolação foi utilizada por ser um método rápido e fácil para extração das substâncias ativas da espécie. O peso das partes aéreas da espécie coletada foi de 1.377,47g. O material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e percolado 10 vezes com etanol P.A (Figura 6).



Figura 6: Percolador

4.2.2 Evaporação do solvente

Após a extração, o extrato foi submetido ao evaporador rotatório de pressão reduzida (*Heidolph*, modelo Hei-VAP) (Figura 7), mantendo o banho Maria do aparelho a 45°- 50°C e pressão a 200 mbar, visando uma remoção rápida do solvente do extrato sem degradar as substâncias presentes nele.



Figura 7: Evaporador rotatório de pressão reduzida

4.3 Fracionamento do extrato etanólico

Exatamente cerca de 2,5 g do extrato etanólico seco foi dissolvido em 300 mL solução de MeOH/H₂O (9:1, v/v) e submetido à extração líquido-líquido com solventes orgânicos seguindo uma ordem crescente de polaridade (Figura 8).

Iniciou-se a extração com o Hexano P.A (Êxodo Científica). Após a adição da fase aquosa no funil, foram adicionados 100 mL de hexano. Agitou-se a solução cuidadosamente e deixando-a de repouso, em seguida, até que ocorresse a

separação das fases. A fase aquosa, localizada na parte inferior do funil, foi coletada em um béquer. Enquanto que a fase contendo hexano foi separada em um erlenmeyer. Depois voltou-se com a fase aquosa para o funil e repetiu-se o experimento até que a coloração da fase orgânica se apresentasse bem clara quando comparada com a coloração inicial.

Terminando a extração com hexano, começou-se a extração com o Diclorometano ACS (Tedia). Usou-se a mesma fase aquosa do hexano para essa extração, adicionando-se 100 mL de diclorometano com leve agitação e depois repouso para separação de fases. Dessa vez a fase orgânica encontrava-se na parte inferior do funil, sendo coletada para um erlenmeyer até mudança significativa de sua coloração. O processo se repetiu com o acetato de etila ACS (Tedia) e posteriormente com o butanol P.A (Vetec), cessando assim a partição.

Com o término da partição, adicionou-se aos erlenmeyers, contendo as fases orgânicas do hexano, do diclorometano e do acetato de etila, o sulfato de sódio anidro para que esse pudesse retirar a água presente nas frações. Em seguida filtraram-se todas as frações para retirada do sulfato de sódio anidro (Vetec) adicionado, sendo elas levadas depois para o evaporador rotatório sob pressão reduzida para sua secagem.



Figura 8: Extração Líquido-líquido

4.4 Atividade vasodilatadora

O ensaio para atividade vasodilatadora foi realizado no Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP), sob orientação da Prof^a. Dra. Juliana Montani. Registro de tensão isométrica da aorta: Ratos Winstar machos (200-250g) foram sacrificados por

deslocamento cervical sob anestesia geral, para que a porção torácica da artéria aorta fosse dissecada e limpa através da retirada do tecido conjuntivo externo, sendo dividida em cilindros de aproximadamente 3 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram posicionados em hastes experimentais em cubas verticais preenchidas com solução Krebs- Henseilet continuamente oxigenada com mistura carbogênica (95% O₂/ 5% CO₂), à 37 °C. Uma das extremidades do tecido foi conectada a um transdutor de tensão isométrica (MLT0201; ADInstruments) e os sinais gerados foram digitalizados (Power Lab 4/30; ADInstruments) e armazenados em computador para posterior análise através do programa LabChart Pro (ADInstruments) (RAIMUNDO *et al.*, 2006).

4.4.1 Protocolos Experimentais

Efeito vasodilatador do extrato bruto, frações e substâncias isoladas: Após o período de equilíbrio da preparação, a contratatura do músculo liso vascular foi induzida com 10 µM de fenilefrina ou 40mM de KCl e foram adicionadas concentrações crescentes das amostras a serem testadas. Foram utilizados anéis de aorta com e sem endotélio com o objetivo de verificar a importância do endotélio vascular para o efeito vasodilatador (RAIMUNDO *et al.*, 2008).

4.5 Perfil cromatográfico dos extratos

4.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi utilizada visando observar o perfil químico das amostras, na qual com o auxílio de um capilar, aplicou-se uma solução de cada extrato em uma cromatoplaça de gel de sílica com indicador de fluorescência F₂₅₄ (Silicycle), com tamanho da partícula de 20x20 cm e espessura de 250µm, com suporte de alumínio.

Em uma cuba com o sistema de solventes acetato:acetona:água:ácido acético (5:3:1:0,2, v/v/v/v) colocou-se cuidadosamente a placa, evitando que o ponto de aplicação da amostra entrasse em contato com o eluente. Quando o solvente atingiu 0,5 cm do topo da placa, removeu-se a placa e aguardou-se a secagem para observar o perfil da amostra utilizando Natural Product Reagent, NP-PEG (Borinato

de 2-aminoetil-difenila/polietilenoglicol 4000) e radiação UV nos comprimentos de onda curta (254 nm) e longa (365 nm) como reveladores.

4.5.2 Cromatografia em coluna (CC)

4.4.5.1 Sephadex

Este método foi utilizado visando a separação de substâncias presentes na amostra através do dimensionamento molecular propiciado pelas características físico-químicas do Sephadex-LH20. Para cromatografia foi usada uma coluna de vidro de dimensões 37x2 cm, a qual foi empacotada com cerca de 30000mg de sephadex LH-20 e utilizando metanol como solvente (Figura 9).

Pesou-se aproximadamente 90 mg das frações acetato de etila e butanol da *A. tomentosa*. Ambas foram diluídas em 2 mL de metanol ACS (Tedia) e aplicadas no topo das colunas para iniciar a coleta das frações.

A eluição iniciou-se utilizando apenas metanol, depois passou para MeOH:H₂O (9:1, v/v) e para finalizar recondicionou-se a coluna com metanol. As frações obtidas foram devidamente secas e pesadas.



Figura 9: Imagem a esquerda mostrando a aplicação da amostra; imagem central mostrando eluição da amostra pela coluna; imagem a direita mostrando as frações coletadas.

4.4.5.2 Sílica C18

Este método foi utilizado a fim de separar as substâncias presentes na amostra de acordo com sua polaridade.

As frações butanólicas, obtidas pós-cromatografia de coluna com Sephadex que apresentaram substâncias parcialmente isoladas, foram diluídas em 2 mL de MeOH:H₂O (9:1, v/v) e aplicadas na coluna cromatográfica empacotada com sílica C18 para iniciar a coleta das frações.

Para esta cromatografia foi usada uma coluna de dimensões 54x1,2 cm, a qual foi empacotada com cerca de 20g de sílica C18 (Carbon 17%) (Silicycle), com tamanho de partícula de 40-63µm, e utilizando água ultrapura como solvente.

A eluição foi iniciada utilizando apenas água, depois passou para H₂O:MeOH (9:1, v/v), mudando a proporção dos solventes a cada 30 mL de eluente, e para finalizar recondicionou-se a coluna com água. Sendo as frações obtidas devidamente secas e pesadas.

4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.6.1 Preparo das amostras

Através dos valores obtidos na pesagem das frações da CC fizeram-se cálculos para obter um volume respectivo para determinada concentração para uso no CLAE, devendo todas as amostras estar a uma concentração de 1mg/mL.

A cada fração obtida da CC, foi adicionado 1 mL de metanol grau HPLC (Tedia), sendo transferido para um eppendorf apenas o volume determinado pelos cálculos para ajustar a concentração.

Para amostras do acetato de etila, secou-se o solvente contido nos eppendorfs com ar comprimido e adicionou-se 1 mL de solução de H₂O:AcN (8:2, v/v) em cada. E para amostras do butanol, o solvente contido nos eppendorfs foi seco e adicionou-se 1 mL de metanol em cada, que posteriormente foram transferidos para vials para análise por CLAE.

4.6.2 Condições para a CLAE

4.6.2.1 Analítico

O aparelho de CLAE (Shimadzu) é equipado com um degaseificador (DGU-20A5), uma bomba quartenária (LC-20AT), autoinjeter (SIL-20A), forno (CTO-20A), DAD (SPD-M20A) e controlador (CBM-20A) (Figura 10).



Figura 10: Aparelho de CLAE.

As frações do acetato de etila e do butanol obtidas por CC por Sephadex foram submetidas ao CLAE analítico para análise do perfil de cada fração, a fim de detectar aquelas com possíveis substâncias isoladas.

A coluna utilizada no método foi a Coluna Luna C₁₈, 5 μ m, 100A, com dimensão de 250 x 4,6 mm. A temperatura do forno e da célula foi configurada para 30°C e o volume de injeção da amostra igual a 20 μ L. Os eluentes utilizados para frações de acetato foram acetonitrila grau HPLC (Tedia) e solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% (pH 3,0). Já os eluentes para frações butanólicas foram metanol grau HPLC (Tedia) e solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% (pH 3,0), vazão de 1mL/min e detector DAD com varredura de 200-400nm.

As condições do gradiente de eluição para cada tipo de amostra são mostradas nas tabelas a seguir:

Tabela 2: Gradiente de Eluição para Frações de Acetato de etila.

Tempo	Concentração de Acetonitrila
0,01	15
15	35
20	100
23	100
24	15
30	15
30,01	-----

Tabela 3: Gradiente de Eluição para Frações butanólicas

Tempo	Concentração de Metanol
0,01	15
15	35
20	100
23	100
24	15
30	15
30,01	-----

4.6.2.2 CLAE Preparativa

Realizou-se a purificação da amostra ATBF9-10F'4,5 obtida por CC de sílica C18 (item 4.4.2.2), oriunda do extrato butanólico. Os eluentes utilizados na análise foram metanol grau HPLC (Tedia) e solução aquosa de ácido trifluoracético 0,05% (pH 3,0).

A coluna utilizada no método foi a Coluna Luna C₁₈, 5µm, 100Å, com dimensão de 250 x 10 mm. A temperatura do forno e da célula foi configurada para 30°C e o volume de injeção da amostra igual a 100µL.

As condições do gradiente de eluição são mostradas na tabela a seguir:

Tabela 4: Gradiente de Eluição CLAE Preparativa.

Tempo	Concentração de Metanol
0,01	15
10	40
15	100
20	100
25	15
30	15
30,01	-----

4.7 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN de ¹H e ¹³C foram realizados em espectrômetros Varian 400 e 500 MHz do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN/UFRJ). O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna. As substâncias isoladas foram dissolvidas em 0,6mL de metanol deuterado para as análises. Os deslocamentos químicos foram medidos em partes por milhão (ppm) da frequência aplicada e as constantes de acoplamento (*J*) medidas em Hertz (Hz).

5 Resultados e Discussão

5.1 Extratos orgânicos

5.1.1 Obtenção e rendimentos dos extratos

O material vegetal (1377,47g) extraído por percolação (item 4.2.1) gerou 454,17g de extrato etanólico após evaporação do solvente (item 4.2.2), apresentando rendimento de 32,97%.

A tabela 5 demonstra os pesos e rendimentos dos extratos secos obtidos após extração líquido-líquido feita a partir do extrato etanólico (item 4.3).

Tabela 5: Peso e Rendimento dos Extratos Derivados da Extração Líquido-líquido

Extrato	Peso (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,0837	3,35
Diclorometano	0,898	35,92
Acetato de Etila	0,4628	18,51
Butanol	0,1673	6,69
Aquosa	0,6996	27,98

5.1.2 Avaliação da atividade vasodilatadora dos extratos

Em triagem para atividade vasodilatadora (item 4.7) os extratos que apresentaram atividade semelhante ao extrato etanólico na aorta dos ratos foram o extrato butanólico, com um relaxamento máximo de $77,08\% \pm 5,44\%$ na concentração de $30 \mu\text{g/mL}$, e acetato de etila, com um relaxamento de $64,5\% \pm 3,77\%$ na mesma concentração. Diante desse resultado, resolveu-se dar continuidade ao estudo com apenas estes extratos que apresentaram atividade vasodilatadora.

5.2 Extrato Butanol

5.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD é uma técnica de adsorção na qual a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. A fase móvel é a responsável por arrastar as substâncias menos adsorvidas na fase estacionária. Com isso, de acordo com a polaridade do eluente utilizado para fase móvel, conforme item 4.4.1, pode-se dizer que as substâncias presentes no extrato butanólico são substâncias de média e alta polaridade, indicando a provável presença de substâncias glicosiladas.

O revelador NP por ser muito sensível e específico foi utilizado para evidenciar a presença de substâncias fenólicas, pois o mesmo reage com estes formando complexos fluorescentes. Enquanto que o PEG foi utilizado como intensificador de fluorescência. Diante disso, segundo Wagner e Bladt (1996), após a revelação química, a coloração laranja-amarelado indica a presença de flavonóis, tais como: quercetina, miricetina e seus glicosídeos; coloração amarela-esverdeada: flavonóis canferol, isoramnetina e seus glicosídeos, flavonas como a apigenina e seus glicosídeos; e coloração laranja para a flavona luteolina e seus glicosídeos. E a coloração azul indica a presença de ácidos fenólicos (CORRÊA *et al.*, 2016) (Figura 11).

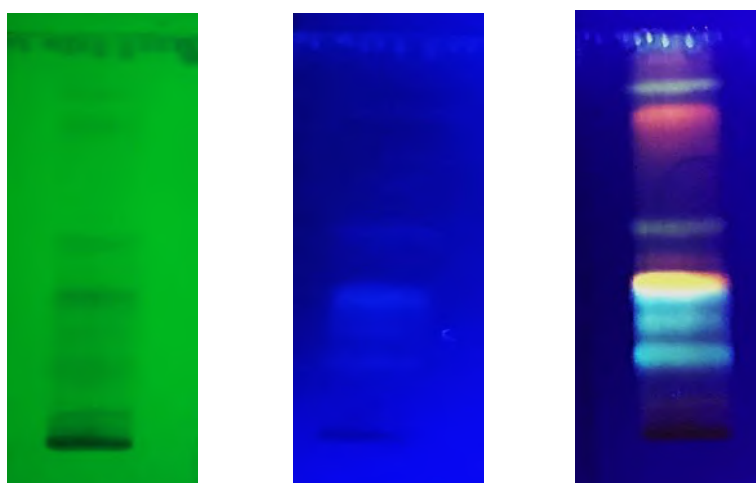


Figura 11: Cromatoplaça do extrato butanólico observada nos comprimentos de onda de 254nm, 365nm e com NP-PEG no comprimento de 365nm, respectivamente.

5.2.2 Isolamento de Constituintes Fenólicos do Extrato butanólico

Ao realizar cromatografia por coluna de Sephadex (item 4.4.2.1) do extrato butanólico, coletou-se 25 frações que foram secas, pesadas e analisadas por CLAE (item 4.5). A separação das substâncias por CC de sephadex é baseada na filtração molecular, no qual se pode separar as substâncias em solução segundo seu peso molecular.

As frações foram monitoradas por CLAE-DAD e aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram unidas, renomeadas e pesadas novamente (tabela 6).

Tabela 6 – Peso das frações butanólica.

Frações	Peso do Extrato (mg)
ATBF1-4	3,7
ATBF5-7	13,0
ATBF8	6,8
ATBF9-10	30,0
ATBF11	1,7
ATBF12-25	24,0

5.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O CLAE é uma técnica de alta resolução, eficiência e sensibilidade. Com isso resolveu-se utilizá-la para analisar o perfil cromatográfico das amostras.

O cromatograma do extrato butanólico apresentou quatro picos majoritários no comprimento de onda de 340nm dentro do tempo de retenção desejado (Figura 12). Estes picos tiveram tempo de retenção de aproximadamente 14,6, 15, 16,9 e 17,8 minutos, com percentual de área de 12,9, 9,7, 3,3 e 4,3%, respectivamente. O espectro de UV apresentou máximos de absorção característicos de substâncias fenólicas tais como verbascosídeo ou clorogênio.

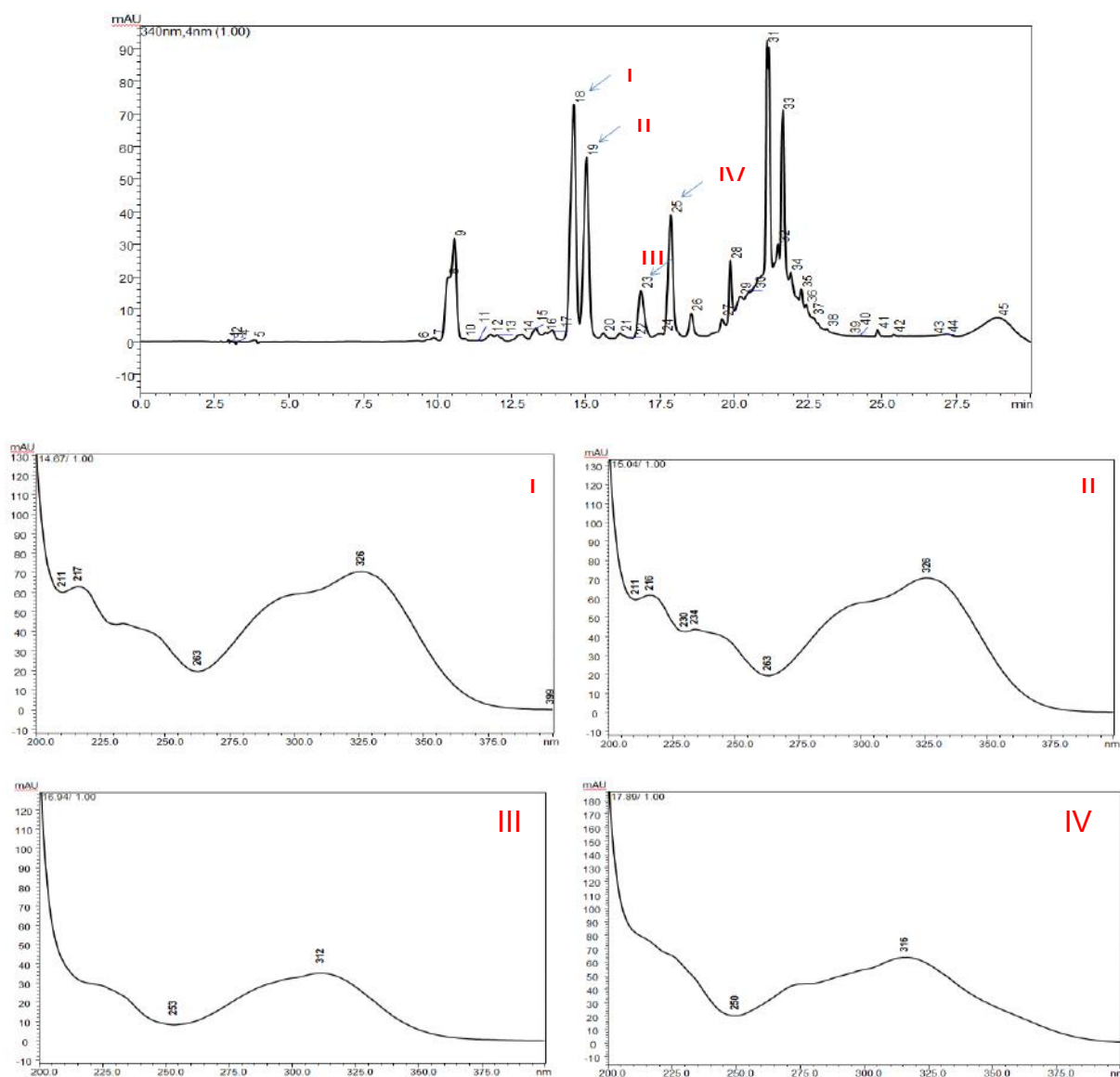


Figura 12: Perfil Cromatográfico e espectro UV do Extrato de butanólico da *A. tomentosa*

A análise dos cromatogramas mostrou que a fração ATBF11 foi a única que apresentou perfil cromatográfico com um pico majoritário (Figura 13), com tempo de retenção de aproximadamente 18 minutos, com concentração relativa de 75,6% e pureza total do pico igual 0,78. Esta substância apresentou máximos de absorção de 255nm e 357nm, indicativo de um flavonol (BHAT *et al.*, 2006). A substância precisa ser purificada.

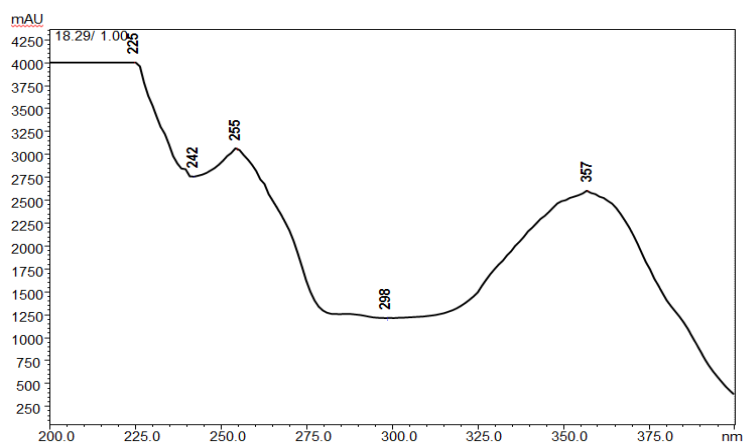
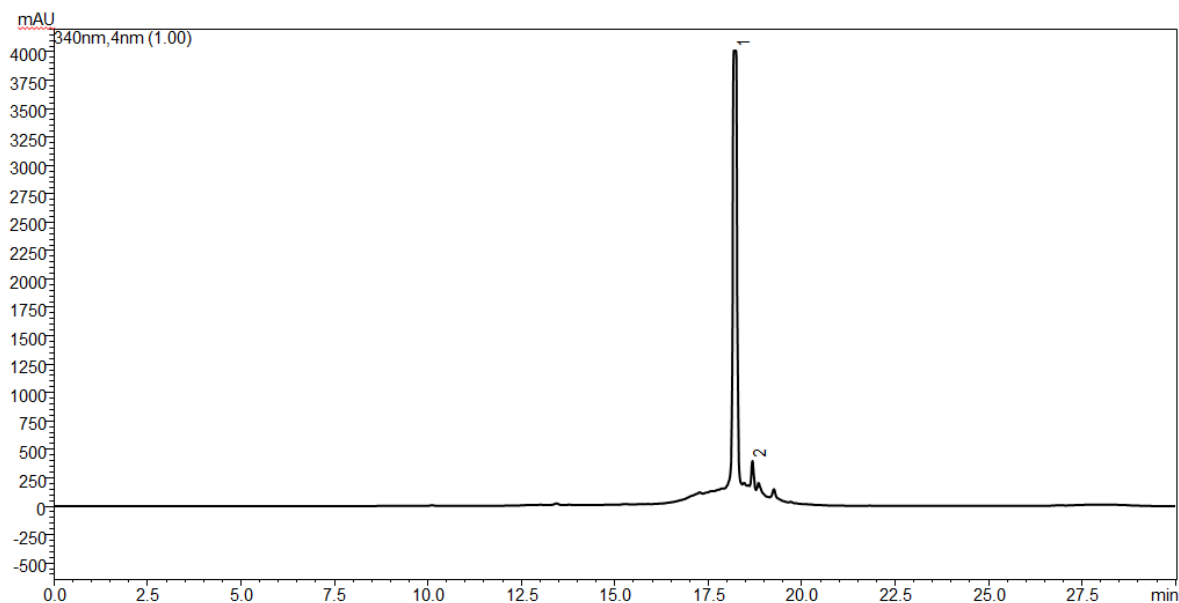


Figura 13: Perfil cromatográfico e espectro UV da fração ATBF11

Enquanto que as frações ATBF8, ATBF9-10 e ATBF12-25 (Figura 14) analisadas em CLAE foram submetidas a cromatografia em coluna com sílica C18 (item 4.4.2.2) para melhorar a separação das substâncias presentes nestas frações.

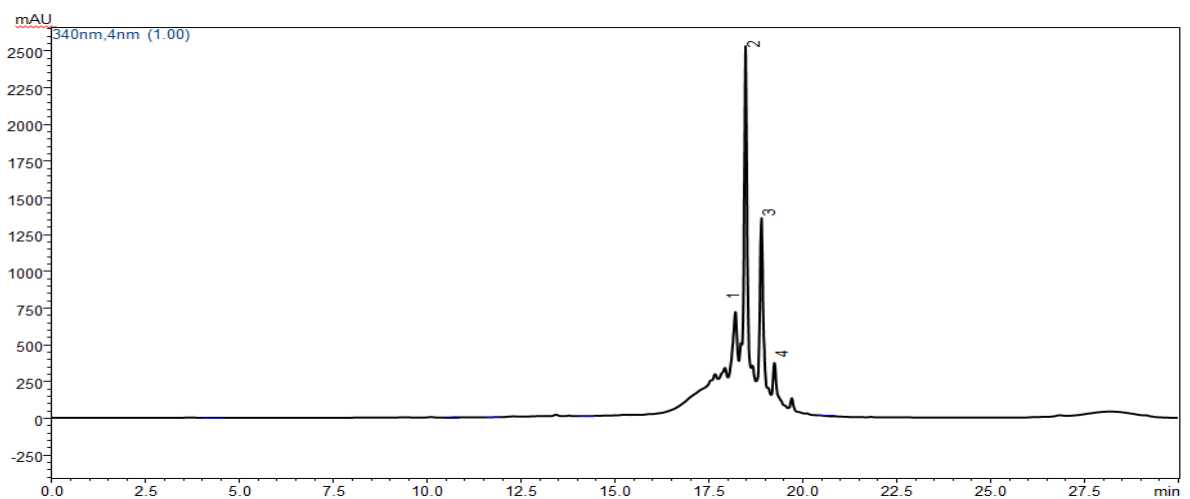
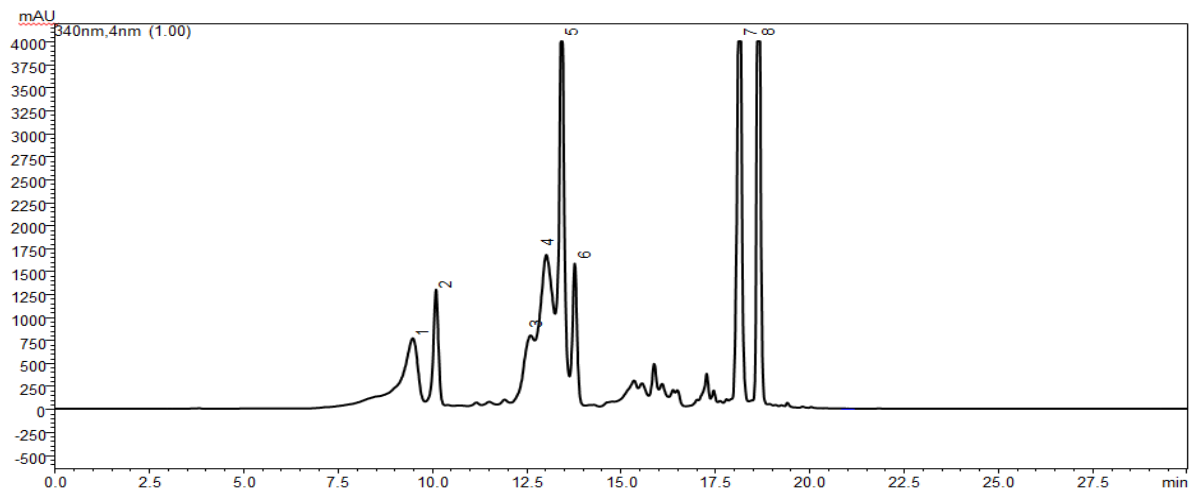
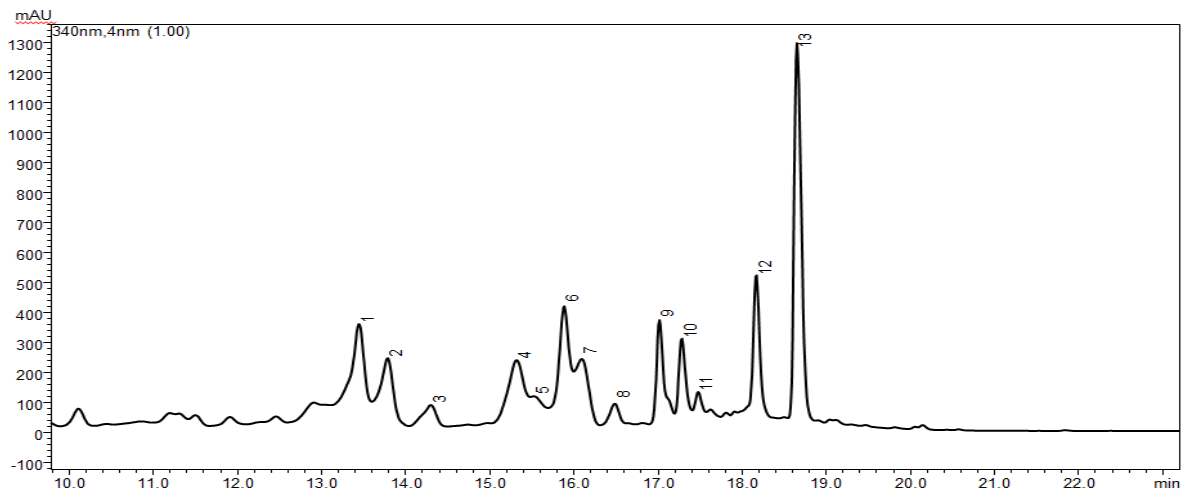


Figura 14- Perfil Cromatográfico da fração ATBF8, ATBF9-10 e ATBF12-25

A cromatografia em coluna com sílica C18 da fração ATBF8 gerou 15 frações, as quais foram posteriormente analisadas em CLAE-DAD (item 4.5.2.1), permitindo-nos a observação dos perfis cromatográficos. Diante disso, selecionou-se a fração

ATBF8F'9-12 (2,1 mg) para dar continuidade ao estudo, uma vez que a mesma apresentou em seu perfil uma possível substância isolada.

O perfil da fração ATBF8F'9-12 (Figura 15) apresenta um pico majoritário com tempo de retenção de aproximadamente 16 minutos, com uma área relativa de 89,7% e pureza de 0,99. Através da obtenção do espectro de UV no CLAE, constatou-se dois máximos de absorção: em 265nm e o em 346nm, o que geralmente indica a presença de um flavona (BHAT *et al.*, 2006).

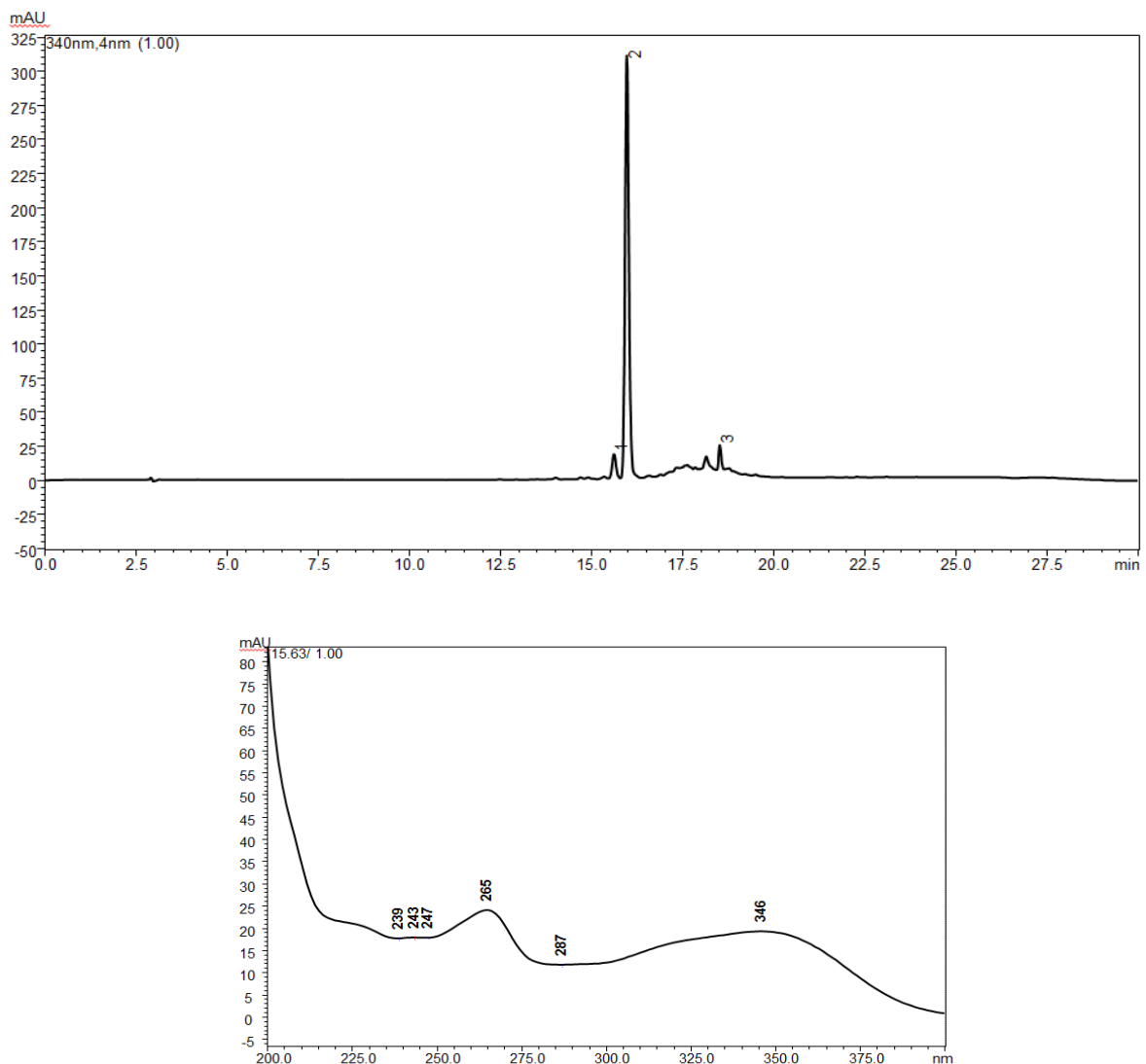


Figura 15: Perfil Cromatográfico e espectro UV da fração ATBF8F'9-12

A cromatografia em coluna sílica C18 da fração ATBF9-10 também gerou 15 frações, e repetimos os mesmos passos da fração anterior. A fração selecionada para continuar o estudo foi a ATBF9-10F'4,5 (2,7 mg) (Figura 16), no perfil desta fração tem-se dois picos majoritários, com tempos de retenção de aproximadamente 16,2 e 16,7 minutos, com área relativa de 41% e 54% e pureza de 0,93 e 0,55, respectivamente. Em análise feita por UV, o primeiro pico majoritário apresenta máximos de absorção em 256nm e 357nm podendo ser um flavonol, enquanto que o segundo pico apresenta máximos 265nm e 349nm indicativo de uma flavona (BHAT *et al.*, 2006). Como ela continha dois picos majoritários resolveu-se submetê-la a uma análise por CLAE preparativa (item 4.5.2.2), a fim de isolar essas substâncias, obtendo assim duas subfrações a ATBF9-10F'4,5I (1,6 mg) e ATBF9-10F'4,5II (0,6 mg), esta última apresentando resultados satisfatórios, já que conseguiu-se isolar uma das substâncias que estavam presente na fração de origem, com uma pureza de pico de 0,99, área relativa de 100% e máximos de absorção de 265nm e 349nm (Figura 17).

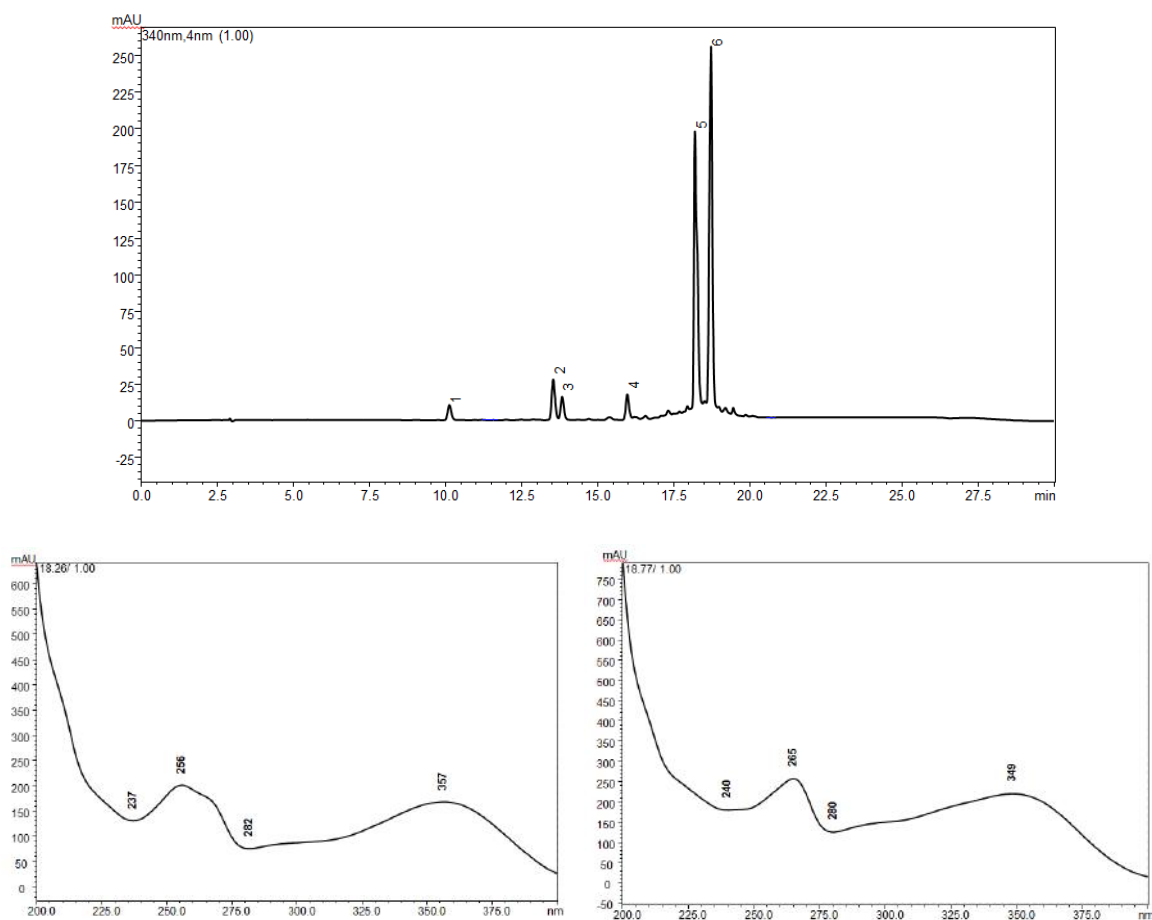


Figura 16: Perfil Cromatográfico e espectro UV da fração ATBF9-10F'4,5

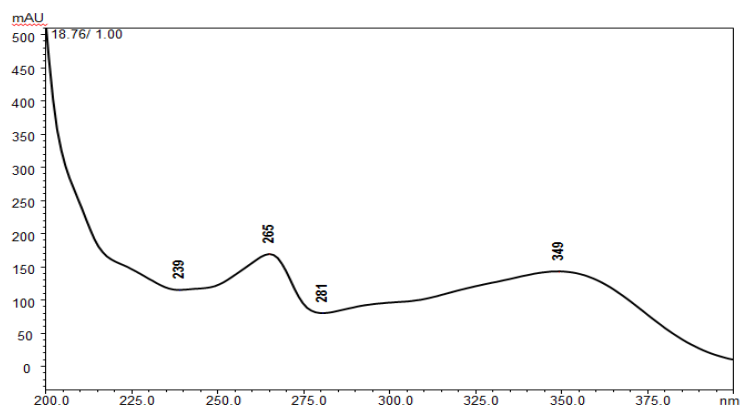
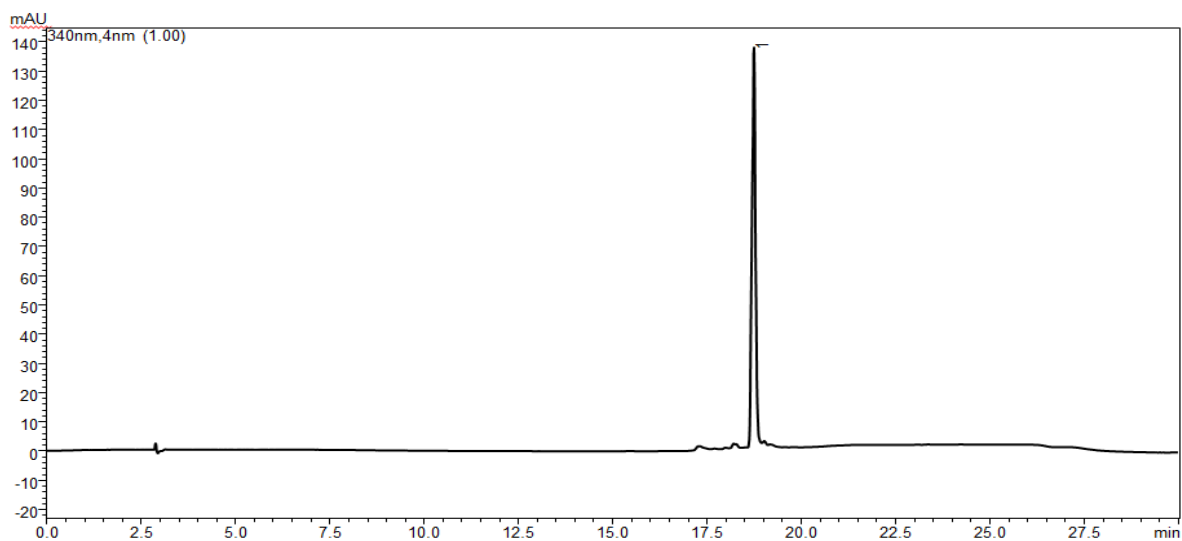


Figura 17: Perfil Cromatográfico da subfração ATBF9-10F'4,5II.

A cromatografia em coluna com Sílica C18 da fração ATBF12-25 gerou 29 frações, porém após análise dos seus perfis por CLAE, nenhuma apresentou resultado satisfatório para continuidade do estudo.

O fluxograma 1 (Figura 18), demonstra passo a passo a obtenção de cada extrato e fração butanólica.

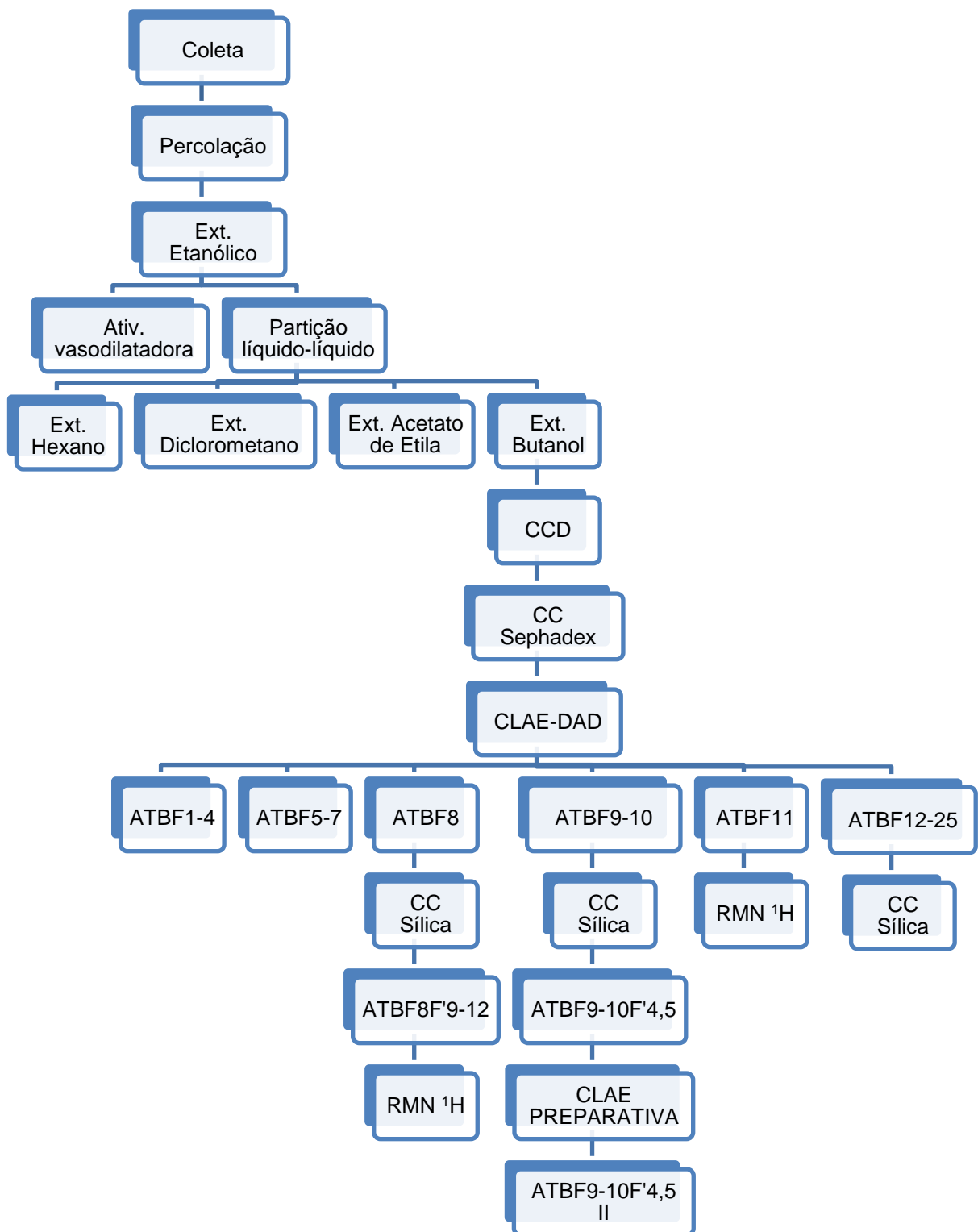


Figura 18: Fluxo da coleta á obtenção de extratos e frações butanólicos.

5.3 Acetato de Etila

5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Assim como no extrato butanólico, as substâncias presentes no extrato de acetato de etila são substâncias de média e alta polaridade, indicando a provável presença de substâncias glicosiladas. A absorção no comprimento de onda de 365nm mostrando fluorescência roxa e a coloração verde a alaranjado são indicativos da presença de flavonoides (Figura 19) (WAGNER & BLADT, 1996).



Figura 19: Cromatoplaça do extrato acetato de etila observada nos comprimentos de onda de 254nm, 365nm e com NP-PEG no comprimento de 365nm, respectivamente.

5.3.2 Isolamento de Constituintes Fenólicos do Extrato Acetato

Ao realizar cromatografia por coluna de Sephadex (item 4.4.2.1) do extrato acetato de etila, coletou-se 21 frações que foram secas, pesadas e analisadas por CLAE (item 4.5). As frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram unidas, renomeadas e pesadas novamente (tabela 7).

Através dos cromatogramas analisados em CLAE, as frações que se apresentaram satisfatórias para prosseguir com os estudos, de acordo com o perfil cromatográfico contendo um pico majoritário representando possível isolamento de substâncias, foram as ATAcF5 e ATAcF10.

Tabela 7 – Peso das frações de Acetato de Etila.

Frações	Peso do Extrato (mg)
ATAcF1-4	10,9
ATAcF5	6,8
ATAcF6	3,4
ATAcF7	3,0
ATAcF8	20,6
ATAcF9	5,8
ATAcF10	4,8
ATAcF11	1,8
ATAcF12	6,1
ATAcF13	15,3
ATAcF14-15	1,8
ATAcF16-17	2,7
ATAcF18-20	1,6
ATAcF21	1,7

5.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O cromatograma do extrato acetato de etila apresentou cinco substâncias majoritárias (Figura 20) com tempo de retenção de 13,3, 13,5, 15,2, 16,7 e 18,7 minutos, com área de 9, 8, 20, 13,5, 9,2 e 5,2%, respectivamente. O espectro de UV apresentou dois máximos de absorção em cada substância: I (255 e 354nm), II (255 e 353nm), III (265 e 347nm), IV (252 e 334nm) e V (266 e 330nm). De acordo com Bhat *et al.*(2006), estes valores de absorbância indicam que os picos I e II possivelmente são um flavonol e os picos III, IV e V uma flavona (BHAT *et al.*, 2006).

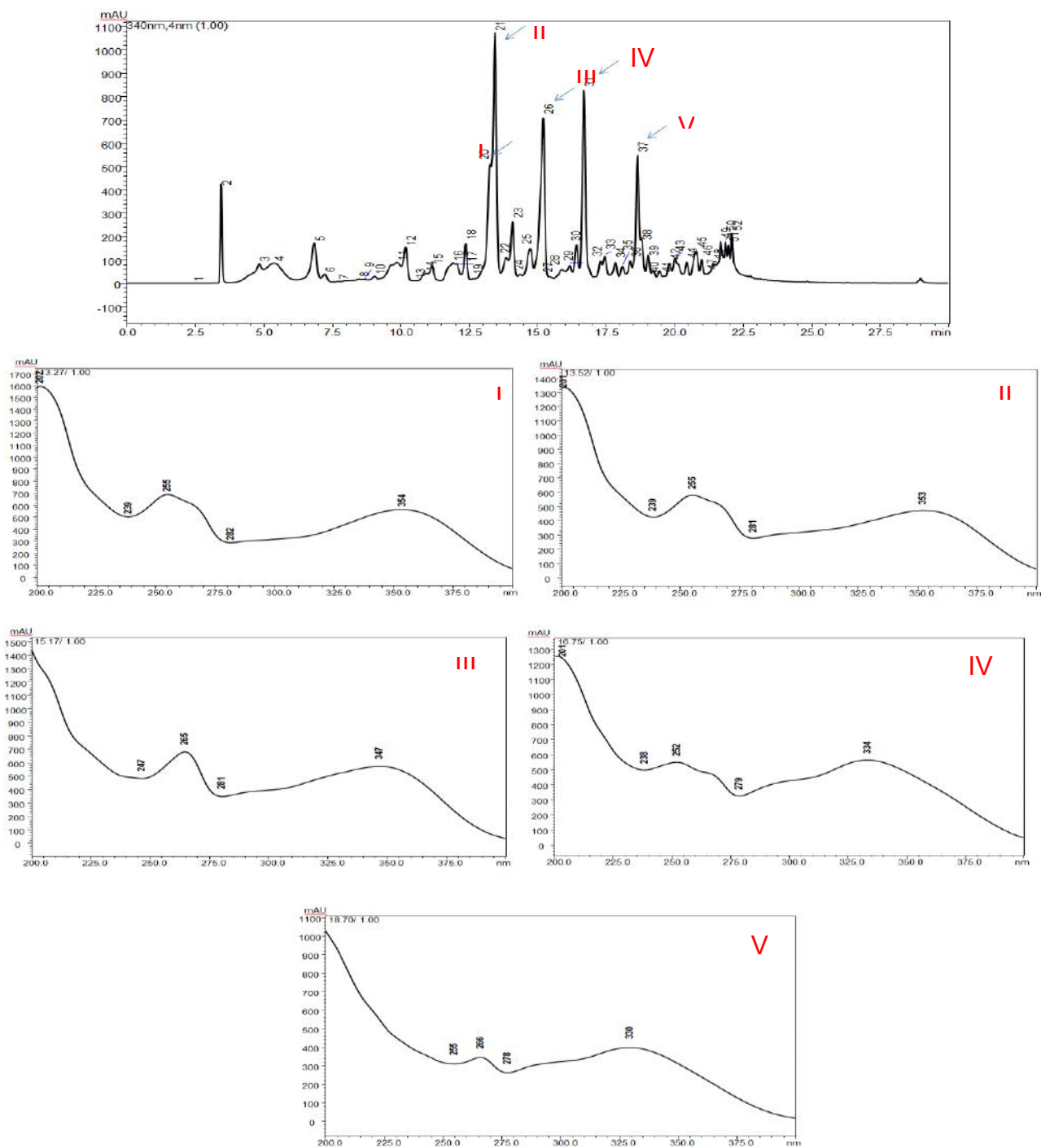


Figura 20: Perfil cromatográfico e espectros UV do extrato de Acetato de etila

O perfil da fração ATAcF5 (Figura 21) apresenta um pico majoritário com tempo de retenção de aproximadamente 15 minutos, com uma concentração relativa de 38%, com pureza de 0,68. Através de uma análise feita por UV, constatou-se dois máximos de absorção: um ocorrendo em 245nm e o outro em 346nm, o que geralmente indica a presença de um flavona (BHAT *et al.*, 2006).

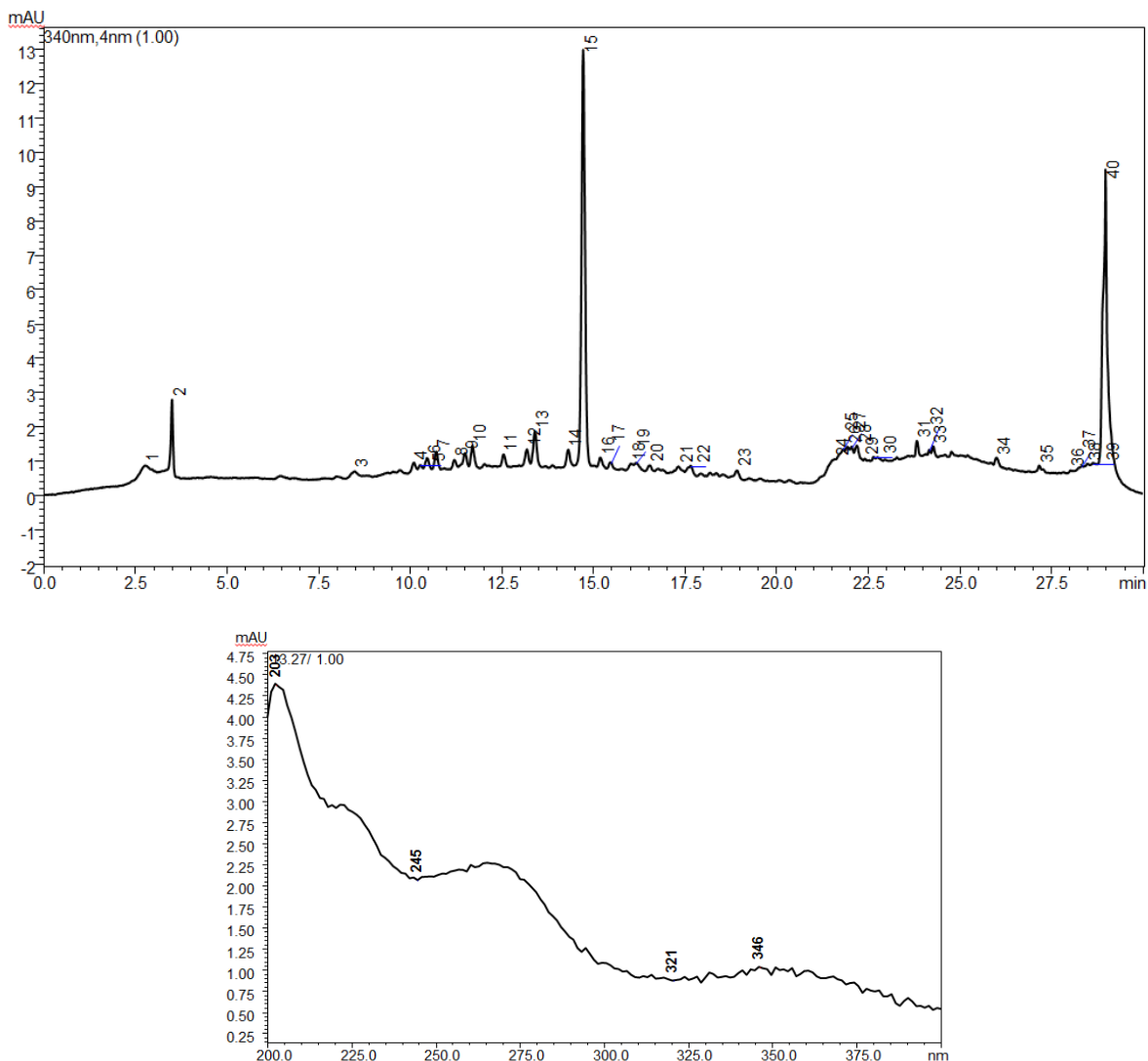


Figura 21: Perfil cromatográfico e espectro UV da fração ATAcF5

No perfil da fração ATAcF10 (Figura 22) observa-se a presença de um pico majoritário, o qual apresentou tempo de retenção de aproximadamente 13 minutos, com concentração de 71,7%, com pureza de 0,99 e máximos de absorção 255 e 355nm, indicando uma possível presença de flavonol (BHAT *et al.*, 2006).

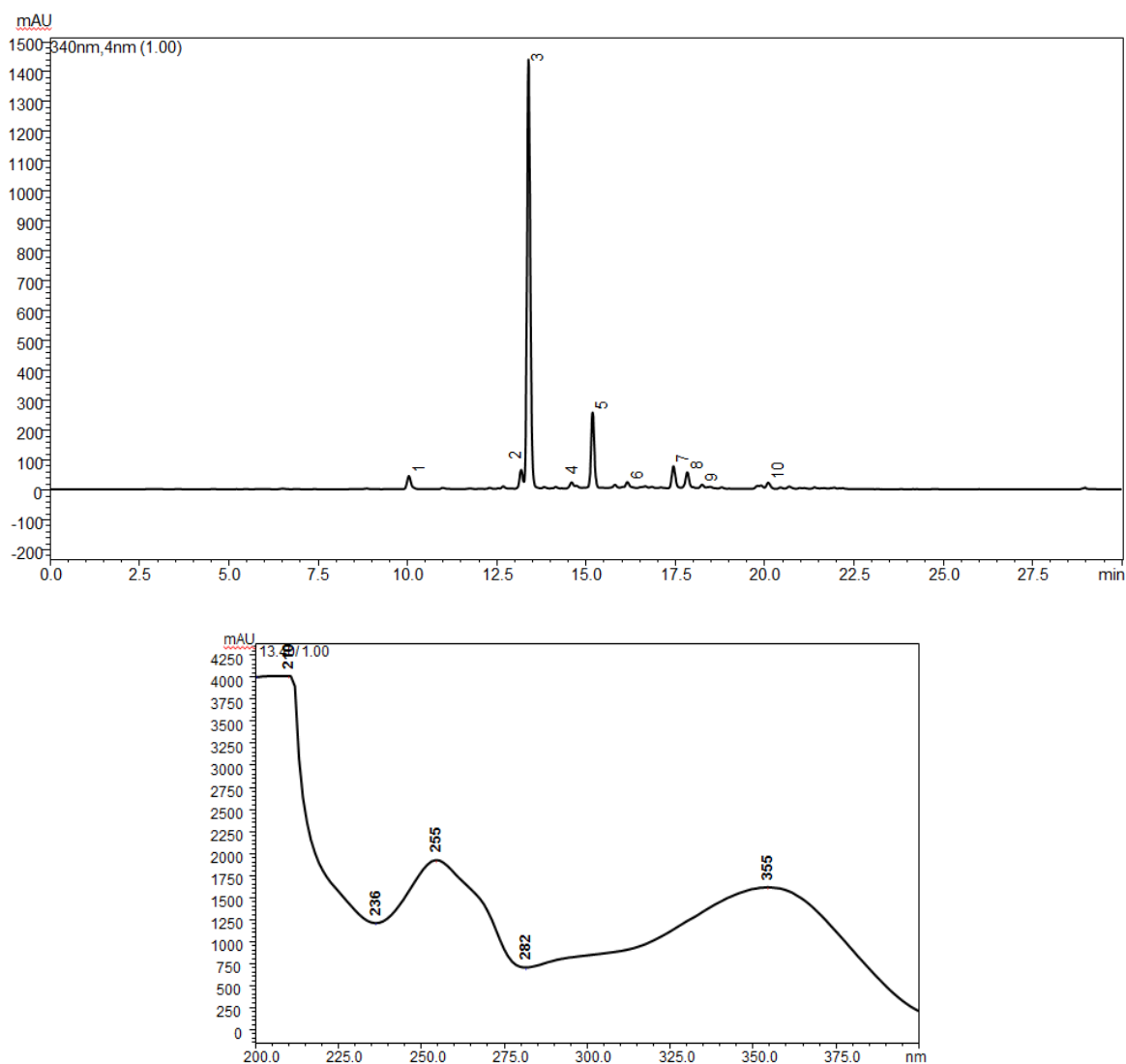


Figura 22: Perfil cromatográfico e espectro UV da fração ATAcF10

5.3.4 Caracterização da Substância presente na fração ATAcF10

Das frações que apresentaram substâncias isoladas e que foram submetidas ao RMN ^1H (item 4.6), apenas a fração ATAcF10 pôde ser caracterizada através de dados espectrais de RMN medidos em metanol- d_4 (Figuras 23, 24 e 25).

Sabendo que o RMN é uma técnica utilizada a fim de se determinar a estrutura química de uma substância, o uso da mesma nos propiciou a identificação do esqueleto carbono-hidrogênio da substância orgânica presente na fração.

A análise por RMN ^1H mostrou deslocamentos químicos (em ppm), multiplicidades e acoplamentos escalares compatíveis com a aglicona da quercetina:

7,70 (d, J=2,1 Hz, 1H), 7,59 (dd, J= 8,5, 2,1 Hz, 1H), 6,87 (d, J=8,4 Hz, 1H), 6,40 (d, J=2,1 Hz, 1H) e 6,21 (d, J=2,0 Hz, 1H). O próton anomérico com deslocamento químico de 5,27ppm e acoplamento escalar de 7,5Hz condizentes com o da glicose (d, J=7,5 Hz, 1H). Os dados completos são apresentados na tabela 8. Comparando os dados obtidos com dados da literatura (Kazuma *et al.* 2002), identificou-se a substância presente na fração ATAcF10 como sendo o flavonol glicosilado, a quercetina-3-O-glicosídeo (Isoquercitrina) (Figura 26).

Como ferramenta de auxílio para orientação de todo o processo de obtenção dos extratos e frações acetato de etila até a identificação da substância isolada foi utilizado o fluxograma 2 (Figura 27).

Tabela 8 – Comparação dos dados espectroscópicos de RMN ¹H obtidos com os dados da literatura.

Hidrogênio	Literatura	Experimentais
	δ (ppm), m, J(Hz)	δ (ppm), m, J(Hz)
Aglicona		
H-6	6,20 (d, 2,2)	6,21 (d, 2,0)
H-8	6,39 (d, 2,2)	6,40 (d, 2,1)
H-2'	7,70 (d, 2,2)	7,70 (d, 2,1)
H-3'		
H-5'	6,86 (d, 8,3)	6,87 (d, 8,4)
H-6'	7,58 (dd, 2,2, 8,3)	7,59 (dd, 2,1, 8,5)
3-Glicosil		
H-1	5,23 (d, 7,6)	5,27 (d, 7,5)
H-2	3,47 (dd, 7,6, 9,0)	3,47 (d, 7,7)
H-3	3,42 (t, 9,0)	3,42 (t, 8,8)
H-4	3,34 (t, 9,0)	3,34 (t)
H-5	3,21 (ddd, 2,4, 5,4, 9,0)	3,22 (ddd, 2,2, 5,2, 7,8)
H-6 ^a	3,70 (dd, 2,4, 12,0)	3,71 (dd, 2,1, 11,8)
H-6b	3,56 (dd, 5,4, 12,0)	3,57 (dd, 5,3, 11,9)

Isoquercitrina

^1H NMR (400 MHz, e^{dd}) δ 7.70 ($dJ = 2.1$ Hz, 1H), 7.59 ($dd = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 6.87 ($dJ = 8.4$ Hz, 1H), 6.40 ($dJ = 2.1$ Hz, 1H), 6.21 ($dJ = 2.0$ Hz, 1H), 5.27 ($dJ = 7.5$ Hz, 1H), 3.71 ($dd = 11.8, 2.1$ Hz, 1H), 3.57 ($dd, = 11.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.47 ($dJ = 7.7$ Hz, 1H), 3.42 ($dJ = 8.8$ Hz, 1H), 3.34 (t, 1H), 3.22 ($dddJ = 7.8, 5.2, 2.2$ Hz, 1H).

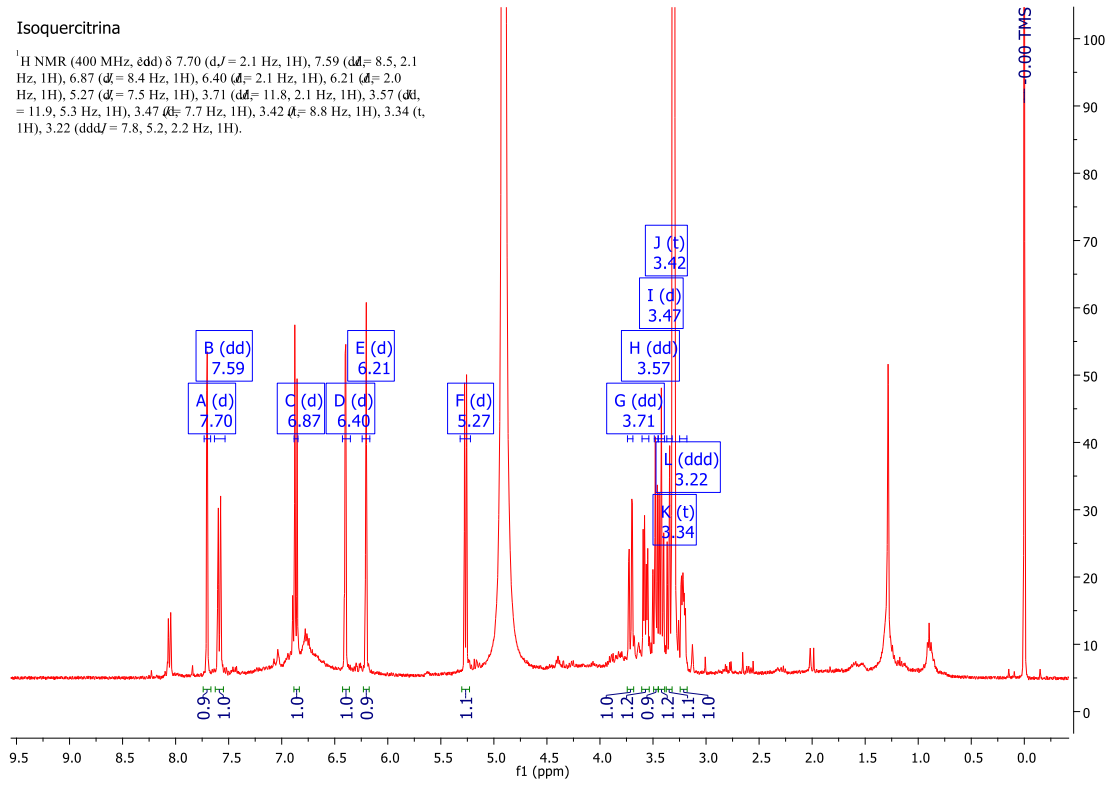


Figura 23: Espectro de RMN ^1H da fração ATAcF10 em MeOD

Isoquercitrina

^1H NMR (400 MHz, e^{dd}) δ 7.70 ($dJ = 2.1$ Hz, 1H), 7.59 ($dd = 8.5, 2.1$ Hz, 1H), 6.87 ($dJ = 8.4$ Hz, 1H), 6.40 ($dJ = 2.1$ Hz, 1H), 6.21 ($dJ = 2.0$ Hz, 1H), 5.27 ($dJ = 7.5$ Hz, 1H), 3.71 ($dd = 11.8, 2.1$ Hz, 1H), 3.57 ($dd, = 11.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.47 ($dJ = 7.7$ Hz, 1H), 3.42 ($dJ = 8.8$ Hz, 1H), 3.34 (t, 1H), 3.22 ($dddJ = 7.8, 5.2, 2.2$ Hz, 1H).

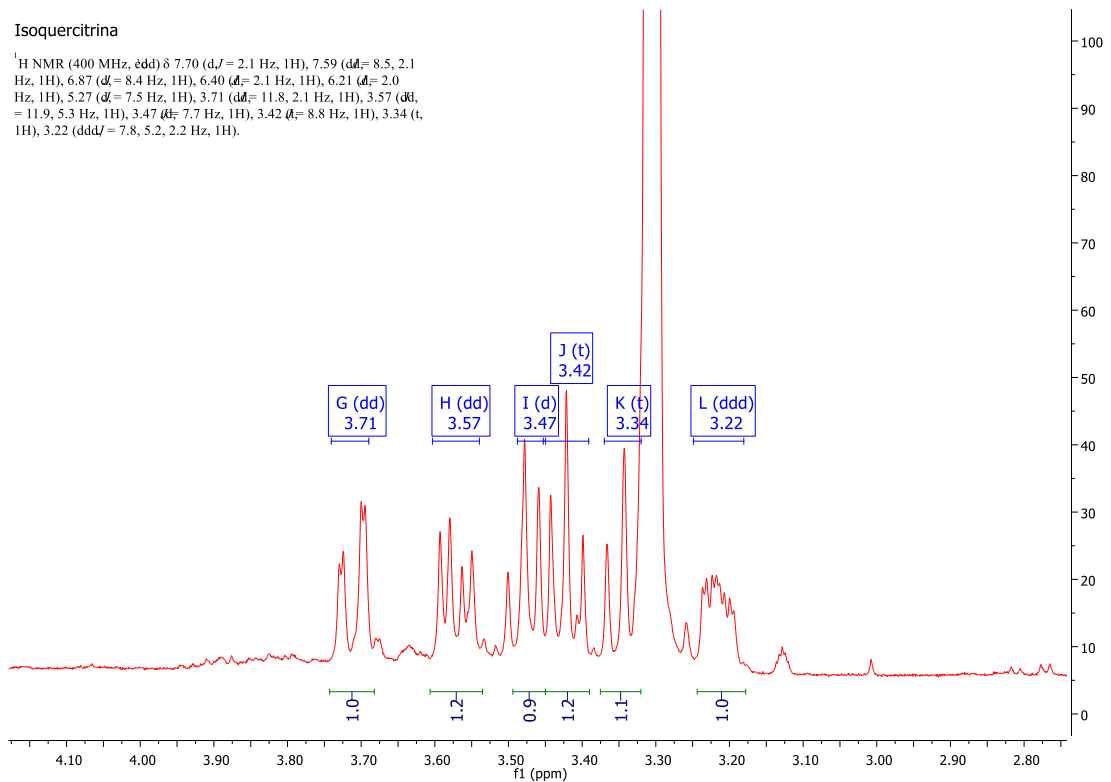


Figura 24: Expansão do espectro de RMN ^1H , enfatizando a região de 3 a 4ppm.

Isoquercitrina

¹H NMR (400 MHz, δ) 7.70 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 11.8, 2.1 Hz, 1H), 3.57 (dd, J = 11.9, 5.3 Hz, 1H), 3.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.42 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.34 (t, 1H), 3.22 (ddd, J = 7.8, 5.2, 2.2 Hz, 1H).

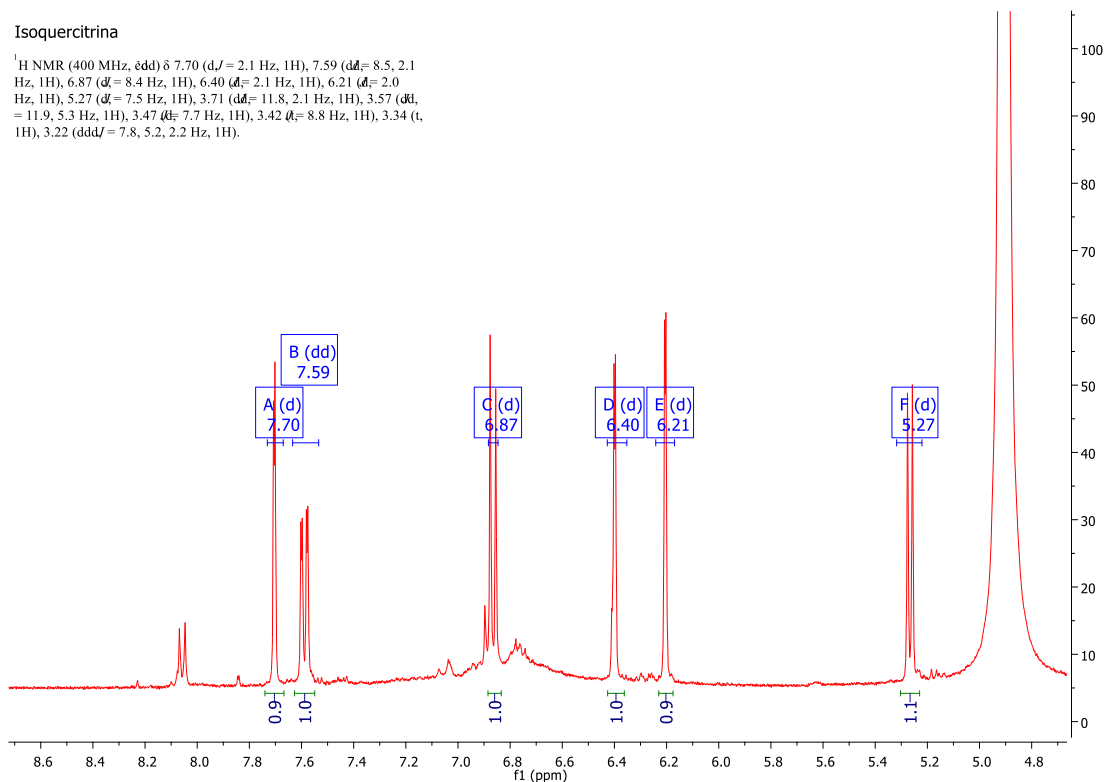


Figura 25: Expansão do espectro de RMN ¹H, enfatizando a região de 5 a 8ppm.

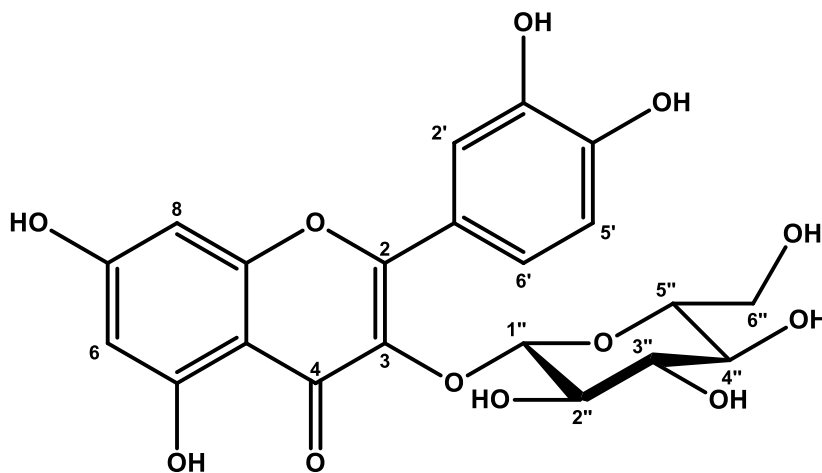


Figura 26: Flavonol glicosilado isolado da *A. tomentosa*, Isoquercetrina.

Flavonoides são muito conhecidos por seus efeitos benéficos na pressão arterial e na vasodilatação dos músculos do sistema vascular. A presença de tal classe fitoquímica explicaria o efeito de relaxamento dos vasos observados no item 5.1.2, uma vez que em estudos feitos em ratos com alimentos ricos em flavonoides pode-se constatar que estes efeitos eram observados devido a capacidade deste

grupo de promover a liberação de óxido nítrico pelo endotélio vascular (MINETTO, 2009).

Apenas alguns grupos de flavonoides foram encontrados e relatados em pteridófitas, são eles os flavonois, flavonas, flavanonas e glicosilflavonas. Destes, dentro do grupo dos flavonois, podemos encontrar o kanferol e a quercetina (PINTO *apud* WALLACE; PINTO *apud* BLANCH, 2011).

A isoquercitrina, o flavonol identificado da fração ATAcF10, é uma substância que apresenta boa solubilidade e alta absorção pelo trato gastrointestinal, encontrada em várias plantas comestíveis e medicinais (CHANG *et al.*, 2006).

Vários estudos relatam as atividades cardiovasculares promovidas por flavonoides. Um estudo recente da Isoquercitrina, de Junior *et al.* (2010), diz que este polifenol é capaz de promover efeito hipotensor, diurético e antioxidante. Sua resposta diurética tem como característica principal um efeito natriurético e poupador de potássio, aparentando depender da inibição da ECA e do metabolismo da bradicina, tendo como consequência a redução dos níveis de aldosterona, menor atividade da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ e liberação de prostaglandinas e NO endotelial. As respostas hipotensivas também possuem como característica um efeito relacionado com a inibição da ECA e a ativação da via NO/guanilato ciclase. E o efeito antioxidante é devido a capacidade desta substância em aumentar a disponibilidade de NO corporal acarretando na redução de espécies reativas de oxigênio.

Muitos estudos narram sobre os benefícios cardiovasculares da isoquercitrina, que envolvem ação ateroprotetora, anti-hipertensiva, antiplaquetária e inibidora da ECA. Com base nisto, é provável que esta substância fenólica contribua para a atividade vasodilatadora da espécie vegetal.

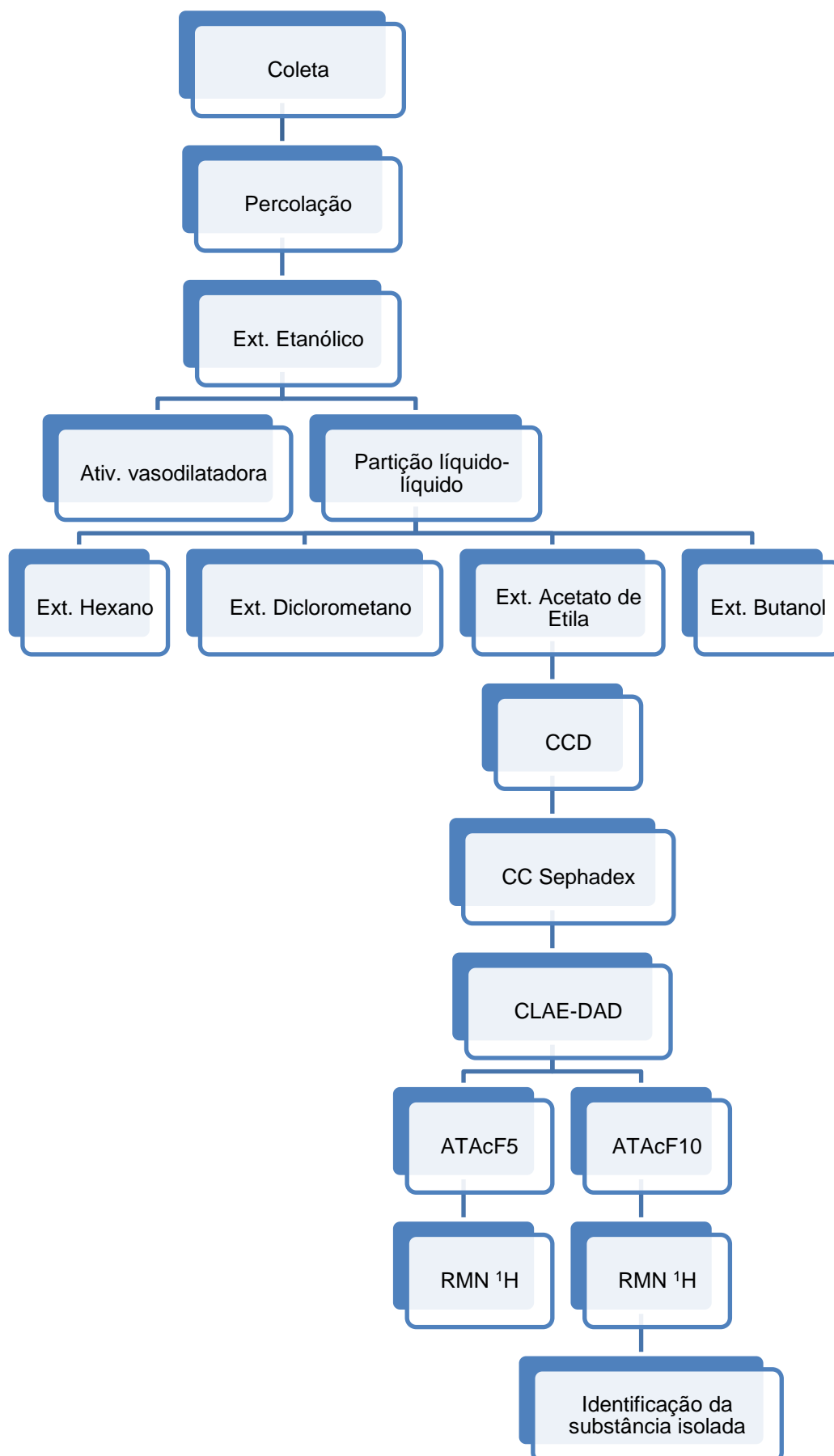


Figura 27: Fluxo da coleta à identificação da substância do extrato acetato de etila

6 Conclusão

Testes preliminares indicaram que o extrato etanólico da espécie *A. tomentosa* apresentou atividade cardiovascular. Assim como esse extrato, as frações de acetato de etila e a butanólica, apresentaram semelhante atividade, na mesma concentração, motivo para o qual deu-se continuidade ao estudo com apenas esses extratos.

Das frações que se apresentavam isoladas ou parcialmente isoladas, em CCD conseguiu-se identificar a presença de substâncias glicosiladas e em CLAE constatou-se a possível presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas, uma vez que os máximos de absorção observados no UV estavam dentro da faixa esperada para os mesmos. Com a análise das frações por RMN ^1H podemos caracterizar uma das substâncias como sendo um flavonol glicosilado, a Isoquercitrina, uma substância fenólica ainda não relatada para espécie *A. tomentosa*, mas com efeitos vasodilatadores já estudados em literatura, como efeitos diuréticos, hipotensivo e antioxidante.

Diante disso, podemos dizer que o trabalho foi satisfatório, uma vez que conseguimos alcançar os objetivos propostos no início do projeto de isolar e identificar uma substância derivada de uma fração ativa. E como perspectiva tem-se em vista a caracterização das demais substâncias isoladas e a avaliação das mesmas para a atividade vasodilatadora.

Referência Bibliográfica

1. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 10 de 09 de março de 2010**. Regulamento sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências.
2. BHAT, S.V.; NAGASAMPAGI, A.B.; SIVAKUMAR, M. Phenolics, natural dyes and pigments. **Chemistry of Natural Products**. Springer: 2º ed., p.593-594, 2006.
3. CASARINO, J.E.; MYNSEN, C.M.; MESSIAS, M.C.T.B. Schizaeales no Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. V.32, n.4, p.737-748, out.-dez. 2009.
4. CORRÊA, J.B.; HECK, T.G.; GEHRKE, I.T.S. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de *Schinus lentiscifolius* March. **XXIV Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. 2016
5. DEMO, M.; OLIVA, M.M.; LOPEZ, M.L.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A. Antimicrobial Activity of Essential Oils Obtained from Aromatic Plants of Argentina. **Pharmaceutical Biology**. V.43, n.2, p. 129–134, 2005.
6. DUARTE, S.G.; ARAI, M.; WANDERLEY, M.D. Significado paleoambiental da família ANEMIACEAE no cretáceo do Brasil: Inferências a partir de dados palinológicos. **Revista do Instituto Geológico**. V.33, n.2, p.1-12, 2012.
7. FERREIRA, J.L.; MELO, E. de; NONATO, F.R. Schizaeales C. F. REDD (POLYPODIOPSISIDA) da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Tese de mestrado**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2009.
8. FIRMO, W.C.A; MENEZES, V.J.M de; PASSOS, C.E.C; DIAS, C.N; ALVES, L.P.L; DIAS, I.C.L; NETOS, M.S; OLEA, R.S.G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**. V. 18, n. Especial, p.90-95, 2011.
9. FRANÇA, I.S.X de; SOUZA, J.A de; BAPTISTA, R.S; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**. V.61, n.2, p201-2008, 2008.
10. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. **Revista Química Nova**. V. 30, n. 2, p374-381, 2007.

11. GOETZ, M.N.B; XAVIER, S.R.S. Anemiaceae LINK da Paraíba: Riqueza, distribuição geográfica, conservação e chave de identificação. **Pesquisas Botânica**. V.68, p.363-374, 2015.
12. JASCONE, C.E.S; SANTOS, M.G. As espécies de Anemia citadas para o Estado do Rio de Janeiro na Flora Brasiliensis e Flora Fluminensis. **56º Congresso Nacional de Botânica**. 2005.
13. JULIANI, H. R.; ZYGLADO, J. A.; SCRIVANTI, R.; SOTA, E.; SIMON, J. E. The essential oil of Anemia tomentosa (Savigny) Sw. var. anthriscifolia (Schard.) Mickel. **Flavour and Fragrance Journal**. V.19, P.541-543, 2004.
14. JUNIOR, A.G.; MARQUES, M.C.A; KASSUYA, C.A.L. Avaliação fitoquímica e farmacológica dos efeitos cardiovasculares e renais de *Tropaeolum majus* L. (TROPAEOLACEAE) em ratos. Tese de pós-graduação. Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2010.
15. JUNIOR, V.F.V; PINTO, A.C; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: cura segura? **Revista Química Nova**. V. 28, n. 3, p.519-528, 2005.
16. KAZUMA, K; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of Clitoria ternatea. *Phytochemistry*. V.62, p. 229–237, 2003.
17. LOPES, G.A.D; FELICIANO, L.M; DINIZ, R.E.S; ALVES, M.J.Q.F. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência Extensão**. V.6, n.2, p.143-155, 2010.
18. LOPEZ, L.O; MORAES, E.D. Tratamento não medicamentoso para hipertensão arterial. Disponível em: <https://www.inesul.edu.br/revista_saude/arquivos/arq-idvol_10_1339682941.pdf> Acessado em: 18/08/2016
19. LOUSÃ, M; MONTEIRO, A; SANTO, D.E; SOUSA, E; COSTA, J.C. Módulo de Botânica. **Manual de Teóricas e Práticas**. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, 2007.
20. MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. V. 27, n.1/2, p.33-39, 2008.
21. MARTINEZ, G. J. Recolección y Comercialización de Plantas Medicinales en el Departamento Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina. **Acta Farm. Bonaerense**. V. 24, n.4, p. 575-84, 2005.

22. MATA, N.D.S da; CARVALHO, J.C.T; SOUSA, R.S. Participação da mulher Waiãpi no uso tradicional de plantas medicinais. **Tese de mestrado**. Universidade Federal do Amapá, 2009.
23. MAZIERO, M.T.; BERSOT, L.S. *Bacillus cereus* em produtos lácteos – Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. V.66, n.381, p. 5-12, Julho-Agosto 2011.
24. MELLO, L.C.N; SALINO, A. Pteridófitas de duas áreas de floresta da Bacia do Rio Doce no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**. V.3, n.2, p.129-139, 2002.
25. MICKEL, J.T. ANEMACEAE Link. In: Flora of North America. Editorial Committee. Flora of North America. New York, V.2, p. 117-118, 1993.
26. MINETTO, N.C. Flavonoides na doença cardiovascular. **Revista Alimentação Humana**. V.15, n.3, p.61-65, 2009.
27. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hipertensão Arterial Sistêmica. **Caderno de Atenção Básica**. Brasília, 2006.
28. PASSOS, V.M.A; ASSIS, T.D; BARRETO, S.M. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. V.15, n.1, p.36-45, 2006.
29. PERES, L.E.P. Metabolismo secundário das plantas. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>> Acessado em: 21/09/16
30. PINTO, F.P; LUCHESE, A.M; UETANABARO, A.P.T; NONATO, F.R. Atividade antimicrobiana, antioxidante e composição química de espécies do gênero *Blechnum* da mata Atlântica baiana. **Tese de mestrado**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.
31. PINTO, S.C.; OLIVEIRA, D.R; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LEITÃO S.G. Caracterização química do óleo essencial de uma pteridófitas aromática: *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. **30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2007.
32. PINTO, S.C.; LEITÃO, G.G.; OLIVEIRA, D.R; BIZZO, H.R.; RAMOS, D.F.; COELHO, T.S.; SILVA, P.E.A.; LOURENÇO, M.C.S; LEITÃO S.G. Chemical Composition and Antimycobacterial Activity of the Essential Oil from *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. **Natural Product Communications**. V.4, n.12, p. 1675-1678, out. 2009.

33. SAKAGAMI, C.R; EVANGELISTA, P.H.L. Levantamento florístico das espécies de Schizaeaceae KAULF. (PTERIDOPHYTA) no Paraná. **Monografia**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
34. SANTOS, M.G.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, E.S; KELECOM, A. Isoafricanol, um sesquiterpeno incomum encontrado na Pteridófito *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. **Revista brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, V.8, n.4, p. 71-75, 2006.
35. SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Tratar Pressão Alta é um ato de Fé na vida. **Cartilha educativa**. 2008.
36. SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN,G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Óleos Voláteis. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: 4º ed., p.397-426, 2002.
37. SOUZA, K.R.M.S. de; BARROS, I.C.L; ALVES, G.D. Fenologia de *Anemia tomentosa* (Sav.) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrad.) Mickel em Fragmento de Floresta Semidecídua, Nazaré da Mata, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, V. 5, supl. 2, p. 486-488, jul. 2007.
38. TEIXEIRA, K.; AMARAL, P.A. Plantas medicinais que podem causar alteração na pressão arterial e interação com anti-hipertensivos. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 2011
39. WAGNER, H.; BLADT, S. Natural Products Reagents. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Heidelberg: 2º ed., p. 197, 1996.