

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MYLENA DE FRANÇA MARTINS

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DA
ESPÉCIE VEGETAL *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek POR ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE *FOURIER* E
ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

PONTA GROSSA

2020

MYLENA DE FRANÇA MARTINS

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DA
ESPÉCIE VEGETAL *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek POR ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE *FOURIER* E
ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de Concentração Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Andressa Novatski
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2020

M386 Martins, Mylena de França
Caracterização fitoquímica dos compostos orgânicos da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek por espectroscopia no infravermelho com transformada de *fourier* e espectroscopia fotoacústica / Mylena de França Martins. Ponta Grossa, 2020.
80 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Andressa Novatski.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Espinheira-santa. 2. Citronella gongonha. 3. Adulterantes. 4. Campos Gerais. 5. Taninos totais. I. Novatski, Andressa. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 615

MYLENA DE FRANÇA MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DA
ESPÉCIE VEGETAL MAYTENEUS ILICIFOLIA MART. EX REISSEK POR
ESPECTROSCOPIA DE FOURIER E ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

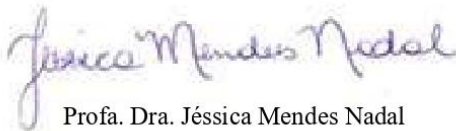
Ponta Grossa, 14 de outubro de 2020.



Profa. Dra. Andressa Novatski – Orientadora
Doutora em Física
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Daniele Toniolo Dias Ferreira Rosa
Doutora em Física
Universidade Federal do Paraná



Profa. Dra. Jéssica Mendes Nadal
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico a Professora Dr^a Marina Luiza Gaspar Wisniewski pelo incentivo e exemplo, ao meu Avô Adacir (*in memoriam*) pelo apoio e ao meu Pai Alexandre minha maior inspiração na vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me presenteado com o dom da vida e por me ajudar nos obstáculos encontrados durante o curso.

Em especial, à orientadora Professora Dr^a Andressa Novatski primeiramente por ser uma excelente Professora, ter sido atenciosa e paciente durante toda a pesquisa, agradeço pela aprendizagem. Ao Coorientador Professor Dr. Paulo Vitor Farago pelo apoio e conhecimento prestado.

Agradeço à Professora Dr^a Daniele Toniolo Dias e à discente do doutorado Rosiane Antunes dos Santos que foram muito atenciosas em me auxiliar nos testes de espectroscopia de fotoacústica.

Agradeço à Professora Dr^a Jane Manfron Budel, Professora Dr^a Jéssica Mendes Nadal pelo conhecimento prestado e também à discente do Mestrado Luciane Mendes Monteiro pela paciência e auxílio prestado nos testes de análise no laboratório de Farmacognosia.

Agradeço ao discente de graduação João Roik e à discente do doutorado Jaqueline Valeski Gunha pelo auxílio nos testes realizados na pesquisa. Ao Professor Dr. Aloisi Somer e ao grupo de pesquisa Grupo de Espectroscopia Óptica e Fotoacústica de Materiais (GEOFA) pelo auxílio.

Ao pessoal do C-LABMU em especial ao Dr. Silvio Henrique Gonsalves pelo auxílio e realização dos testes de FTIR.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia por ceder o laboratório de preparo amostras.

À Professora Dr^a Traudi Klein pela paciência e ensino na realização dos testes.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, em especial ao Professor Dr. Bruno Pedroso pela atenção e aprendizado.

Aos Professores do Departamento de Economia, em especial, Professores: Dr^a Marina, Dr. Vinicius, Dr^a Luma, Dr. Luiz Philippe, Dr. Márcio, Dr^a Augusta e Dr. Alysson pelo auxílio.

Ao pessoal que me cedeu as amostras: discentes da Agronomia Isabela e Lucas, meus tios Casemiro (*in memoriam*) e Isaura, ao Me. Gustavo Morais Viechnieski além da amostra pelo auxílio também, ao Me. Maghnom Henrique Melo pela amostra e por todo apoio e auxílio prestado. Ao Sr. Ademir Moreira e ao Horto Botânico.

Ao meu amigo João Paulo Gonçalves de Andrade por todo apoio e auxílio.

Ao discente do Doutorado Guilherme Arcaro pelo auxílio. Ao Professor Dr. Flávio Luís Beltrame pelo material cedido. À discente do Doutorado Mariana Nascimento de Paula da Universidade Estadual de Maringá pelo material cedido.

À minha mãe Adalgisa, meu irmão Alexandre e cunhada Letícia pelo incentivo e por estarem ao meu lado sempre me dando forças durante a pesquisa.

Aos meus colegas do Mestrado, em especial Paola e Juliana que me auxiliaram durante o curso.

Aos meus amigos e ouvintes durante todo o Mestrado, que me incentivaram e apoiaram: Maria Jucilene, Lucelaine, Ângela, Tamires, Alyne, Paola, Reni, Tatiane, Márcia, Suely e Gileade.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas e com certeza sem elas, esta pesquisa não seria realizada.

Reavive a cada momento a sua confiança
em Deus e mais ainda na hora das
provações.

(São Padre Pio de Pietrelcina)

RESUMO

A *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, conhecida popularmente como espinheira-santa, faz parte da família *Celastraceae*. Esta planta é utilizada para fins medicinais, devido aos metabólitos secundários como a presença de terpenos, taninos, ácidos fenólicos e flavonoides. Existem espécies semelhantes a espinheira-santa e são utilizadas como adulterantes, como é o caso da *Citronella gongonha*. Devido ao interesse farmacológico, o presente estudo visou caracterizar a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* por espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* e espectroscopia fotoacústica, utilizou-se na pesquisa uma amostra adulterante de *Citronella gongonha* para fins comparativos. Após a aquisição das amostras, sendo seis comerciais e sete coletadas incluindo a adulterante em locais diferentes na região dos Campos Gerais, as folhas foram desidratadas e transformadas em pó para serem analisadas. Com as amostras em pó, foi realizada a análise físico-química por meio de determinação de cinzas totais e determinação de umidade das amostras de espinheira-santa verdadeira. Realizou-se a determinação de taninos totais. A avaliação espectroscópica foi feita por infravermelho com transformada de *Fourier*, efetuadas dez medidas em cada amostra com intervalo de sete dias entre elas. A partir dos espectros, foram determinados os componentes principais. Realizou-se nas amostras a avaliação por espectroscopia fotoacústica. A análise dos componentes principais permitiu a discriminação entre as amostras coletadas e comerciais em função de diferentes quantidades de compostos químicos. O emprego da espectroscopia fotoacústica resultou em bandas de absorção centradas em 280, 350, 440 e 560 nm para as amostras coletadas estas bandas apresentaram maior resolução espectral, para as comerciais ocorre um alargamento destas bandas, demonstrando diferenciação entre os dois conjuntos. Por fim, todas as metodologias utilizadas conseguiram identificar características das amostras, podendo ser realizada a diferenciação, além de mostrar ferramentas alternativas precisa, não sendo necessário um preparo minucioso e de relação custo-benefício apropriada no controle de qualidade da *Maytenus ilicifolia*.

Palavras-chave: Espinheira-santa. *Citronella gongonha*. Adulterante. Campos Gerais, Taninos totais.

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, popularly known as "espinheira-santa" or holythorn, is part of the *Celastraceae* family. This plant is used for medicinal purposes due to its secondary metabolites, including terpenes, tannins, phenolic acids and flavonoids. Species similar to the holythorn are used as adulterants, as is the case of *Citronella gongonha*. Due to the pharmacological interest, the objective of this study was to characterize the plant species *Maytenus ilicifolia* through Fourier transform infrared spectroscopy and photoacoustic spectroscopy. An adulterant sample of *Citronella gongonha* was used for comparative purposes. Six of the samples were acquired commercially and seven were collected in different places of the Campos Gerais region, including the adulterant, after which the leaves were dehydrated and transformed into powder to be analyzed. The physical-chemical analysis was performed on the powder samples by determining total ashes and the humidity of the true holythorn samples. Total tannins were also determined. The spectroscopic evaluation was done through Fourier transform infrared. Ten measurements were taken in each sample with seven-day intervals between them. The spectra were used to determine the main components. The samples were also evaluated by photoacoustic spectroscopy. The analysis of the main components allowed for the discrimination of holythorn from between the collected and commercial samples according to different quantities of the chemical compounds. The use of the photoacoustic spectroscopy resulted in absorption bands centered at 280, 350, 440 and 560 nm for the collected samples. These bands presented higher spectral resolution. In the commercial samples, a widening of these bands occurs, revealing a differentiation between the two sets. In the end, all the methodologies used were able to identify characteristics of the samples, enabling their differentiation and revealing themselves to be precise alternative tools, with a thorough preparation and appropriate cost-benefit analysis not being necessary in the quality control of *Maytenus ilicifolia*.

Keywords: Holythorn. *Citronella gongonha*. Adulterant. Campos Gerais. Total tannins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Folhas da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek conhecida como espinheira-santa devido a esse formato de suas folhas e suas propriedades medicinais22
- Figura 2 – Floração característica da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*, amostras da região de Ponta Grossa – PR23
- Figura 3 – Frutos característicos da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*, amostras da região de Piraí do Sul - PR23
- Figura 4 – A figura A refere a uma amostra de espinheira-santa verdadeira (*Maytenus ilicifolia*) a figura B uma amostra de espinheira-falsa (*Sorocea bonplandii*) apresentando características para diferenciação de espécie em relação a distância das nervuras, sua coloração e o padrão de venação24
- Figura 5 – Folhas da espécie vegetal *Citronella gongonha* apresentando características similares a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*25
- Figura 6 –Ciclo simplificado dos metabólitos secundários que a partir da fotossíntese resulta na formação da glicose constituindo os principais metabólitos que ocorrem também na espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek.....26
- Figura 7 – Estrutura básica de flavonoides formado por compostos tricíclicos que possui dois anéis aromáticos (A e B), o C contém o grupamento pirona, o A possui benzol, o B possui cinamoil27

Figura 8 – Sistema de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de <i>Fourier</i> e seus principais componentes que são: a fonte, divisores de feixe, a amostra o detector, computador para gerar o espectro da amostra analisada	31
Figura 9 – Modelo do experimento fotoacústico – Fotofone de Alexander Graham Bell, que estava testando o aparelho quando descobriu o efeito fotoacústico	34
Figura 10 – Três classificações de uma dada amostra/ absorção óptica que pode receber em termo de comprimento de absorção a amostra opaca, absorvedora e transparente a partir de luz incidente	36
Figura 11 – Desenho experimental da pesquisa que foi dividida em obtenção e transformação das amostras, caracterização por FTIR e PAS e por fim avaliação por Componentes Principais	38
Figura 12 – (A) refere as estufas utilizadas para secagem das amostras coletadas, (B) o moinho de facas utilizado para cominuição e (C) amostra em forma de pó para ser utilizada nas análises	41
Figura 13 – Montagem experimental da técnica de fotoacústica utilizada no laboratório multiusuário de propriedades termo-ópticas (LAPTO) - UTFPR que consiste em uma fonte de radiação, o modulador mecânico, monocromador, filtros, lentes, microfone como detector	45
Figura 14 – Folha da espécie vegetal <i>Maytenus ilicifolia</i> com face abaxial em evidência, apresentando características da nervura e formato caracterizando a como espinheira-santa verdadeira da a11 col.....	46

Figura 15 - Extrato da amostra a1com (a) e amostra a11col (b) em contato com a gelatina, ambas demonstraram o aparecimento de precipitado e confirmaram a presença de taninos	50
Figura 16 - Extrato da amostra a4com (a) e da amostra a9col (b) em contato com acetato de cobre demonstrando o aparecimento de precipitado e confirmando a presença de taninos.....	50
Figura 17 - Extrato da amostra a2com (a) e da amostra a8col (b) em contato com acetato de chumbo (básico e ácido) demonstrando o aparecimento de precipitado esbranquiçado e confirmando a presença de taninos hidrolisáveis	51
Figura 18 - Espectro da região do infravermelho das treze amostras coletadas, sendo seis comerciais e sete coletadas, os picos na região de 677;1070;1233;1271;1321; 1522; 1618;1732 cm^{-1}	52
Figura 19 – <i>Scree plot</i> mostrando a variância representada por cada componente a partir do autovalor de origem. O ponto de inflexão determina o limite de componentes necessárias para representar os dados analisados	55
Figura 20 – <i>Scores</i> da PCA obtidas dos espectros de FTIR das medidas. No gráfico estão representados PC2xPC1 PC3Xpc1. São apresentadas as elipses de confiança em 95%	56
Figura 21 – <i>Loadings</i> das variáveis PC1, PC2 e PC3, sendo PC1 64,3%, PC2 16,1% e PC3 6,5%	57
Figura 22 – Sinal fotoacústico para as amostras comerciais (a) e coletadas (b) incluindo a amostra adulterante	59

Figura 23 – Ajustes gaussianos para as amostras (a) a1com e (b) a8col, sendo a (a) uma amostra comercial e a (b) uma amostra coletada.....	60
Figura 24 – Comportamento das áreas das gaussianas para as diferentes amostras de <i>Maytenus ilicifolia</i> e a amostra de <i>Citronella congonha</i>	61
Figura 25 – Exsicata depositada herbário UEPG – amostra coletada bairro Nossa Senhora das Graças do município de Ponta Grossa - PR – registro 22245 – amostra a13col	75
Figura 26 – Exsicata depositada herbário UEPG – amostra coletada no bairro Jardim Carvalho do município de Ponta Grossa - PR - registro 22246 – amostra a11col	76
Figura 27 – Exsicata depositada herbário UEPG - amostra coletada no bairro SAN MARTIN no município de Ponta Grossa – registro – 22248 – amostra a12col	77
Figura 28 – Exsicata depositada herbário UEPG – amostra coletada no município de Piraí do Sul - PR – registro – 22249 – amostra a8col	78
Figura 29 – Exsicata depositada herbário UEPG – amostra coletada no Horto Botânico do município de Ponta Grossa - PR – registro 22151 – amostra a9col	79
Figura 30 – Exsicata depositada herbário UEPG – amostra coletada no município de Castro - PR – registro 22153 – amostra a7col	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Localização das amostras coletadas nos três municípios coletados, no caso de Ponta Grossa foi colocado os bairros, por possuir mais pontos de coleta, apresentam as coordenadas.....39
- Tabela 2 – Nomenclatura das amostras, as seis primeiras levam a sigla com por serem comerciais, as coletadas, outras seis, a sigla col e a *Citronella gongonha* denominada como aCG40
- Tabela 3 – Determinação físico-química referente as folhas das doze amostras vegetais *Maytenus ilicifolia Mart ex Reissek* enquanto seu teor de umidade e cinzas totais (n=3).....48
- Tabela 4 – Relação das amostras e reagentes utilizados (Gelatina, Acetato de Cobre, Acetato básico de chumbo, acetato ácido de chumbo e o cloreto férrico para determinação de taninos totais, para verificar a precipitação em contato com os reagentes49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACP	Análise de Componentes Principais
ACG	Amostra de <i>Citronella gongonha</i>
C	Carbono
cm	Centímetro
com	Comercial
col	Coletada
CP	Componente Principal
C ² MMa	Centro de Caracterização Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de <i>Fourier</i>
H	Hidrogênio
HC	Hidrocarbonetos
Hz	<i>Hertz</i>
IR	<i>Infrared</i>
O	Oxigênio
OH	Hidroxila
LAPTO	Laboratório Multiusuário de Propriedades Termo-Ópticas
mg	Miligrama
min	Minuto
nm	Nanômetro
NH	Amida
Pa	Peso da Amostra
PAS	Espectroscopia Fotoacústica
PC	<i>Principal Component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
Pu	Peso Úmido (Cadinho + Amostra)
Ps	Peso Seco (Cadinho Após a Incineração)
RPM	Rotação por Minuto
UV VIS	Ultravioleta Visível
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Xe
μm

Xenônio
Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 ASPECTOS GERAIS	21
3.1.1 Família <i>Celastraceae</i>	21
3.1.2 Gênero <i>Maytenus</i>	21
3.1.3 Espécie <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart ex Reissek.....	21
3.2 ASPECTOS QUÍMICOS	25
3.2.1 Composição Química	25
3.2.1.1 Polifenóis ou compostos fenólicos	26
3.2.1.2 Flavonoides	27
3.2.1.3 Taninos.....	27
3.2.1.4 Terpenos	28
3.3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	28
3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIE VEGETAIS	30
3.4.1 <i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier</i>	30
3.4.1.1 Interpretação dos espectros	32
3.4.2 Quimiometria	32
3.4.3 <i>Espectroscopia Fotoacústica</i>	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL VEGETAL	37
4.2 REAGENTES	37
4.3 EQUIPAMENTOS.....	37
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL	38
4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.5.1 <i>Obtenção do Material Botânico</i>	39
4.5.2 Preparo das Amostras.....	40
4.6 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DAS FOLHAS PULVERIZADAS	41
4.6.1 <i>Determinação da Umidade (Perda por Dessecação)</i>	41

4.6.2 Determinação de Cinzas Totais	42
4.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DAS FOLHAS	42
4.7.1 Determinação de Taninos Totais.....	42
4.8.1 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	43
4.8.2 Análise por Componentes Principais (PCA)	43
4.8.3 Espectroscopia Fotoacústica (PAS)	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA	46
5.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	47
5.3 DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS.....	49
5.4 FTIR.....	52
5.4.1 Espectros de Absorção IR.....	52
5.5 PCA	54
5.6 PAS	58
6 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO A – EXSICATAS DAS AMOSTRAS COLETADAS	74

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o setor de fitoterápicos e plantas medicinais teve um crescimento mundial significativo. No Brasil, o marco para os fitoterápicos foi a Portaria nº 6, de 1995, a qual citava a necessidade de estudos que comprovassem sua toxicologia e eficiência. O Decreto nº 5.813, 22 de junho de 2006 se refere a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que possui como objetivo geral a garantia para população ao acesso às plantas medicinais e fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade e, considera o conhecimento tradicional sobre as plantas ^{1, 2, 3}.

Na busca por substâncias de origem vegetal que possuam efeito farmacológico, bem como tecnologias que auxiliem na identificação e diferenciação correta das mais diversas plantas medicinais, o investimento na pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias têm se tornado primordial.

Neste sentido, destaca-se a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* conhecida com os nomes populares: espinheira-santa, cancerosa, espinheira divina etc., a qual faz parte da família *Celastraceae*, uma das principais espécies de plantas medicinais brasileiras ⁴. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), no registro simplificado de fitoterápicos a menciona no Anexo I da RE 89 de 2004, substituída pela IN 5 de 2008 como planta medicinal para elaboração de medicamentos ⁵.

A espinheira-santa é utilizada para fins de problemas relacionados aos sistemas: digestivo, urinário e endócrino dando ênfase para o sistema digestivo e problemas gástricos ⁶. Suas folhas apresentam taninos e flavonoides ⁷.

A ausência de qualidade, a adulteração e a utilização incorreta interferem na eficácia e até mesmo na segurança do seu uso terapêutico. Por exemplo, algumas espécies morfológicamente parecidas com a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* e sem propriedades farmacológicas são: *Sorocea bonplandii* da família *Moraceae*, a *Zollernia ilicifolia* da família *Fabaceae* e *Citronella gongonha* da família *Cardiopteridaceae*. Portanto, essas espécies podem ser utilizadas como adulterante nos medicamentos à base da espinheira-santa ^{8, 9, 10}.

Dentre as técnicas empregadas para caracterização de espécies vegetais, existe a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de *Fourier* (FTIR do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) para identificação de compostos químicos ¹¹, considerada um método rápido, de baixo custo se torna uma opção para análise

de matéria-prima vegetal ¹², como estudos que comprovam a finalidade de diferenciação de espécie, discriminação precisa da origem da amostra vegetal ¹³, servindo também para controle de qualidade ¹⁴ e a diferenciação no quesito de adulteração de amostras ¹⁵. A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de *Fourier* pode ser usada com a análise multivariada por componentes principais, por ser uma análise mais rápida e econômica e garantir autenticidade e segurança, devido as análises químicas serem mais trabalhosas e demoradas ^{16, 17}.

A Espectroscopia Fotoacústica (*PAS do inglês Photoacoustic Spectroscopy*) é um método não destrutivo e adequado para amostras com alta dispersão e absorção de luz, como exemplo as folhas de uma espécie vegetal ¹⁸ e importante por ser “possível identificar diferentes polifenóis em misturas em pó, independentemente do uso de solventes ¹⁹.

Desta forma, a partir dos métodos de caracterização mencionados e utilizando a análise multivariada por componentes principais, o propósito deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica dos compostos orgânicos da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss* comparando com a amostra adulterante *Citronella gongonha*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek por espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* e espectroscopia fotoacústica comparando com a amostra adulterante *Citronella gongonha*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter amostras comerciais (folhas desidratadas) da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek provenientes de seis fornecedores idôneos e seis amostras coletadas a partir de diferentes localidades no estado do Paraná;
- Comparar com a amostra de espécie vegetal adulterante *Citronella congonha*;
- Transformar as folhas desidratadas em pó por meio do aparelho moinho de facas;
- Realizar análise físico-química das amostras por determinação de umidade por dessecação e determinação de cinzas totais;
- Realizar determinação de taninos totais;
- Avaliar as amostras obtidas por espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier*;
- Avaliar as amostras obtidas por espectroscopia fotoacústica;
- Aplicar análise multivariada por componentes principais associados a dados espectroscópicos para análise das amostras de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS

3.1.1 Família *Celastraceae*

A família *Celastraceae* compreende a 98 gêneros e 1221 espécies ²⁰ distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo e poucas em região temperada ²¹. Possui espécies que apresentam potencial medicinal utilizado pela população ²².

A família apresenta árvores, arbustos eretos ou escandentados, cipós, sempre-verdes ou caducifólias; hastes produzindo radículas ou às vezes espinhosas e raramente troncos reforçados ²³.

3.1.2 Gênero *Maytenus*

Os gêneros mais estudados da família *Celastraceae* são: *Maytenus* e *Austroplenckia* ²². O nome do gênero se origina de *Maytén*, nome de uma planta que é utilizada pelos Mapuches, no Chile ²⁴. Compreende aproximadamente 80 espécies distribuídas no Brasil ²⁵ sendo que uma das plantas utilizadas do gênero *Maytenus*, no Brasil, é conhecida como “espinheira-santa”, cujo nome científico é *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss ²².

3.1.3 Espécie *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek

A classificação taxonômica da *Maytenus ilicifolia* é: Divisão: *Angiospermae*, Classe: *Dicotyledoneae*, Subclasse: *Archichlamydeae*, Ordem: *Celastrales*, família *Celastraceae*, gênero *Maytenus*, espécie: *Maytenus ilicifolia* ²⁶.

Dentro da família *Celastraceae*, existe a espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek conhecida como espinheira-santa, nome devido ao formato de suas folhas e suas propriedades medicinais, a planta também pode receber os seguintes nomes: cancorosa no Paraná e como espinheira-divina, erva cancorosa, erva-santa no Rio Grande do Sul²⁷. A Figura 1, apresenta as folhas da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek.

Figura 1 – Folhas da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek conhecida como espinheira-santa devido a esse formato de suas folhas e suas propriedades medicinais



Fonte: O autor

Utilizada na medicina tradicional desde meados da década de 1920, possui um alto poder medicinal²⁸. Ela é encontrada predominantemente na região sul do Brasil, interior de matas nativas e em ciliares, tem preferência por solos argilosos, bem drenados e alto teor de matéria orgânica, clima temperado e subtropical, marcador taxonômico da espécie é a característica dos ramos apresentarem estrias longitudinal²⁹. A Farmacopeia Brasileira³⁰ apresenta os aspectos morfoanatômicos e o controle de qualidade da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

As folhas são congestas, coriáceas e glabras com pecíolo com 0,2 a 0,5 cm de comprimento. As estípulas inconspícuas, o limbo com 2,2 a 8,9 cm de comprimento e 1,1-3,0 cm de largura. As nervuras proeminentes na face abaxial; forma elíptica ou estreitamente elíptica; base aguda a obtusa; ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado. A margem inteira ou com espinhos em número de um a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, na maioria das vezes concentrados na metade

apical de um ou de ambos semi-limbos. O fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho alaranjada ³¹, a Figura 2 e 3 representam respectivamente, a floração e frutos característicos da espécie.

Figura 2 – Floração característica da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*, amostras da região de Ponta Grossa – PR



Fonte: O autor

Figura 3 – Frutos característicos da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*, amostras da região de Pirai do Sul - PR



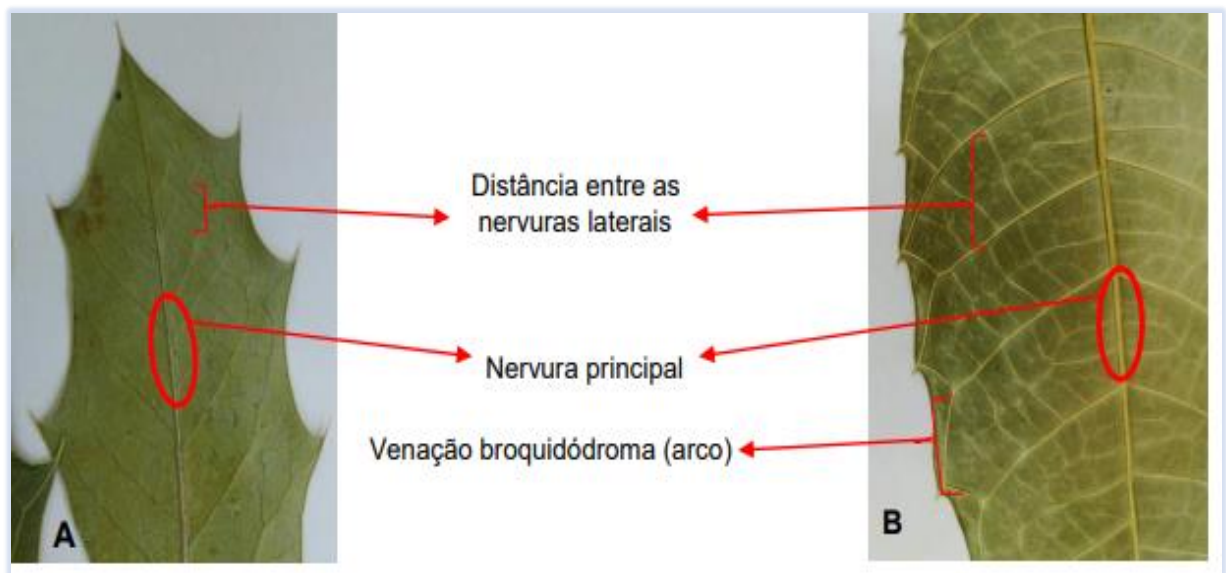
Fonte: O autor

As características da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* para distinção entre outras espécies: caule ovalado com três ou mais saliências, cada uma constituída por um grupo de fibras envolvidas por bainha de células parenquimáticas aclorofiladas, pecíolo em secção transversal dorsiventral com braquiesclereídeos na região cortical.

O sistema vascular é representado por um feixe colateral e na folha a nervura principal é proeminente na face abaxial ³².

Existem espécies morfológicamente parecidas com a espécie *Maytenus ilicifolia* porém não possui propriedades farmacológicas como, por exemplo, *Sorocea bonplandii* da família *Moraceae*, a *Zollernia ilicifolia* da família *Fabaceae* e *Citronella gongonha* família *Cardiopteridaceae*, as espécies podem ser utilizadas como adulterante nos medicamentos à base da espinheira-santa ^{8,9,10}. A Figura 4 apresenta a diferença das folhas de uma espécie de *Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*, em relação a distância entre as nervuras, coloração das nervuras e padrão de venação.

Figura 4 – A figura A refere a uma amostra de espinheira-santa verdadeira (*Maytenus ilicifolia*) a figura B uma amostra de espinheira-falsa (*Sorocea bonplandii*) apresentando características para diferenciação de espécie em relação a distância das nervuras, sua coloração e o padrão de venação



Fonte: ³³

A espécie vegetal *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard faz parte da família *Cardiopteridaceae*, conhecida como: congonha-do-sertão, laranjeira-do-banhado, erva-de-anta, tem semelhança com a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*, sendo utilizada como adulterante ^{10,34}.

Na Figura 5 observa-se as folhas da espécie vegetal *Citronella gongonha*.

Figura 5 - Folhas da espécie vegetal *Citronella gongonha* apresentando características similares a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*



Fonte: ³⁵

3.2 ASPECTOS QUÍMICOS

3.2.1 Composição Química

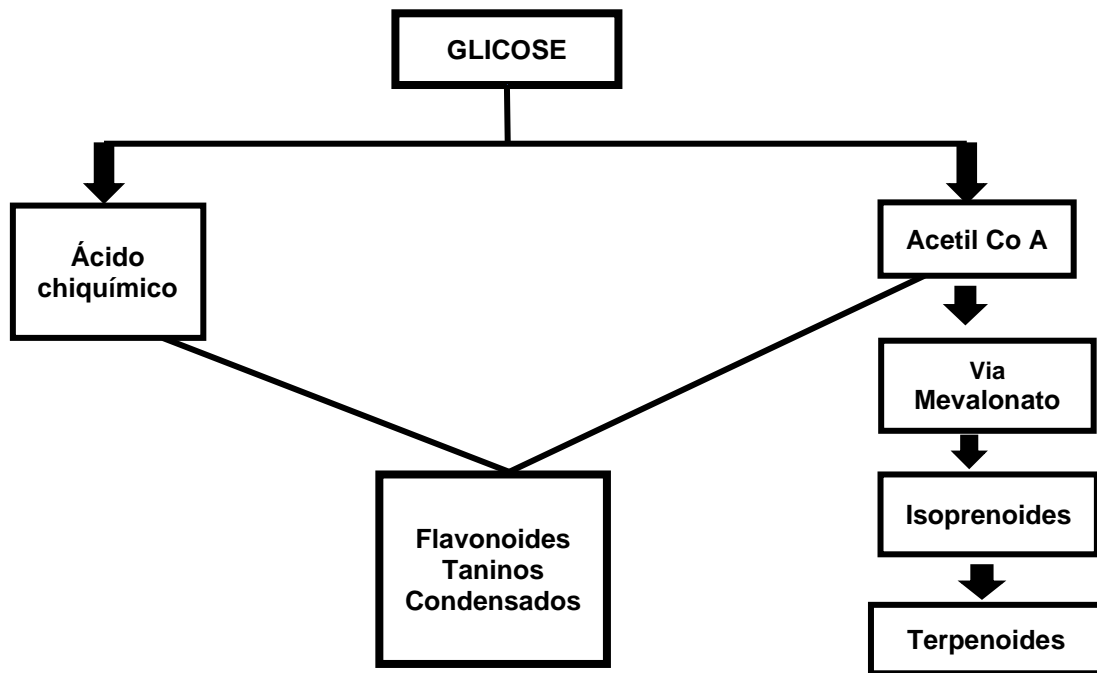
Lima e colaboradores investigaram a composição fitoquímica da *Maytenus spp.*³⁶ e encontraram a presença de: terpenoides, taninos, alcaloides, flavonoides e outros sendo estes resultados confirmados por estudos posteriores ³⁷. Ainda são relatados metabólitos secundários encontrados na espinheira-santa, tais como: os terpenos (maitenina, tringenona, isotenginona II, congorosinas A e B, ácido maitenóico), os triterpenos (friedelanol e friedelina), óleos essenciais (friedenelol), taninos, principalmente os gálicos (epicatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina), glicolípídeos monogalactosildiácilglicerol, digalactosildiácilglicerol, trigalactosildiácilglicerol, tetragalactosildiácilglicerol e sulfoquinovosildiácilglicerol e, por último, os alcaloides (maiteina, maitanprina e maitensina) ^{37, 38}.

Além dos citados acima, Ohsaki e colaboradores em 2004 identificaram mais quatro triterpenos na espécie vegetal *Maytenus ilicifolia*, denominados por eles de maytefolinas A, B e C e uvaol-3-cafeato ³⁹.

Os compostos com ação bioativa são produzidos por meio da biossíntese dos metabólitos secundários, a partir da fotossíntese que resulta na formação da

glicose constituindo os principais metabólitos, como os taninos, flavonoides e terpenos ⁴⁰. A Figura 6 demonstra essa formação dos principais metabólitos da espinheira-santa.

Figura 6 –Ciclo simplificado dos metabólitos secundários que a partir da fotossíntese resulta na formação da glicose constituindo os principais metabólitos que ocorrem também na espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek



Fonte:⁴⁰

3.2.1.1 Polifenóis ou compostos fenólicos

Os polifenóis são formados a partir de uma estrutura básica de benzeno com uma ligação de hidroxila e constituem um dos grupos amplamente distribuídos de substâncias fitoquímicas do reino vegetal, principalmente na forma de subprodutos gerados a partir do metabolismo das plantas. ^{41, 42, 43}.

No final do século XX, os estudos epidemiológicos sugeriram fortemente que o consumo de dietas ricas em polifenóis vegetais oferecia algum tipo de proteção contra o desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças neurodegenerativas, por isso o interesse científico sobre os compostos polifenólicos para a saúde humana ⁴⁴.

Existe uma grande variedade de polifenóis vegetais incluindo ácidos cinâmicos, flavonoides, proantocianidinas, estilbenos, lignanas e ligninas ⁴⁵.

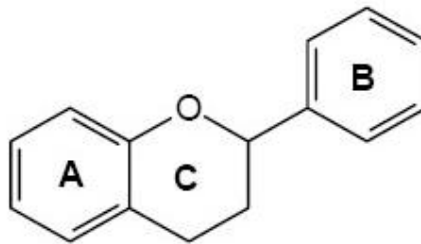
Em relação a *Maytenus ilicifolia*, na literatura encontra-se a determinação de polifenóis totais ⁴⁶, a partir da determinação de taninos ⁴⁷ flavonoides ⁴⁸, compostos polifenólicos, tais como quercetina e kaempferol ⁴⁹.

3.2.1.2 Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos que demonstram uma ampla gama de substâncias bioquímicas e efeitos farmacológicos ⁵⁰. Na Figura 7 é possível observar como é a estrutura básica dos flavonoides.

Na espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* foram identificados: os flavonóis, ácidos fenólicos e as catequinas que são importantes pela atividade antioxidante e atividade anticancerígena ^{51, 52, 53}.

Figura 7 – Estrutura básica de flavonoides formado por compostos tricíclicos que possui dois anéis aromáticos (A e B), o C contém o grupamento pirona, o A possui benzol, o B possui cinamoil



Fonte:⁵⁴

3.2.1.3 Taninos

A importância dos taninos nas plantas está na sua eficácia como repelentes aos predadores (animais ou microbianos), a propriedade química relevante é a "adstringência" ⁵⁵. Os taninos são classificados conforme sua estrutura química: taninos hidrolisáveis e taninos condensados ⁵⁶.

Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos ⁵⁷.

Os taninos condensados também conhecidos como proantocianidinas são formados por polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol ⁵⁷.

Os diferentes grupos possuem diferentes reatividades ⁵⁶. As proantocianidinas, por exemplo, podem exercer efeitos em organismos devido à sua capacidade de complexar com proteínas ⁵⁸.

Em relação a propriedade biológica dos taninos eles se referem: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e a habilidade de se complexar com outras moléculas, incluindo as macromoléculas ⁵⁹.

3.2.1.4 Terpenos

Um dos componentes que constituem a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* são os terpenos, formados por uma dupla ligação carbono-carbono considerado como um hidrocarboneto insaturado ⁶⁰. O interesse pelos terpenos, além de suas atividades antimicrobianas e mecanismo de defesa, eles são uma das maiores classes de metabólitos com valor comercial na indústria cosmética e farmacêutica ^{60, 61}.

Os terpenos fazem parte da constituição de óleos essenciais (resultante) do metabolismo secundário das plantas), possuem propriedades antimicrobianas e são utilizados como fontes de compostos antimicrobianos, com a finalidade de ser uma alternativa para a preservação de alimentos e também utilizado como adjuvante no tratamento de doenças infecciosas ^{62, 63}.

3.3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

A espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss pela presença de taninos, flavonoides, terpenos possui atividades farmacológicas, como por exemplo, atividade citotóxica contra células cancerígenas ⁶⁴, atividade antiulcerogênica ⁶⁵ ação contra gastrite e úlcera péptica ³⁷.

Para o caso de úlceras, os efeitos protetores desta planta foram comparados ao efeito da cimetidina ⁶⁶. A infusão preparada com água e folhas da espinheira-santa causa aumento no volume do pH do suco gástrico com o efeito comparável com a cimetidina ⁶⁷. Sendo este efeito atribuído aos compostos triterpênicos friedelina e friedelanol isolados ^{68,69}. A utilização de extrato seco da planta produzido por “*spray-*

dryer” demonstram uma atividade ativa contra úlceras, ocorrendo uma desinstalação de 77% da superfície lesionada ⁷⁰.

O efeito antibacteriano contra *Helicobacter pylori* e o efeito terapêutico contra lesão da mucosa gástrica induzida de catequinas presentes na espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* foram evidenciados por Alves e colaboradores ⁷¹.

A ação antimicrobiana da *Maytenus ilicifolia* foi relatada por Lima e colaboradores os quais demonstraram eficácia contra patógenos como o *Staphylococcus aureus* *Streptococcus* sp. da maitenina extraída da planta ³⁶.

Alves e colaboradores ⁷² demonstraram que os taninos gálicos podem inibir o crescimento de bactérias por modificar a permeabilidade da parede celular. Foi preparado extratos etanólicos a partir de folhas frescas testaram as bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus* sp.(Isolado clínico), meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (Isolado clínico) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 00039); e oito bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella flexneri* (ATCC 12022323A), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) ⁷².

Os extratos secos apresentaram atividade contra todas as bactérias supracitadas, sendo que a *Klebsiella pneumonia* foi o primeiro estudo que descreve a ação da espinheira-santa sobre este microorganismo ⁷². Foi testado a matentenina e pristimerina para o tratamento de fungos e essas mostraram uma potente atividade antifúngica ⁷³.

O poder antioxidante das plantas se refere a presença de substâncias capazes de inibir os radicais livres ⁷⁴. A definição de antioxidante “ é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”⁷⁵. Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos as biomoléculas e afetar a saúde humana ⁷⁶.

Em relação a espinheira-santa, foi observada uma boa atividade antioxidante sendo o controle da temperatura para secagem das folhas, um dos fatores predominantes para sua eficiência terapêutica ⁷⁷.

3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIE VEGETAIS

Em relação a avaliação apenas por análise anatômica ou microquímica mostrou-se propensa a resultados enganosos, porque as amostras pertencentes à mesma espécie podem desenvolver resultados diferentes nos ensaios microquímicos, com isso a necessidade de outros métodos de caracterização para controle de qualidade da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* ⁷⁸.

3.4.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de *Fourier*

Um método de caracterização, a espectroscopia no infravermelho vem sendo usada em pesquisas de autenticidade de alimentos, compostos ⁷⁹. É simples, rápida e não destrutiva, serve como uma ferramenta potencial para detectar uma adulteração econômica ou também para análises de rotina, se forem estabelecidos procedimentos adequados de calibração e validação com os protocolos de aquisição de dados ⁸⁰.

O espectro de infravermelho é característico de uma molécula como um todo, alguns grupos originam as bandas que ocorrem aproximadamente na mesma frequência independente de sua estrutura, a identificação de estruturas se dá pela presença destas bandas características ⁸¹.

A absorção na região do infravermelho é associada a campos de energia de vibração molecular, as vibrações implicam numa mudança do momento dipolar produzindo periodicamente uma mudança no campo eletromagnético, que irá reagir com a radiação eletromagnética da mesma frequência absorvida, e a intensidade de absorção será proporcional ao quadrado da velocidade de mudança do momento dipolar ⁸².

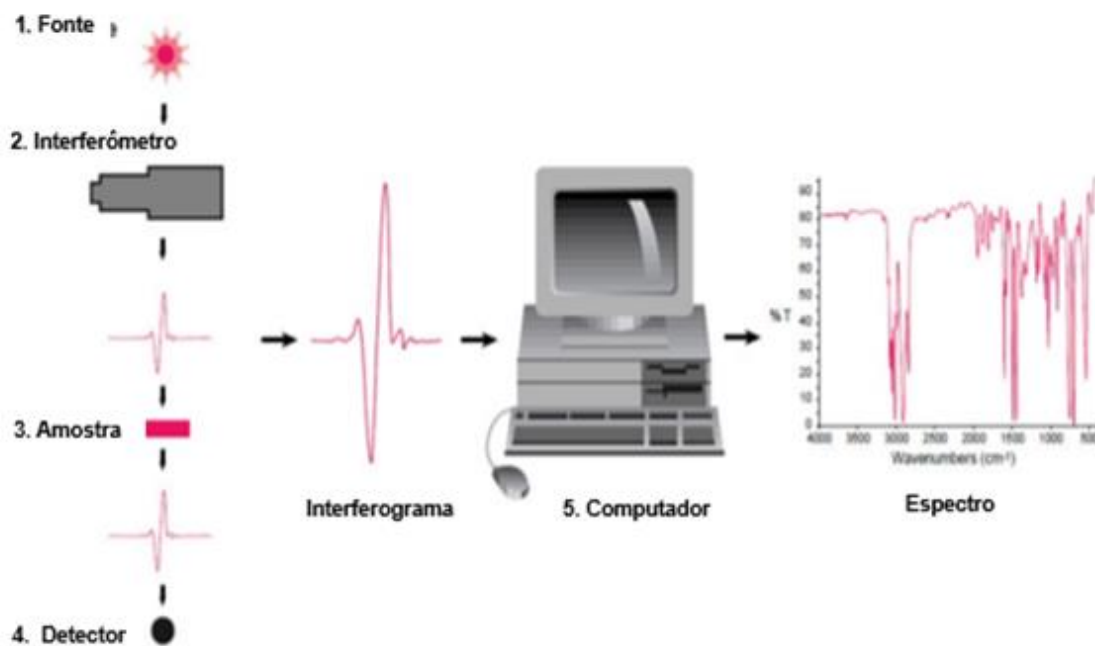
A detecção das frequências específicas de energia absorvidas por uma molécula em um grupo funcional, uma vez irradiada por radiação IR é excitada para um nível de energia mais alto, atingindo seu primeiro estado vibracional, a molécula absorver energia apenas quando a frequência da energia infravermelha direcionada para a molécula for igual à frequência de um dos modos de vibração fundamentais dessa molécula, o resultado dessa absorvância é um espectro infravermelho altamente específico ⁸³.

Em relação a radiação na faixa de 10.000 a 100 cm^{-1} quando é absorvida será convertida em energia de vibração da molécula, porém o espectro costuma aparecer

na forma de bandas, isso ocorre porque a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde mudanças de níveis de energia rotacional. A frequência de uma absorção está sujeito as massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos ⁸¹.

Dentre os instrumentos utilizados na espectroscopia infravermelha destaca-se o espectrofotômetro com transformada de *Fourier*, a Figura 8 mostra o sistema de FTIR. A Transformada de *Fourier* é um processo matemático pelo qual o interferograma é analisado em seus componentes de frequências com suas amplitudes ⁸⁴.

Figura 8 – Sistema de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de *Fourier* e seus principais componentes que são: a fonte, divisores de feixe, a amostra o detector, computador para gerar o espectro da amostra analisada



Fonte: ⁸⁵

A instrumentação do FTIR funciona com dois espelhos planos posicionados perpendicularmente um ao outro. Um espelho semitransparente alinhado com a fonte de radiação, que retornando ao separador de feixes, recombina e sofre interferência. O raio percorre em direção da amostra e em seguida ao detector que é denominado radiação transmitida e por fim os espectros são obtidos pelo cálculo da transformada de *Fourier* ⁸⁵.

3.4.1.1 Interpretação dos espectros

A região 4000 a 400 cm^{-1} denominada infravermelho médio possui aplicação na caracterização de compostos orgânicos, pela ligação característica de um grupo funcional apresentar uma banda de vibração em uma frequência específica. Quando uma matriz complexa é analisada ocorre uma sobreposição espectral e técnicas quimiométricas podem ser aplicadas para auxiliar na interpretação dos resultados ⁸⁶.

As áreas mais importantes são as regiões de 4000 a 1300 cm^{-1} , a região de alta frequência é chamada a região dos grupamentos funcionais, nesta região correspondem a grupos funcionais tais como OH, NH e C=O. A ausência de absorção na região de 1850 a 1540 cm^{-1} , exclui estruturas contendo carbonilas ⁸¹.

As bandas intensas atribuídas ao do esqueleto aromático e de heteroaromáticos aparecem na região de 1600 a 1300 cm^{-1} , a existência de absorção larga e moderadamente intensa na região de maior comprimento de onda sugere dímeros de ácidos carboxílicos, aminas, amida, mostram bandas nesta região devida a deformação angular fora do plano, a região 1300-900 cm^{-1} é conhecida como impressão digital característica de cada amostra ⁸¹.

3.4.2 Quimiometria

O interessante dos modernos instrumentos é a quantidade de variáveis que geram para uma amostra e, por isso, existe a necessidade de ferramentas para tratar os dados ⁸⁷. A Quimiometria é definida por como “a ciência que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para extrair o máximo de informação química dos dados” ⁸⁷.

O seu desenvolvimento está relacionado ao desenvolvimento computacional, assim o avanço dos instrumentos analíticos necessitando de metodologias multivariadas para análise ⁸⁶.

As áreas em que a quimiometria é bem-sucedida são os seguintes: calibração multivariada, estrutura modelagem de reatividade, reconhecimento de padrões, classificação de análise discriminante e modelagem e monitoramento de processos multivariados, como por exemplo, PCA (*Principal Component Analysis* - Análise de Componentes Principais) ⁸⁸.

A PCA se baseia em reduzir o espaço dimensional no qual o conjunto de dados é naturalmente apresentado, facilitando a interpretação e visualização. Em outras palavras, esta análise transforma “linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original”⁸⁹.

A redução de variáveis decorrente da PCA reduz a dimensionalidade dos dados multivariados, no entanto, preserva o máximo possível de informações, baseando-se inteiramente nos dados de entrada em si, sem referência aos dados de destino correspondentes⁹⁰.

É uma transformação linear que mostra os dados em um novo sistema de coordenadas, de modo que o novo conjunto de variáveis, sejam funções lineares das variáveis originais, sem correlação, e a maior variação de qualquer projeção dos dados. A prática é conseguida através do cálculo da matriz de covariância para todo o conjunto de dados. Em seguida, os autovetores e os autovalores da matriz de covariância são calculados e classificados de acordo com o autovalor decrescente⁹⁰.

Considerando os espectros montados em uma matriz ($n \times d$) em que n é o número de amostras e d é o número de pontos de dados por espectro, sendo neste estudo com espectros de FTIR, em que $d > n$, uma vez que o número de pontos de dados podem ser vários, o PCA reduz a matriz de dados para ($n \times p$), onde p é o número de componentes principais (PC's) determinado, com $p < n < d$. A matriz ($n \times p$) contém as pontuações (*scores*) de cada PC que substituem as intensidades espectrais da matriz original ($n \times d$). A relação entre eixos novos e antigos é expressa em uma matriz ($p \times d$) matriz de vetores próprios, chamados *loadings*⁹¹.

Um dos primeiros estudos que utilizou a associação do FTIR aos métodos quimiométricos para análises a base de plantas, foi realizado em 2004, visando a necessidade de uma solução mais rápida e econômica observando que os meios químicos são mais trabalhosos e demorados, além de ser crucial garantir autenticidade, qualidade, segurança e eficácia da matéria-prima. Como conclusão, o modelo pode ser de grande utilidade para inspeção de qualidade, porque que na análise quimiométrica os dados espectrais são rápidos e simples, não é necessário tratamento químico das amostras¹⁷.

Na prática, por exemplo, Cruz e colaboradores em 2008⁸⁹ demonstraram que por meio de PCA as relações existentes entre as famílias *Celastraceae* e

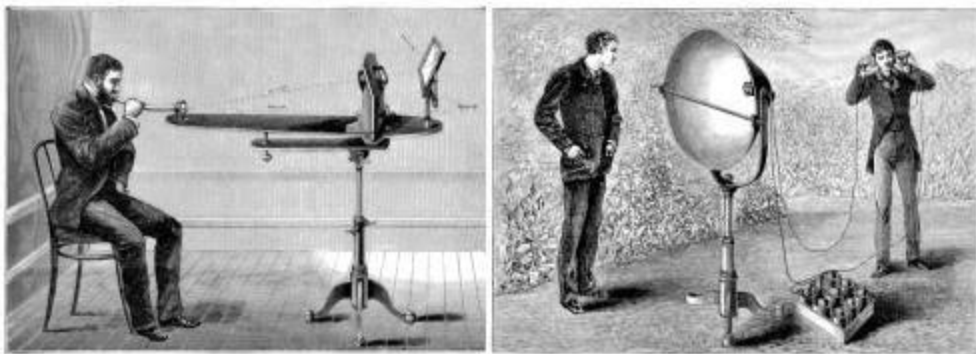
Hippocrateaceae, utilizou-se trinta tipos de esqueleto de tripertenos em diferentes tribos que foram usados como variáveis, junto com informações botânicas e concluíram que todas as tribos estavam intimamente ligadas, corroborando a ideia de uma família unificada, incluindo a *Hippocrateaceae* dentro *Celastraceae* ⁸⁹.

3.4.3 Espectroscopia Fotoacústica

A espectroscopia fotoacústica se caracteriza pela conversão da luz absorvida pela amostra em calor. Neste sentido, se torna uma técnica versátil, permitindo análise de amostras opticamente opacas e transparentes. A luz espalhada pela amostra, consistia um problema em outras técnicas, por exemplo, na espectroscopia óptica, diferente da espectroscopia fotoacústica ⁹².

Foi em 1880, que Alexander Graham Bell descobriu o efeito acústico quando testava seu fonofone. Ele percebeu que quando um feixe de luz vibratória incidia sobre as substâncias que estavam sendo analisadas, elas emitiam sons, cuja intensidade dependia da frequência da mudança vibratória na luz ⁹³, a Figura 9 mostra o modelo do experimento fotoacústico. Com isso, ele estabeleceu que a intensidade do sinal fotoacústico depende do coeficiente de absorção óptica da amostra ⁹⁴.

Figura 9 – Modelo do experimento fotoacústico – Fonofone de Alexander Graham Bell, que estava testando o aparelho quando descobriu o efeito fotoacústico



Fonte: ⁹⁵

No entanto, devido à falta de aparelhos sensíveis para a detecção este fenômeno não atraiu muito a atenção dos pesquisadores da época. Com o avanço da eletrônica, no ano de 1973, os Professores Allan Rosencwaig e Allen Gersho desenvolveram o modelo teórico para descrever o comportamento do sinal

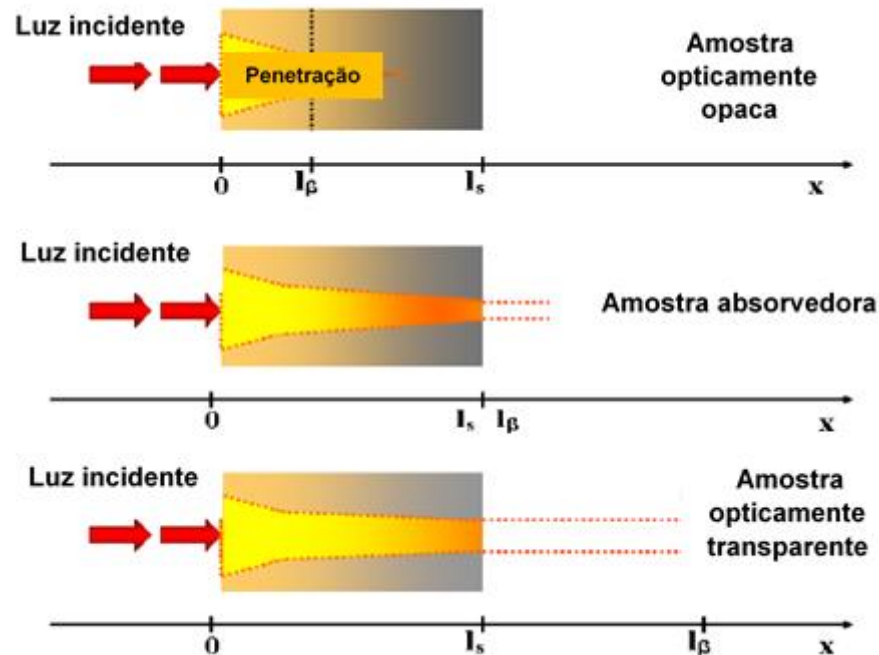
fotoacústico em termos da potência de luz incidente e a frequência de modulação do feixe de excitação, esse modelo fez com que a fotoacústica fosse de um método valioso para o estudo dos sólidos ⁹⁶.

O efeito fotoacústico é observado quando um gás numa célula fechada é irradiado com um feixe modulado de radiação de um comprimento de onda que é absorvido pelo gás, essa radiação causa um aquecimento periódico do gás. Se a frequência de modulação está no intervalo de frequência acústica, os pulsos de pressão podem ser detectados por um microfone. A utilização de excitação modulada resulta na geração do sinal fotoacústico o qual permite a obtenção de espectros de absorção óptica gerados a partir deste sinal. Como o sinal fotoacústico é resultado da interação da radiação com a matéria, sua natureza é definida pelas propriedades ópticas e térmicas das amostras ^{94, 97, 98}.

O sinal fotoacústico é dependente da energia absorvida pelos constituintes da amostra como resultado de sua interação com a radiação incidente. Em relação a penetração da radiação na espessura da amostra ocorre de forma que a intensidade do feixe incidente diminui exponencialmente, conforme a Lei de *Beer*. A absorção óptica do material é caracterizada pela distância de penetração do feixe na amostra até sua intensidade ser reduzida a $1/e$, o parâmetro que mede (denominado de comprimento de absorção óptica), l_{β} , definido como: $1/l_{\beta} = \beta$, sendo β o coeficiente de absorção óptica do material ^{94, 99}.

A Figura 10 mostra as três classificações que uma dada amostra pode receber em termos de comprimento de absorção óptica: opticamente opaca, absorvedora, transparente. Na produção de sinal fotoacústico em uma amostra sólida, existem três mecanismos: a difusão térmica, a expansão térmica e a expansão termoelástica. A PAS fornece o perfil de análise de profundidade, especificada pelo comprimento de difusão térmica ^{11, 94, 99}.

Figura 10 – Três classificações de uma dada amostra/ absorção óptica que pode receber em termo de comprimento de absorção a amostra opaca, absorvedora e transparente a partir de luz incidente



Fonte: ⁹⁸

As vantagens de utilizar a espectroscopia fotoacústica é: medir diretamente a absorção, sendo que a luz transmitida ou espalhada não é detectada e, deste modo, não interfere no resultado das medidas; permite a utilização de amostras *in natura*, com isso não há a necessidade de tratamentos químicos na preparação das amostras; pode investigar materiais altamente espalhadores de luz; permite o levantamento de perfis de profundidade de amostras opacas; e por ser uma técnica não destrutiva, possibilita o estudos de materiais biológicos “in vivo” ¹⁰⁰.

A partir da revisão de literatura, iniciou-se a pesquisa com a finalidade da utilização dos métodos de caracterização mencionados e a análise multivariada por componentes principais com o propósito de realizar a caracterização fitoquímica dos compostos orgânicos da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss comparando com a amostra adulterante *Citronella gongonha*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

- Espécie: *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek
- Família: *Celastraceae*
- Parte utilizada da planta: Folhas
- Espécie: *Citronella gongonha* (Mart.) R.A.Howard
- Família: *Cardiopteridaceae*
- Parte utilizada da planta: Folhas

4.2 REAGENTES

- Acetato de Cobre (REATEC-REAGEN, Colombo, Brasil);
- Acetato básico de chumbo (REATEC-REAGEN, Colombo, Brasil);
- Acetato ácido de chumbo (REATEC-REAGEN, Colombo, Brasil);
- Cloreto férrico (VETEC Química, Rio de Janeiro, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, Estados Unidos);

4.3 EQUIPAMENTOS

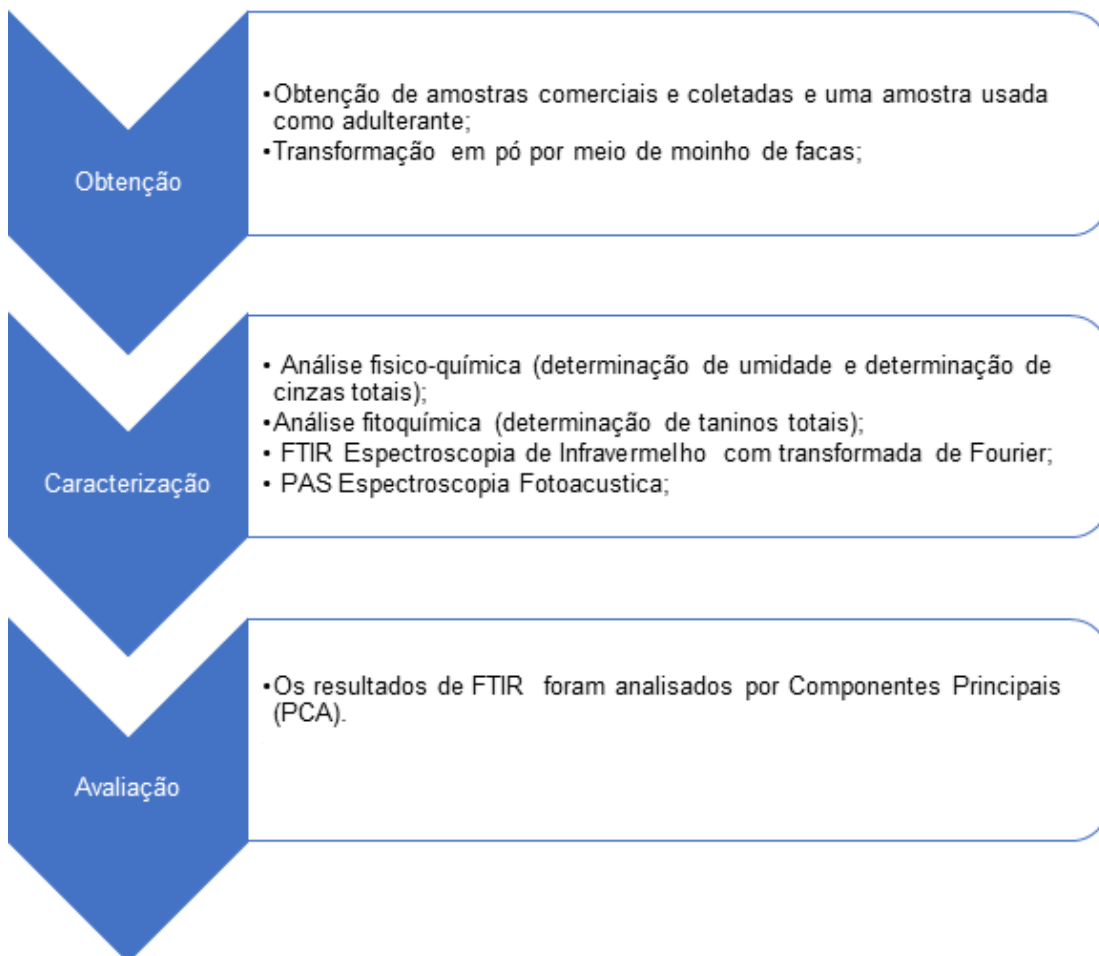
- Balança analítica (SHIMADZU, modelo BL320H, São Paulo, Brasil);
- Espectrômetro infravermelho com transformada de *Fourier* (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Fotoacústica - Amplificador *lock-in* de duas fases (SR830 da Stanford Research System);
- Fotoacústica - Lâmpada de xenônio de 1000 W (66926 da Newport Corporation/Oriel);
- Fotoacústica - Chopper (SR540 Stanford Research System);
- Fotoacústica - Monocromador (74100 da Newport Corporation/Oriel);
- Fotoacústica - Microfone (4953 da Brüel & Kjaer);

- Fotoacústica - Pré-amplificador (2669-L da B&K) e canal de condicionamento (2690-A-0S1 da B&K);
- Estufa (ODONTOBRAS, modelo EI- 1.6, São Paulo, Brasil);
- Moinho de facas tipo *willey* (marca Tecnal, Piracicaba, Brasil);
- Mufla (JUNG, modelo 0612, Santa Catarina, Brasil).

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais realizados nesta pesquisa para caracterizar a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss* por espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* e espectroscopia fotoacústica, foram realizados conforme esquematizado na Figura 11:

Figura 11 – Desenho experimental da pesquisa que foi dividida em obtenção e transformação das amostras, caracterização por FTIR e PAS e por fim avaliação por Componentes Principais



Fonte: O autor

4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.5.1 Obtenção do Material Botânico

A aquisição do material botânico iniciou no dia 09 de agosto de 2018, onde foram adquiridas quatro amostras comerciais de folhas desidratadas em Ponta Grossa-PR e duas em São João do Triunfo-PR selecionadas aleatoriamente. A amostra de *Citronella gongonha* utilizada na pesquisa como adulterante de espinheira-santa, foi coletada na época de floração em Piraí do Sul-PR, apenas as folhas. As folhas das amostras plantadas, que são seis, foram coletadas na época de floração a partir de setembro de 2018, para catalogação no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A Tabela 1 têm informações sobre a cidade e as coordenadas do local de coleta.

Tabela 1 – Localização das amostras coletadas nos três municípios coletados, no caso de Ponta Grossa foi colocado os bairros, por possuir mais pontos de coleta, apresentam as coordenadas

LOCAL	COORDENADAS
Castro (a7col)	49°59'23,10" de longitude W e 24°48'04,69" de latitude S.
Piraí do Sul (aCG)	49°88'52,39 de longitude W e 24.46'07,23 de latitude S
Pirai do Sul (a8col)	49° 54'48,5" de longitude W e 24°28'27,8" de latitude S.
Ponta Grossa/Jardim Carvalho (a11col)	50°08'59,74" de longitude W e 25°04'53,37" de latitude S.
Ponta Grossa/San Martin (a12col)	50°05'40,55" de longitude W e 25°03'57,80" de latitude S
Ponta Grossa/Nossa Senhora das Graças (a13col)	50°10'10,77" de longitude W e 25°03'39,25" de latitude S
Ponta Grossa/Uvaranas Horto Botânico (a9col)	50°06'06,73" de longitude W e 25°05'41,74" de latitude S

Fonte: O autor

As amostras foram nomeadas conforme sua origem. As seis primeiras levam a sigla com para comerciais e as outras seis levam a sigla col para as coletadas e a amostra da espécie vegetal de *Citronella gongonha* ficou nomeada como aCG conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Nomenclatura das amostras, as seis primeiras levam a sigla com por serem comerciais, as coletadas, outras seis, a sigla col e a *Citronella gongonha* denominada como aCG

Amostras Comerciais	Amostras Coletadas	Amostra coletada <i>Citronella gongonha</i>
a1com	a7col	aCG
a2com	a8col	
a3com	a9col	
a4com	a11col	
a5com	a12col	
a6com	a13col	

Fonte: O autor

As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob os números: 22245, 22246, 22249, 22248, 22151, 22153 (Anexo A – Exsiccatas das amostras coletadas). A amostra aCG (*Citronella gongonha*) foi identificada por comparação com a exsiccata ICN 113385 do herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.¹⁰¹

4.5.2 Preparo das Amostras

As amostras coletadas passaram por um processo de secagem, no qual foram retiradas somente as folhas e levadas para tratamento térmico em estufa a 40°C por 72 horas¹⁰². Após a aquisição das amostras, as folhas foram submetidas ao processo de cominuição por meio de um moinho de facas tipo *Willey* com peneira em malha *mesh* 32 de crivo circular, realizadas na sala de Preparo de Amostra do Departamento de Agronomia da UEPG. Em seguida foram armazenadas em frascos graduados de polipropileno e hermeticamente fechados acondicionada fora do abrigo da luz e umidade, conforme a Figura 12. As amostras comerciais foram adquiridas secas sem necessidade de tratamento prévio.

Figura 12 – (A) refere as estufas utilizadas para secagem das amostras coletadas, (B) o moinho de facas utilizado para cominuição e (C) amostra em forma de pó para ser utilizada nas análises



Fonte: O autor

4.6 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DAS FOLHAS PULVERIZADAS

4.6.1 Determinação da Umidade (Perda por Dessecação)

A determinação da umidade (perda por dessecação) foi realizada conforme a sexta edição da Farmacopeia Brasileira ³⁰, pesada aproximadamente 1 g de amostra previamente pulverizada transferido para pesa-filtro exatamente pesado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. A amostra foi dessecada entre 100°C e 105°C durante cinco horas, até peso constante. O resultado foi determinado conforme a Equação 1:

$$\%umidade = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

P_u= peso úmido (cápsula de porcelana + amostra)

P_s= peso seco (cápsula de porcelana após 5h de estufa)

P_a= peso da amostra

4.6.2 Determinação de Cinzas totais

A determinação de cinzas totais foi realizada conforme a sexta edição da Farmacopeia Brasileira ³⁰, foi calcinado previamente cadinho de porcelana em mufla a 450°C por 30 minutos, resfriou-se em dessecador. Tarou-se o cadinho, pesou-se o cadinho aproximadamente 1 g da espécie vegetal. Distribui-se o material uniformemente no cadinho. Foi calcinado em mufla a 450°C por duas horas e resfriou-se o cadinho em dessecador e devidamente pesado. Em seguida, as cinzas totais foram determinadas conforme a Equação 2.

$$\% \text{ cinzas totais} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

P_u= peso úmido (cadinho + amostra)

P_s= peso seco (cadinho após a incineração)

P_a= peso da amostra

4.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DAS FOLHAS

4.7.1 Determinação de Taninos Totais

Para determinação dos taninos totais foi preparada uma solução a partir da pulverização de 2 g da espécie em água destilada. O béquer foi aquecido e a solução foi mantida em ebulição por 5 minutos, em seguida, a solução foi filtrada em algodão para retirar o sobrenadante e o volume inicial foi completado com água destilada, obteve-se o extrato para os testes listados que foram realizados tendo como base a Farmacopeia Brasileira ³⁰.

- Testes com gelatina: em 3 tubos de ensaio foram colocados 0,5 ml, 1,0 ml e 2,0 ml do extrato, juntamente com uma gota de ácido clorídrico a 10 % e adicionado 2 ml de solução de gelatina a 2,5%;
- Acetato de Cobre: foram adicionados 2 ml do extrato em tubo de ensaio e 10 gotas de solução aquosa de acetato de cobre a 4 %;
- Acetato básico de chumbo: foram adicionados 2 ml do extrato em tubo de ensaio e 10 gotas de solução aquosa de acetato de chumbo a 10 %;

- Acetato ácido de chumbo ácido: foram adicionados 5ml do extrato em tubo de com 5 ml de ácido acético a 10% e gota a gota, 5 ml de acetato de chumbo a 10%;
- Cloreto férrico: foi adicionado 1 ml do extrato em um tubo de ensaio e 3 gotas de solução de cloreto férrico 3%.

4.8 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

4.8.1 Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR)

As doze amostras da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* e a amostra da espécie vegetal *Citronella gongonha* foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho para avaliar a estrutura molecular das amostras ¹⁰³, em pastilha com Brometo de Potássio, empregando 1 mg de cada amostra e 100 mg de KBr grau espectroscópico (2 % em massa), no equipamento (Shimadzu, Quito, Japão, modelo IR Prestige-21), 64 scans/min, resolução de 4 cm⁻¹, modo de análise absorbância, a faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando as amostras na forma de pó. Foram efetuadas dez medidas em cada amostra com intervalo de sete dias entre elas.

4.8.2 Análise por Componentes Principais (PCA)

Com os espectros obtidos pela técnica de FTIR foi empregada a análise estatística por Componentes Principais (PCA). Quando se aplica um algoritmo de PCA num conjunto de variáveis, o conjunto original é substituído por um novo conjunto de variáveis como vantagem esse novo conjunto concentra a maior parte de informações, diminuindo a dimensionalidade de dados, sem perda significativa da informação química ¹⁰⁴.

A PCA admite a visualização do agrupamento natural nos dados, após a avaliação primária da similaridade entre classes e por fim razões por trás do padrão observado de correlação com as propriedades químicas ou físico-químicas das amostras ¹⁷.

Para essa análise foi selecionado o conjunto de regiões para modelagem com o maior número de informações que melhor correlaciona os espectros e qualificação de princípios ativos que neste caso foi na região entre $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ (*fingerprint*).

O pré-processamento utilizado na pesquisa foi a linha de base com posterior normalização pela área integrada na região de (*fingerprint*). Este procedimento tem como “objetivo reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados, garantindo que cada observação seja representada de forma adequada e consistente”¹⁰⁵.

Foram geradas as componentes principais em função dos espectros de absorção a partir das PCs realizou-se a diferenciação dos diferentes grupos orgânicos presentes nas amostras. As componentes foram geradas utilizando o aplicativo *Principal Component Analysis for Spectroscopy* do software *Origin Pro* (versão 2020) (OriginLab, Northampton, MA, USA).

4.8.3 Espectroscopia Fotoacústica (PAS)

Os experimentos de espectroscopia fotoacústica foram realizados no Laboratório Multidisciplinar de Propriedades Termo-Ópticas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (LAPTO-UTFPR) (atualmente o C²MMA - Centro de Caracterização Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais) com a colaboração da Professora Dr^a Daniele Toniolo Dias. Realizou-se a leitura das doze amostras de espinheira-santa e da amostra adulterante.

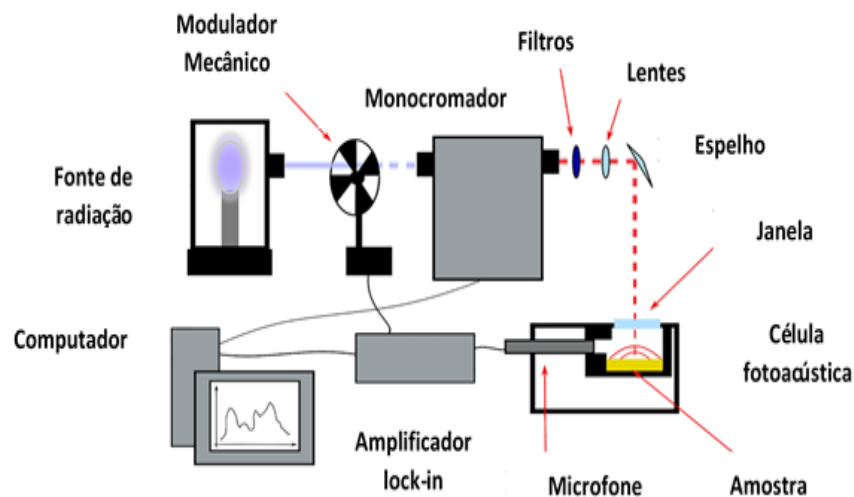
Para excitação foi utilizada uma lâmpada de Xe e como essa lâmpada possui intensidade de emissões diferentes conforme o comprimento de onda, todos os resultados foram obtidos a partir da normalização pelo espectro de um carvão puro, visto que, este material absorve toda radiação incidente na faixa do espectro analisada.

A figura 13 apresenta a montagem experimental da técnica de fotoacústica. A luz derivada da lâmpada é modulada por um *chopper* (*SR540 Stanford Research System*) numa frequência de 23 Hz. O sinal proveniente do modulador foi fornecido para um canal de amplificação (amplificador *lock-in*), e a luz modulada é difratada, em um comprimento de onda selecionado pelo monocromador que possui grades para visualização de comprimentos de onda na faixa do ultravioleta/visível, infravermelho próximo e infravermelho médio.

A luz modulada percorre um caminho por meio de uma fenda estreita (3 mm), passa por filtros de ordem superior de difração sendo então colimada por um espelho côncavo revestido com alumínio (distância focal efetiva 5 cm) e direcionada por duas lentes biconvexas de quartzo (10 e 15 cm) até a amostra dentro da célula fotoacústica que possui microfone com pré-amplificador e canal de condicionamento.

O microfone também está conectado ao canal de referência do amplificador lock-in detectando a intensidade e a fase do sinal fotoacústico. A célula fotoacústica possui uma janela óptica para a entrada de luz e o microfone é acoplado em seu interior. Os dados obtidos foram tratados por meio do *software* Origin Pro (2020).

Figura 13 – Montagem experimental da técnica de fotoacústica utilizada no laboratório multiusuário de propriedades termo-ópticas (LAPTO) - UTFPR que consiste em uma fonte de radiação, o modulador mecânico, monocromador, filtros, lentes, microfone como detector



Fonte: ¹⁰⁶

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Foi realizada a caracterização da folha da espécie vegetal das amostras coletadas, sendo necessário analisar as características morfoanatômicas da espécie vegetal para verificar sua autenticidade e padronização ¹⁰⁷. Este reconhecimento se fez necessário devido a existência de espécies morfologicamente semelhantes.

A espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* é um subarbusto, as folhas possuem margem espinescentes ⁴⁰, coloração verde-acinzentada, mais clara na face abaxial; ápice mucronado, base aguda a obtusa. A nervação é peninérvea, com nervuras secundárias partindo em ângulo agudo em relação à principal ³⁰.

A Figura 14 apresenta características da folha da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* de uma das coletadas a amostra a11col e o Quadro 1 apresenta características foliares da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* apresentando a estrutura do limbo e do pecíolo suas partes constituintes e características.

Figura 14 – Folha da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* com face abaxial em evidência, apresentando características da nervura e formato caracterizando a como espinheira-santa verdadeira da a11col



Fonte: O autor

Todas as amostras coletadas apresentaram as características morfológicas conforme relatado na literatura e apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Determinação das características foliares das espécies vegetais *Maytenus ilicifolia* descrevendo a estrutura do limbo e do pecíolo suas partes constituintes e características

ESTRUTURA	PARTE CONSTITUINTE	CARACTERÍSTICA
LIMBO	Tamanho	2,1 a 9 cm de comprimento, e 1 a 3,1 cm de largura
	Coloração	coloração verde-acinzentada, mais clara na face abaxial;
	Nervação	peninérvea, craspedódroma mista
	Forma	ovalado-oblongas à elípticas ou elíptico lanceoladas
	Ápice	Mucronado
	Base	aguda a obtusa
	Estípula	Inconspícuas
	Pecíolo	Curto com 0,2 a 0,5 cm de comprimento
PECÍOLO	Textura	Coriáceas a subcoriáceas
	Tamanho	0,2 a 0,5 cm de comprimento

Fonte: ³⁰

A amostra aCG foi identificada como uma amostra de *Citronella gongonha* a identificação foi realizada por comparação com a exsicata ICN 113385 do herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, as suas características foliares ¹⁰⁸ são o ápice mucronado, margem inteira ou dentada, a face adaxial glabra, face abaxial pubescente, base obtusa ou levemente atenuada; margem inteira ou dentada, frequentemente aculeada. Pelo fato de apresentar semelhanças morfológicas é utilizada como adulterante de espinheira-santa ¹⁰ não tendo ação farmacológica comprovada, sendo necessária outras formas de diferenciação das amostras. No caso das amostras comerciais, os tecidos foliares estavam secos aumentando a dificuldade na distinção entre elas, sendo impossível a diferenciação na maioria dos casos e indispensável outra forma de caracterização ⁷.

5.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização da espécie vegetal, quanto ao teor de umidade e teor de cinzas totais teve os valores determinados a partir da Farmacopeia Brasileira VI edição (2019). Os resultados estão apresentados na Tabela 3 envolve as amostras de espinheira-santa verdadeira, pois a amostra aCG trata-se de uma amostra que foi utilizada como adulterante de espinheira-santa, não sendo realizado testes com a espécie vegetal, apenas na parte de diferenciação de espécies.

Tabela 3 – Determinação físico-química referente as folhas das doze amostras vegetais *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek enquanto seu teor de umidade e cinzas totais (n=3)

<i>Maytenus ilicifolia</i> %	Ensaio de pureza	
	Determinação de umidade por dessecação (%)	Determinação de cinzas totais (%)
a1com	~4 ± 0,005	~6± 0,032
a2com	~4 ± 0,015	~6± 0,005
a3com	~4 ± 0,005	~7± 0,005
a4com	~2 ± 0,005	~5± 0,023
a5com	~3 ± 0,001	~5± 0,020
a6com	~6 ± 0,011	~6± 0,005
a7col	~1 ± 0,010	~4± 0,005
a8col	~2 ± 0,005	~4± 0,005
a9col	~2 ± 0,034	~3± 0,023
a11col	~6 ± 0,005	~4± 0,010
a12col	~6 ± 0,045	~5± 0,50
a13col	~2 ± 0,035	~4± 0,005

Fonte: O autor

Todas as análises foram realizadas em triplicata, todas as amostras apresentaram valores de umidade indicados pela Farmacopeia segundo a qual, deve conter até no máximo 12% para a espécie *Maytenus ilicifolia*³⁰. Não houve diferença estatística nos valores de umidade entre as coletadas e comerciais.

A avaliação de umidade se faz necessária para avaliar se a correta preservação e conservação do fitofármaco foi efetuada¹⁰⁷. Além de que o excesso de umidade em matéria vegetal pode permitir a ação de enzimas, dessa forma ocorrendo a degradação dos constituintes químicos¹⁰⁹.

Os valores de cinzas totais obtidos e apresentados na Tabela 3 estão dentro do padrão estabelecido pela Farmacopeia³⁰ que, para a espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* é de até 8%. Teores elevados de cinza podem revelar elementos minerais por exemplo, presença de terra ou areia nas amostras. Além disso, a determinação de cinzas totais indica o equilíbrio microbiano e estabilidade físico-química das amostras¹⁰⁷. Também para este parâmetro não foram observadas diferenças significativas entre as amostras comerciais e coletadas.

5.3 DETERMINAÇÃO DE TANINOS TOTAIS

A determinação dos taninos foi realizada e todas as amostras da espinheira-santa verdadeira quando em contato com os reagentes apresentaram taninos condensados e hidrolisados, como mostra a Tabela 4 que apresenta a reação positiva para precipitado em contato com os reagentes, representado pelo sinal (+), e em contato com o cloreto férrico se apresentar taninos condensados, surge a coloração verde ³⁰.

Tabela 4 – Relação das amostras e reagentes utilizados (Gelatina, Acetato de Cobre, Acetato básico de chumbo, acetato ácido de chumbo e o cloreto férrico para determinação de taninos totais, para verificar a precipitação em contato com os reagentes

<i>Maytenus ilicifolia</i>	Gelatina	Acetato de Cobre	Reagentes		Cloreto férrico
			Acetato básico de chumbo	Acetato ácido de chumbo	
a1com	+	+	+	+	VERDE
a2com	+	+	+	+	VERDE
a3com	+	+	+	+	VERDE
a4com	+	+	+	+	VERDE
a5com	+	+	+	+	VERDE
a6com	+	+	+	+	VERDE
a7col	+	+	+	+	VERDE
a8col	+	+	+	+	VERDE
a9col	+	+	+	+	VERDE
a11col	+	+	+	+	VERDE
a12col	+	+	+	+	VERDE
a13col	+	+	+	+	VERDE

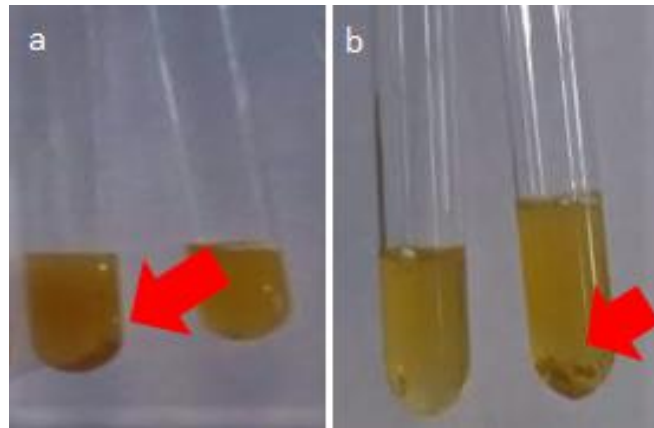
Fonte: O autor

Nota: + Significa que houve formação de precipitado do extrato com os reagentes, indicando a presença de taninos. E verde é a coloração em contato com o cloreto férrico também confirmando a presença de taninos.

Inicialmente foi realizado o procedimento com a gelatina e houve aparecimento de precipitado nítido nas amostras, isso acontece devido a ligação com as proteínas que são hidrofílicas, resultando em ligações de hidrogênio entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os sítios eletronegativos das proteínas ¹¹⁰.

Na Figura 15 houve o aparecimento de precipitado pelo procedimento de gelatina da amostra comercial a1com (a) e coletada a11col (b).

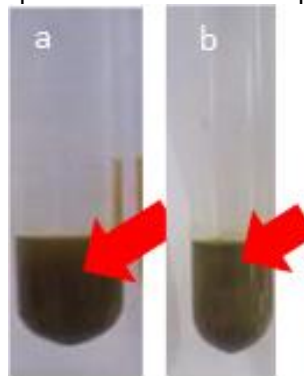
Figura 15 - Extrato da amostra a1com (a) e amostra a11col (b) em contato com a gelatina, ambas demonstraram o aparecimento de precipitado e confirmaram a presença de taninos



Fonte: O autor

Na Figura 16 é apresentado um exemplo de turvação do extrato em contato com o acetato de cobre uma amostra comercial a4com (a) e uma coletada a9col (b). Este resultado confirma para a presença de taninos.

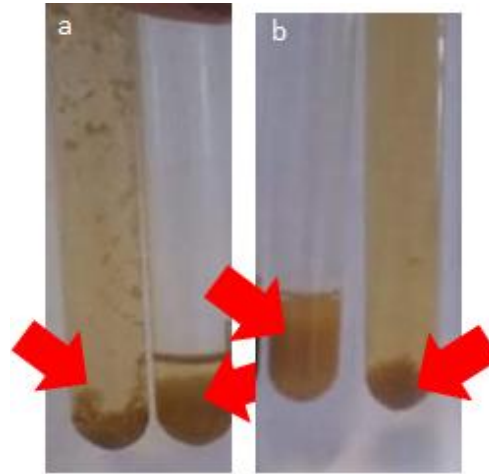
Figura 16 - Extrato da amostra a4com (a) e da amostra a9col (b) em contato com acetato de cobre demonstrando o aparecimento de precipitado e confirmando a presença de taninos



Fonte: O autor

A Figura 17 demonstra a formação de um precipitado esbranquiçado devido ao contato do extrato com o acetato de chumbo tanto para uma amostra comercial (a) e uma coletada (b). Este comportamento demonstra a presença de taninos hidrolisáveis.

Figura 17 - Extrato da amostra a2com (a) e da amostra a8col (b) em contato com acetato de chumbo (básico e ácido) demonstrando o aparecimento de precipitado esbranquiçado e confirmando a presença de taninos hidrolisáveis



Fonte: O autor

Por fim, a reação do extrato com o cloreto férrico apresentou coloração verde escura para todas as amostras indicando a presença de taninos condensados.

Em 2014, Cardozo e colaboradores ⁷⁸ verificaram a qualidade de plantas medicinais, inclusive a espinheira-santa, realizando testes com três tubos de ensaio, o primeiro adicionado 2 gotas de FeCl₃ 10%, o segundo com 2 gotas de acetato de chumbo 10% e o terceiro com acetato de chumbo e ácido acético, constatando a presença de taninos hidrolisados e condensado nas amostras.

Em 2015, Colacite ¹¹¹ avaliou o perfil fitoquímico de quatro plantas, entre elas a *Maytenus ilicifolia*, utilizando os métodos de formação de precipitado com acetato de chumbo, acetato de cobre, alcaloides, gelatina e sais de ferro os quais foram positivos para a presença de taninos.

Estes estudos demonstram a eficiência do método utilizado no presente trabalho para a determinação de presença de taninos nas amostras estudadas. Ressaltando que a presença de taninos resulta na atividade farmacológica de complexação com moléculas e macromoléculas, com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestrante de radicais livres ⁷.

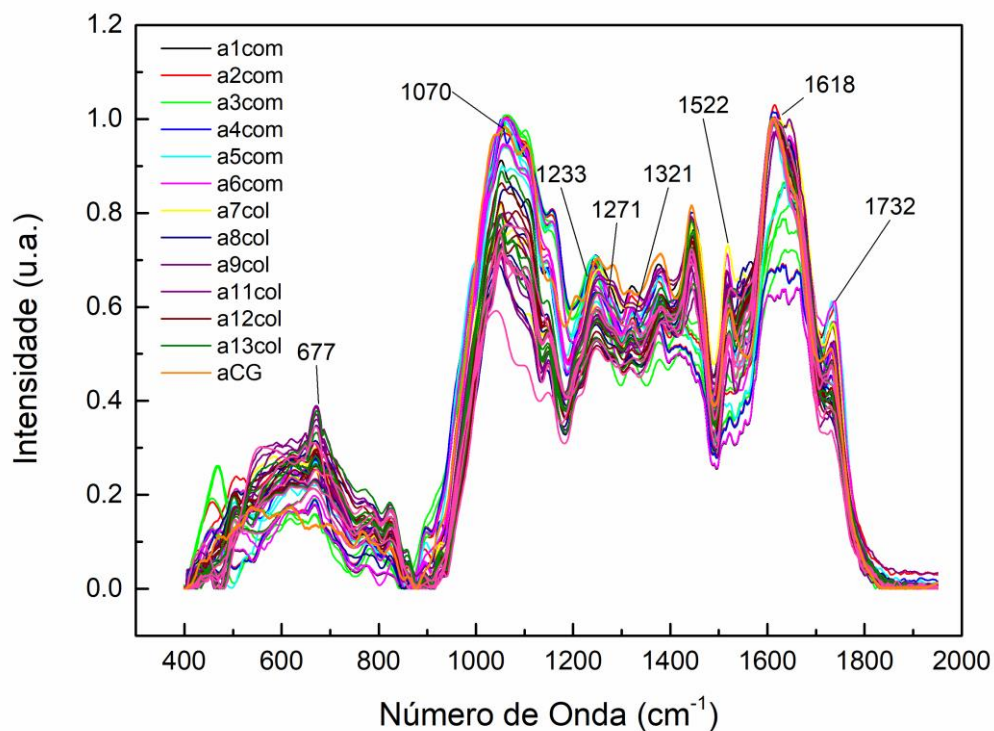
5.4 FTIR

5.4.1 Espectros de Absorção IR

A espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR) foi utilizada para identificação, determinação de grupos funcionais. A caracterização foi realizada a partir dos espectros obtidos por absorbância das amostras comerciais e coletadas, incluindo a amostra adulterante.

A Figura 18 apresenta o espectro de todas as amostras analisadas, sendo sete coletadas e seis comerciais. A região de maior interesse é a compreendida entre 1800-400 cm^{-1} , por se tratar de uma região conhecida como impressão digital da molécula (*fingerprint*), região importante para determinação da estrutura. As principais bandas de absorção se encontram em 677;1070;1233;1271;1321;1522;1618 e 1732 cm^{-1} .

Figura 18 - Espectro da região do infravermelho das treze amostras coletadas, sendo seis comerciais e sete coletadas, os picos na região de 677;1070;1233;1271;1321; 1522; 1618;1732 cm^{-1}



Fonte: O autor

Na região entre 1722-1702 cm^{-1} , o estiramento C=O de ésteres de taninos hidrolisados, especialmente os derivados de ácido gálico podem ser observados. Essa região pode ser considerada como o estiramento principal para a distinção entre taninos hidrolisados e condensados, visto que os condensados não apresentam o grupamento carboxila em condições naturais ¹¹².

Outros estiramentos que são facilmente identificados são os da ligação C=C-C dos anéis aromáticos, na região entre 1611-1444 cm^{-1} e da ligação C-O em 1368-1157 cm^{-1} e 1031-1023 cm^{-1} . Na região de 1555-1503 cm^{-1} taninos condensados normalmente apresentam bandas mais intensas do estiramento C=C-C quando comparados com taninos hidrolisados ¹¹². Na região de 1368-1157 cm^{-1} os taninos hidrolisados exibem sinais mais intensos do estiramento C-O quando comparados com taninos condensados, provavelmente devido a presença de ésteres. Além disso, taninos condensados também apresentam absorções em duas regiões distintas: 1361-1340 cm^{-1} e 1284-1283 cm^{-1} , regiões nas quais não são observadas absorções de taninos hidrolisados. Esses estiramentos são atribuídos a ligação C-O de anéis pirano, típico de flavonoide ⁷².

A região entre 600-930 cm^{-1} é atribuída a deformação de ligações C-H fora do plano de anéis aromáticos. A região entre 1060-1130 cm^{-1} está relacionada a deformação C-H no plano anéis aromáticos ^{113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120}.

A região entre 1023-1031 cm^{-1} e 1157-1368 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-O. Ainda as bandas centradas em 1271 cm^{-1} e na região entre 1340-1361 cm^{-1} podem ser atribuídos ao estiramento C-O específicos de anéis pirano, típico de flavonoides ^{113, 114, 115, 116, 121, 122, 123, 124}.

A região entre 1440-1618 cm^{-1} é caracterizada pelo estiramento das ligações C=C-H dos anéis aromáticos. O estiramento C=O apresenta uma absorção distinta na região entre 1702-1750 cm^{-1} ¹²⁵.

A partir dessas atribuições aprofundou-se a discussão em termos de taninos hidrolisados e condensados: de acordo com a literatura ^{112, 122, 125, 126}, regiões entre 1157-1368 cm^{-1} os taninos hidrolisados apresentam bandas de absorção mais intensas que os condensados, sendo este fator atribuído a presença de ésteres. Taninos condensados apresentam duas absorções distintas nas regiões entre 1280 e 1340-1361 cm^{-1} , os taninos hidrolisados não apresentam essas absorções. Nas regiões entre 1503-1555 cm^{-1} taninos condensados apresentam absorções mais intensas do que os hidrolisados. A região entre 1702-1750 cm^{-1} é considerada a

principal para se distinguir entre taninos hidrolisados e condensados, pois o segundo não apresenta o grupamento carboxila, os taninos hidrolisados apresentam o estiramento C=O atribuído principalmente a ésteres derivados de ácido gálico.

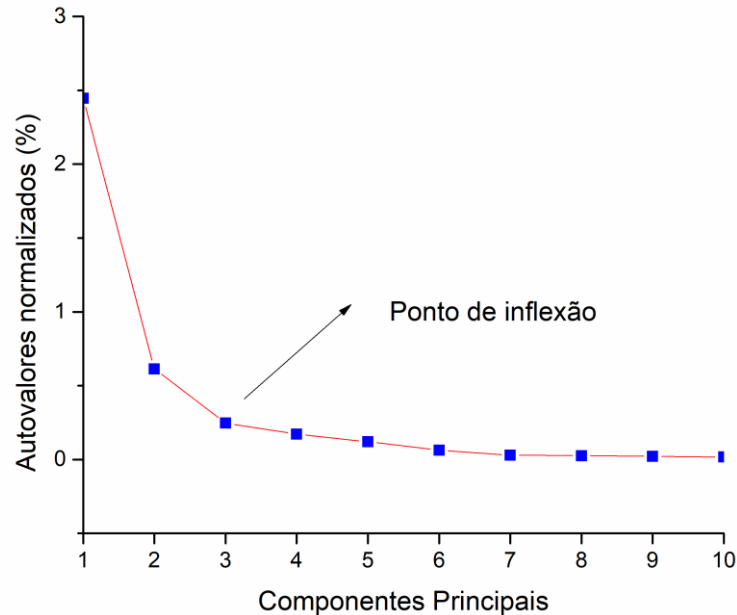
Devido a quantidade de dados e diferenças em intensidades dos espectros obtidos por FTIR, utilizou-se a análise por componentes principais dos espectros apresentados na Figura 18 na região entre 400 e 1900 cm^{-1} (*fingerprint*)^{112,127}.

5.5 PCA

A partir dos resultados obtidos pelos espectros de FTIR, foi realizada a análise de componentes principais na região entre 400 e 1900 cm^{-1} (*fingerprint*) das medidas, para obter um resultado mais preciso sobre a diferença das amostras e na PCA foram utilizados também os dados da amostra aCG (*Citronella gongonha*). Todos os espectros foram normalizados pela área integrada nessa região.

A análise foi efetuada para conhecer quais componentes principais utilizadas. A análise permitiu visualizar um determinado conjunto de dados com relação aos componentes principais variados. O conjunto inicial de variáveis foi reduzido a um número de variáveis de componentes principais, o qual é representado pelo gráfico *scree plot* exposto na Figura 19, que determinou o ponto de inflexão pertinente ao limite de componentes necessárias para representar os dados analisados.

Figura 19 – *Scree plot* mostrando a variância representada por cada componente a partir do autovalor de origem. O ponto de inflexão determina o limite de componentes necessárias para representar os dados analisados



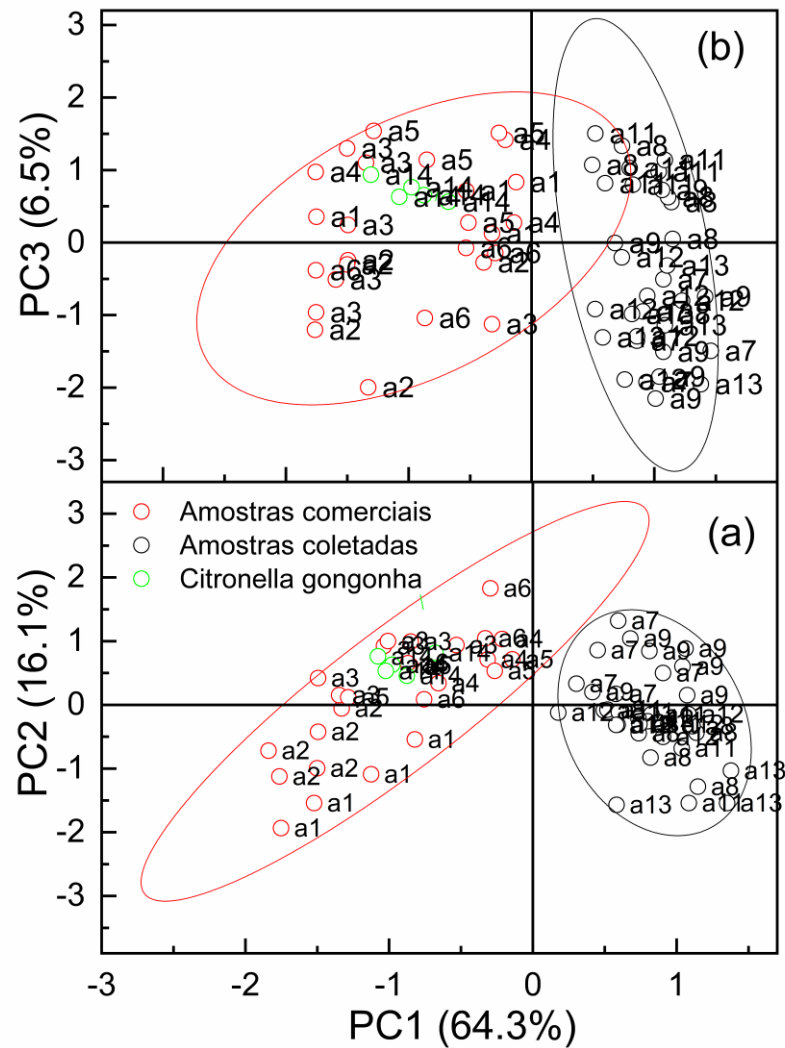
Fonte: O autor

Foi observado que o ponto de inflexão é a partir da PC3, desta forma optou-se por trabalhar com as componentes PC1 que representa 64,3% dos dados, PC2 com 16,1% e PC3 com 6,5%, resultando em um total de 86,9% de representatividade, reduzindo os dados para três componentes.

A Figura 20 mostra os *scores* das PCA obtidos dos espectros das medidas, representando PC1(64,3%) x PC2 (16,1%) (a) e PC1 x PC3 (6,5%) (b), com a elipse de confiança em 95% para cada conjunto de amostras percebe-se que ocorre uma separação de amostras coletadas, com as amostras comerciais e a amostra aCG (*Citronela Congonha*), formando outro conjunto.

Na Figura 20(a) observa-se que as amostras coletadas aparecem em PC1 (*score* positivo) e PC2 (*score* positivo e negativo). As amostras comerciais juntamente com a aCG surgem em PC1 (*score* negativo) e PC2 (*score* positivo e negativo). Na Figura 20(b) foi observada uma diferenciação também entre amostras coletadas, comerciais e a aCG. As amostras coletadas aparecem em PC1 (*score* positivo) e PC3 (*score* positivo e negativo). As amostras comerciais surgem em PC1 (*score* negativo) e PC3 (*score* positivo e negativo) e a amostra aCG surge em PC1 (*score* negativo) e PC3 (*score* positivo).

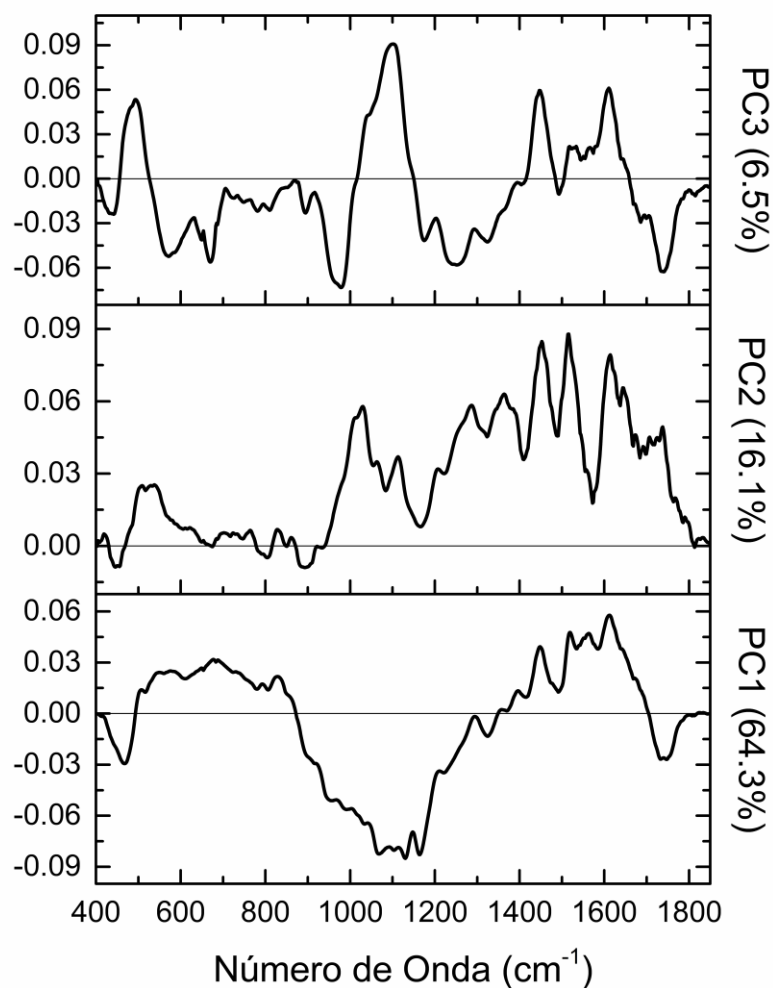
Figura 20 – Scores da PCA obtidas dos espectros de FTIR das medidas. No gráfico estão representados PC2xPC1 PC3xPC1. São apresentadas as elipses de confiança em 95%



Fonte: O autor

Além dos scores, os *loadings* fornecidos pela PCA agregam informações importantes. Estes indicam o peso das variáveis em cada componente. Os *loadings* para cada componente estão apresentados na Figura 21, em PC1, PC2 e PC3 e observar-se a formação e separação das componentes.

Figura 21 – *Loadings* das variáveis PC1, PC2 e PC3, sendo PC1 64,3%, PC2 16,1% e PC3 6,5%



Fonte: O autor

A análise de PC1 indica em 1740 cm^{-1} , um dos principais sinais de estiramento que diferencia entre taninos hidrolisados e taninos condensados ¹¹². Com *loading* negativo temos as amostras comerciais juntamente com a aCG, indicando uma maior concentração de grupamento carboxila, provavelmente devido a presença de ésteres.

Na região entre $1650\text{ a }1380\text{ cm}^{-1}$ (*loading* positivo), os sinais referentes a estiramentos da ligação de C=C de anéis aromáticos de taninos condensados aparecem. Nessa região os taninos condensados apresentam sinais mais intensos, indicando que as amostras coletadas possuem maior concentração de taninos condensados.

Em torno de 1100 cm^{-1} (*loading* negativo) temos o sinal de torção no plano de ligações C-H de anéis aromáticos típica de taninos hidrolisados. Os sinais entre $800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos a torção fora do plano de ligações C-H de anéis aromáticos

em taninos condensados. Observou-se assim, que as principais absorções que separam as amostras comerciais (juntamente com a aCG) das amostras coletadas pode ser relacionada com a diferenciação entre taninos hidrolisados e condensados ^{112, 119}.

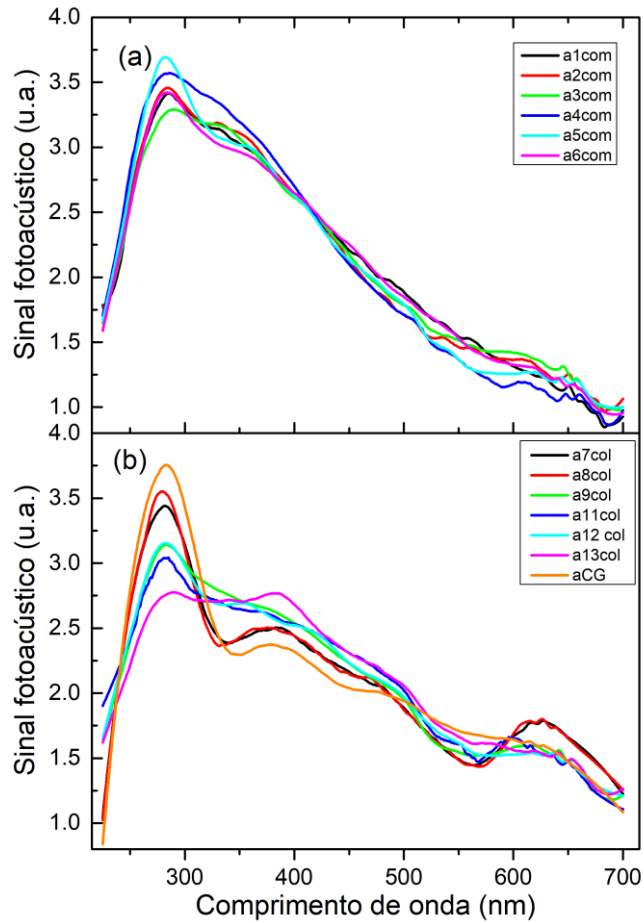
Em PC2, três regiões apresentaram *loading* negativo em 803 e 893 cm^{-1} que correspondem a torção fora do plano de ligações C-H de anéis aromáticos típicos de taninos condensados. Neste caso, as amostras a1com e a2com (com PC2 negativo) possuem maior concentração deste tipo de tanino ^{113, 115}. Dentre as amostras coletadas, destacamos as amostras a8col, a12col e a13col. A última região (444 cm^{-1}) corresponde ao modo de respiração (*breathing*) do anel aromático resultando em PC2 negativo ^{116, 117, 118, 119}.

Para PC3 temos valores negativos para a variação de estiramento de C=O (em 1741 e 1703 cm^{-1}) indicando que as amostras, a3com, a6com, a7col, a9col, a12col e a13col possuem maior concentração de taninos hidrolisados quando comparadas com as demais. Em 1448 e 1609 cm^{-1} temos o estiramento de ligações C=C-C com *loading* positivo, mostrando a concentração de taninos condensados. Em 1100 cm^{-1} (*loading* positivo) têm-se o sinal de torção no plano de ligações C-H de anéis aromáticos, indicando a separação das amostras a1com, a3com, a4com, aCG, a11col e a8col ^{114,115, 116, 120, 122, 128, 129}.

5.6 PAS

Os resultados da espectroscopia fotoacústica são apresentados na figura 22. Para as amostras comerciais (figura 22 (a)) observa-se uma banda centrada em ~280nm e um ombro em ~360 nm com alargamento em toda região espectral. Para as amostras coletadas (figura 22 (b)) essas bandas são mais bem definidas, além de outras bandas em ~480 e 630 nm. A falta de resolução espectral para as amostras comerciais é um indicativo da presença de taninos hidrolisados ¹²².

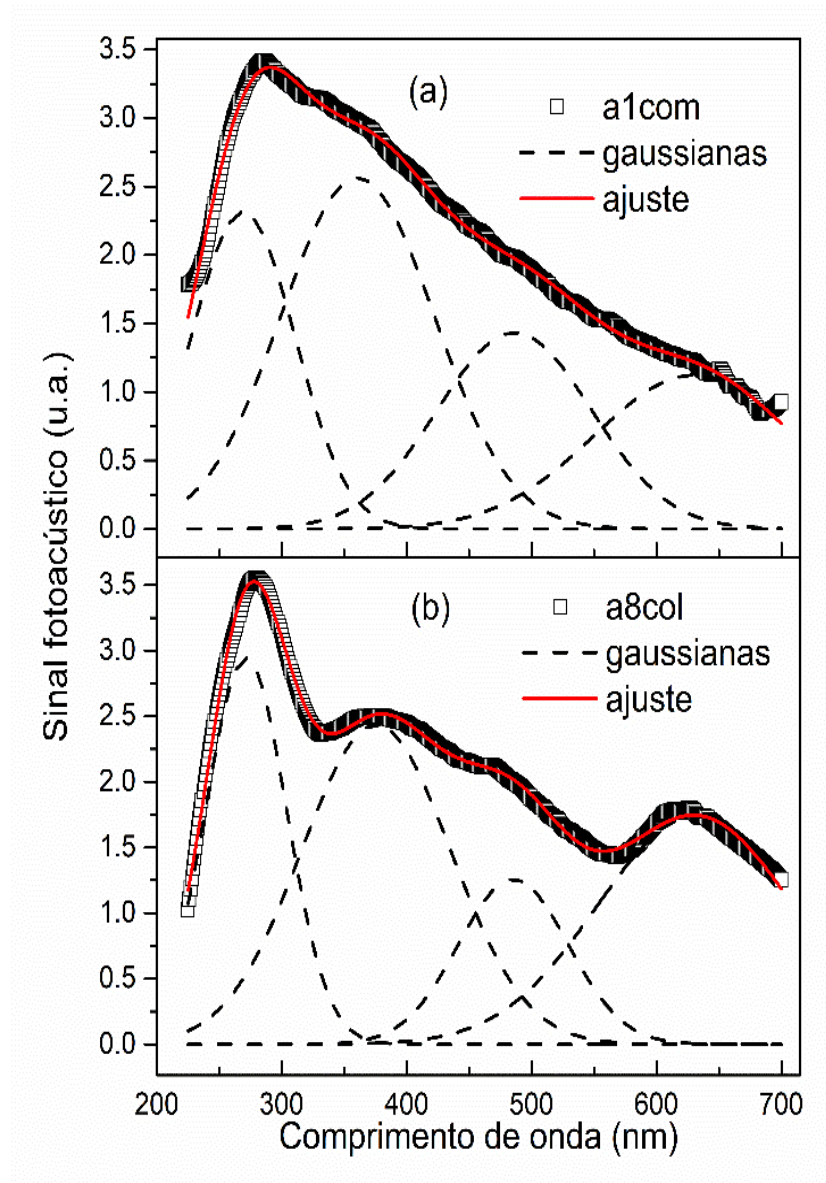
Figura 22 – Sinal fotoacústico para as amostras comerciais (a) e coletadas (b) incluindo a amostra adulterante



Fonte: O autor

A partir destes resultados, foram efetuados ajustes gaussianos nos espectros da Figura 22, considerando bandas de absorção nas regiões: 280 nm, 380 nm, 460 nm e 630 nm. Na Figura 23 tem um exemplo de ajuste para as amostras a1com (Fig. 23 (a)) e a8col (Fig. 23 (b)). No intuito de poder comparar as áreas das gaussianas, manteve-se a posição e largura fixas de cada centro absorvedor.

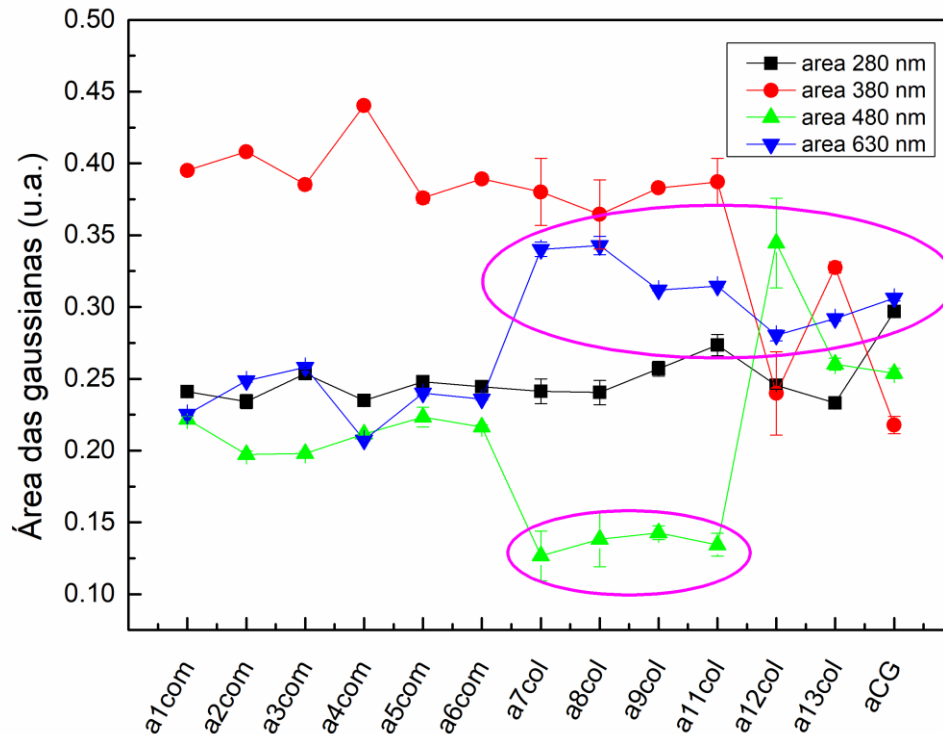
Figura 23 – Ajustes gaussianos para as amostras (a) a1com e (b) a8col, sendo a (a) uma amostra comercial e a (b) uma amostra coletada



Fonte: O autor

Na Figura 24 apresenta-se o comportamento das áreas das gaussianas para as diferentes amostras analisadas.

Figura 24 – Comportamento das áreas das gaussianas para as diferentes amostras de *Maytenus ilicifolia* e a amostra de *Citronella congonha*



Fonte: O autor

Para a área da banda em ~ 280 nm não foi observado diferenças significativas exceto para as amostras a12col e a13col, assim como a amostra aCG apresentou aumento na área desta banda. Para a região em 380 nm, observa-se que a amostra a4com possui maior área enquanto que as amostras a12col, a13col e aCG possui área distinta. As áreas entre 480 nm e 630 nm são as que separam as amostras comerciais das coletadas (comportamento destacado com o círculo rosa na Figura 24). De acordo com Valladão e colaboradores, essa região é associada a absorção de carotenos, clorofilas e outros pigmentos similares¹³⁰. A partir destes resultados observa-se comportamentos distintos para as amostras comerciais e coletadas, mostrando que a espectroscopia fotoacústica pode ser utilizada na validação de plantas medicinais.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia no infravermelho por Transformada de *Fourier*, espectroscopia fotoacústica e análise por componentes principais como métodos para caracterizar a *Maytenus ilicifolia* e a diferenciação entre uma amostra adulterante de *Citronella congonha*.

Com os resultados do FTIR foi possível distinguir entre as amostras comerciais e coletadas e também a diferenciação com a amostra adulterante de *Citronella congonha*.

Pela análise da PCA observou-se a presença dos taninos condensados e hidrolisados nas amostras.

A espectroscopia fotoacústica indicou distinção entre as amostras comerciais e coletadas e a amostra adulterante sendo realizado ajuste gaussianos para as amostras, mostrando que esta técnica pode ser utilizada na validação de plantas medicinais.

As metodologias utilizadas conseguiram identificar características das amostras, podendo ser realizada a diferenciação, além de mostrar ferramentas alternativas breve, precisa, não sendo necessário um preparo minucioso e de relação custo-benefício apropriada no controle de qualidade da espinheira-santa, podendo ser utilizadas para estudos posteriores de controle de qualidade e adulteração de amostras de espécie vegetais.

REFERÊNCIAS

- ¹ Carvalho VAP. Caracterização química por cromatografia líquida e análise quimiométrica de espécies vegetais de Bauhinia com aplicação em controle de qualidade de amostras comerciais de pata-de-vaca [dissertação]. Universidade Federal de São Carlos; 2011.
- ² Oliveira AB, Longhi JG, Andrade CA, Miguel OG, Miguel MD. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. *Visão Academ.* 2006 Jul 12; 7(2):13.
- ³ Brasil. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, Ministério da Saúde. 2006, 71.
- ⁴ Yokota AA, Jacomassi E, Laverde Junior A, Takemura OS. Avaliação da qualidade de produtos contendo *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – *Celastraceae* (espinheira-santa) comercializados na cidade de Umuarama – PR. *Semina* 2010 Jul/Dez; 31(2): 159.
- ⁵ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Ministério da Saúde. Diário da República, 1.^a série 2006; 53, 6297.
- ⁶ Games RAT. Contribuição ao Controle de Qualidade da espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. – *Celastraceae*) [dissertação]. São Paulo: Universidade Bandeirante de São Paulo; 2010.
- ⁷ Jesus WMDM, Cunha TN. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. *Rev. Saúde e Desenvol.* 2012 Jan - Jul; 2(1):21.
- ⁸ Ribeiro MV, Almeida C, Oliveira ASC, Vargas NSC, Barbieri, R. L. Leitura econômica da espinheira-santa em Pelotas, RS. *Rev. da Jorn. Pós-Graduação e Pesqui. Urcamp.* 2016; 777.
- ⁹ Machado AV, Santos M. Morfo-anatomia foliar comparativa de espécies conhecidas como espinheira-santa: *Maytenus ilicifolia* (*Celastraceae*), *Sorocea bonplandii* (*Moraceae*) e *Zollernia ilicifolia* (*Leguminosae*). *Insul. Rev. Botânica.* 2004 Jan 01; 33(1):19.
- ¹⁰ Desmarchelier C, Alonso J. *Maytenus ilicifolia* Martius (Congorosa). *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas.* 2007 Jan 01; 6(1):22.
- ¹¹ Lopes G. Caracterização de Membrana Nafion Usando Espectroscopia Fotoacústica: Monitoramento da Hidratação [dissertação]. Ponta Grossa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2016.
- ¹² Kharyuk P, Nazarenko D, Oseledets I. Comparative study of Discrete Wavelet Transforms and Wavelet Tensor Train decomposition to feature extraction of FTIR data of medicinal plants. *arXiv Prepr. arXiv1807.07099.* 2018 Jul 18; 18.

- ¹³ Huang Y, Wang Z, Wang L, Chao Y, Akiyama T, Yokoyama T, Matsumoto, Y. Analysis of Lignin Aromatic Structure in Wood Fractions Based on IR Spectroscopy. *J. Wood Chem. Technol.* 2016 Mai 09; 36(5):377.
- ¹⁴ Li W, Cheng Z, Wang Y, Qu H. Quality control of *Lonicerae Japonicae Flos* using near infrared spectroscopy and chemometrics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013 Jan 13; 72:33.
- ¹⁵ Wang F, Zhang Z, Cui X, de B Harrington P. Identification of rhubarbs by using NIR spectrometry and temperature-constrained cascade correlation networks. *Talanta* 2006 Dez 15; 70: 1170.
- ¹⁶ Abidi N, Cabrales L, Haigler CH. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* 2014 Jan 16;100:9.
- ¹⁷ Sim C, Hamdan M, Ismail Z, Ahmad M. Assessment of Herbal Medicines by Chemometrics – Assisted Interpretation of FTIR Spectra. *Anal. Chim. Acta.* **2004 Jan**; 570: 1-14.
- ¹⁸ Buschmann, C. Photoacoustic Spectroscopy and its Application in Plant Science. *Bot Acta.* 1990 Fev; 103(1): 9-14.
- ¹⁹ Ogawa CYL. Técnicas espectroscópicas para identificação e quantificação de compostos fenólicos sólidos [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2016.
- ²⁰ Dalla Costa HW, Baldin T, Denardi L, De Carli L, Trevisan R, Marchiori JNC. Anatomia do lenho de *Maytenus cassineformis Reissek (Celastraceae)*. *Balduinia* 2015 Nov 15; 50:29-33.
- ²¹ Judd WS. Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético. 3.ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.
- ²² Antunes ERM. Variabilidade sazonal da composição química e atividade antioxidante de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss*, *Maytenus aquifolium Mart (Celastraceae)* e seus híbridos [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2017.
- ²³ Jin-shuang Ma, Zhixiang Zhang, Quanru Liu, H. P. & M. F. Celastraceae. *ciencia Press. Beijing, Missouri Bot. Gard. Press. St. Louis* **2008**, http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10170.
- ²⁴ Negri MLS. Secagem das folhas de Espinheira-Santa – *Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss*. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na Atividade Antioxidante e nos aspectos microbiológicos [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007.

- ²⁵ Duarte MC, Tavares JF, Madeiro SAL, Costa VCO, Filho JMB, De Fátima Agra M, Filho RB, Da Silva MS. Maytensifolone, a new triterpene from *Maytenus Distichophylla Mart. ex Reissek*. J. Braz. Chem. Soc. 2013 Ago 23; 24(10): 1697.
- ²⁶ Engler HG. A. *Syllabus der Pflanzenfamilien*. Berlin: Gebrüder Borntraeger;1964.
- ²⁷ Chiapetti TP. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos foliares de *Maytenus* spp. sobre *Cylindrocladium clavatum* [dissertação]. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2018.
- ²⁸ Périco LL, Rodrigues VP, Fernando L, Almeida R De, Fortuna-perez AP. *Maytenus ilicifolia Mart ex. Reiss*. Spri. Nat. B. V. 2018 Out 25;332-335.
- ²⁹ Magalhães PM. Agrotecnologia para o cultivo de espinheira-santa. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas-UNICAMP. Campinas: RZM, 2002.
- ³⁰ Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farm. Bras. 6ª ed. 2019; 2: 1.
- ³¹ Carvalho-Okano RMde. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus Mol.emend. Mol.* (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1992.
- ³² Jacomassi E, Machado SR. Características anatômicas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek* e *Maytenus aquifolia Mart.*) e mata-olho (*Sorocea bonplandii (Baill.) Burg. Lanj. & Boer.*) para o controle de qualidade da matéria prima. Rev. Bras. Plantas Med. 2003 Out 01; 6(1): 84-96.
- ³³ Mermejo GCP. Estudo da Morfologia Comparada entre duas Espécies de Espinheira-Santa para o controle de qualidade entre a verdadeira (*Maytenus Illicifolia*) e a Falsa (*Sorocea Bonplandii*). In: Congresso Nacional de Iniciação Científica, São Paulo, 2014, Anais. São Paulo: SEMESP, 2014.
- ³⁴ *Citronella gongonha (Mart.) R.A. Howard*. | Compêndio Online Gerson Luiz Lopes. Disponível em: <https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/citronella-gongonha-mart-r-a-howard/>. Acesso 28 de jul. de 2020.
- ³⁵ Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina: *Citronella gongonha*. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=363. Acesso 28 de jul de 2020.
- ³⁶ LIMA, O. G. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Rev. do Inst. Antibióticos 1969; 9(1-2): 17-25.
- ³⁷ Santos-Oliveira R, Coulaud-Cunha S, Colaço W. Revisão da *Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, Celastraceae*. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. Brazilian J. Pharmacogn. 2008 Nov 29; 19(2B): 650-659.

- ³⁸ Mendes BG, Machado MJ, Falkenberg M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006 Ago 23; 16(4): 568-575.
- ³⁹ Ohsaki A, Imai Y, Naruse M, Ayabe SI, Komiyama K, Takashima J. Four New Triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. *J. Nat. Prod.* 2004 Mar;67(3):469-71.
- ⁴⁰ Mariot MP, Barbieri RL. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). *Rev. Bras. Plantas Med.* 2006 Jun 23; 9(3): 89-99.
- ⁴¹ Oliveira FV. Aplicação da Espectroscopia Fotoacústica na Identificação de Biomoléculas Funcionais do Grupo dos Polifenóis em Frutas e Vegetais [dissertação]. Paraíba:Universidade Federal de Campina Grande; 2014.
- ⁴² Escarpa A, Gonzalez MC. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2010 Jun 03; 31(2), 57-139.
- ⁴³ Tavares L, Ferreira RB, Santos CN. Abordagem Fisiológica no Estudo do Impacto dos Polifenóis na Saúde Humana: o Caso das Amoras Silvestres Portuguesas. 2013 Abr 30; 16(3): 16-18.
- ⁴⁴ Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009 Mar; 2(5):270-8.
- ⁴⁵ Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J. Clin. Nutr.* 2005 Jan; 81(1): 317-325.
- ⁴⁶ Rocha JN, Johansson LAPS, Miranda LV, Lopes, G. C.; Diniz, A.; Mello, J. C. P.; Souza, J. R. P. Desenvolvimento de maytenus ilicifolia e de seus polifenóis totais sob condição de sombreamento e poda. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2014 Abr 04; 16(3): 663-669.
- ⁴⁷ Pessuto MB. Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. E avaliação do potencial antioxidante [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2016.
- ⁴⁸ Tiberti LA, Yariwake JH, Ndjoko K, Hostettmann K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007 Mar; 846(1-2); 378-84.
- ⁴⁹ Viana Leite JP, Braga de Oliveira A, Dias de Souza J, Romussi G, Castro Braga F, Ribeiro P, Rastrelli L, Vilegas W. Heterosídeos flavónicos do extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia* (espinheira santa). UFMG/PRPG - Anais III Semana da Pós-Graduação da UFMG - Ciências Exatas e da Terra. 2003.
- ⁵⁰ Hertog MGL, Hollmann PCH, Van De Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. of Agricult. and Food Chemist.* 1993 Ago 01; 41: 1242-1246.

- ⁵¹ Ferrera TS, Heldwein AB, Dos Santos CO, Somavilla JC, Sautter CK. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. *Rev. Bras. Plantas Med.* 2016 Ago 05; 18(2):588-596.
- ⁵² Louli V, Ragoussis N, Magoulas K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresour. Technol.* 2004 Abr; 92(2):201-208.
- ⁵³ Pinelo M, Del Fabbro P, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* 2005 Aug; 92(1):109-117.
- ⁵⁴ Flambó DFALP. Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana [dissertação]. Porto: Universidade de Fernando Pessoa; 2013.
- ⁵⁵ Bate-Smith EC. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry.* 1973 April; 12(4): 907-912.
- ⁵⁶ Pessuto MB. Análise fitoquímica de extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e avaliação do potencial antioxidante [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2006.
- ⁵⁷ Monteiro JM, De Albuquerque UP, De Lima Araújo E, Cavalcanti de Amorim EL. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova.* 2005 Abr 13; 28(5): 892-896.
- ⁵⁸ Aerts RJ, Barry TN, McNabb WC. Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 1999 Aug; 75(1-2):1-12.
- ⁵⁹ Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* 1996 Feb; 59(2):205-15.
- ⁶⁰ Felipe L, Bicas J. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nov. na Esc.* 2017 Mai; 39(2): 120-130.
- ⁶¹ Pavarini DP, Lopes NP. Chemical ecology and volatile terpenes biosynthesis of "Arnica-da-Serra" from Brazil. *Rev. Virtual Quim.* 2016 Jan 01;8(1): 242-261.
- ⁶² Toscan CM. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides [dissertação]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul; 2010.
- ⁶³ Silva N, Alves S, Gonçalves A, Amaral JS, Poeta P. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 2013 Feb; 19(6): 503.
- ⁶⁴ Paz TA, Santos VAFFM, Inácio MC, Dias NB, Palma MS, Pereira MAS, Furlan M. Proteome profiling reveals insights into secondary metabolism in *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) cell cultures producing quinonemethide triterpenes. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 2017 Jun 03; 130: 405-416.

- ⁶⁵ Coulaud-Cunha S, Oliveira RS, Waissmann W. Venda livre de *Sorocea bomplandii* Bailon como Espinheira Santa no município de Rio de Janeiro- RJ. Rev. Bras. Farmacogn. 2004 Set 14; 14(1): 51-53.
- ⁶⁶ Macaubas CIP, Oliveira MGM, Formigone MLO, Silveira Filho NG, Carlini EA. Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo (*Sedum* sp), folha-da-fortuna (*Bryofillum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: (CEME) CdM, editor. Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira-santa” e outras). Brasília, DF: CEME/MS, p. 5-20, 1988.
- ⁶⁷ Oliveira Souza-Formigoni ML, Oliveira MGM, Goldnadel Monteiro M, Gomes da Silveira-Filho N, Braz S, Carlini EA. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. J. Ethnopharmacol. 1991 Aug; 34(1):21-27.
- ⁶⁸ Faleiros ICF. Efeito antiulcerogênico de frações hexânicas das folhas de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa). In: 22º Simpósio de Plantas Medicinais. Curitiba; 1992.
- ⁶⁹ Itokawa H, Shirota O, Ikuta H, Morita H, Takeya K, Itaka Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. Phytochemistry. 1991; 30(11):3713-3716.
- ⁷⁰ Martins AG, Guterres SS, González Ortega G. Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* martius ex reiss. Acta Farm. Bonaer. 2003 Jan; 22(1): 39-44.
- ⁷¹ Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul; 43(7):1788-1791.
- ⁷² Alves AO, Oliveira RM, Weiss GCC, Bonadiman BSR, Santos RCV. Análise Fitoquímica e Avaliação das Atividades Antioxidante e Antimicrobiana de *Maytenus ilicifolia*. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Gramados. Gramados: FAURGS, 2016.
- ⁷³ Gullo FP, Sardi JCO, Santos VAFFM, Sangalli-Leite F, Pitangui NS, Rossi AS, De Paula E Silva ACA, Soares LA, Silva JF, Oliveira HC, Furlan M, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2012 May 22; 2012:1-6.
- ⁷⁴ Morais SM de, Cavalcanti ESB, Costa SMO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. Brazilian J. Pharmacogn. 2009 Jan 27; 19(1B): 315-320.
- ⁷⁵ Halliwell B. The antioxidant paradox. Lancet. 2000 Apr; 355(9210):1179–1180.
- ⁷⁶ Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim. Nova. 2006 Fev; 29(1):113-123.

- ⁷⁷ Negri MLS, Possamai JC, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Brazilian J. Pharmacogn.* 2009 Jun;19(2B): 553-556.
- ⁷⁸ Cardozo Costa RP, Alcantara Guimarães AL, Macêdo Vieira AC. Avaliação da Qualidade de Amostras de Plantas Medicinais Comercializadas no Brasil. *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* 2014; 35(3): 425-433.
- ⁷⁹ Santos, M. C. S. Utilização da Espectroscopia na Região do Infravermelho (Ftir) e Quimiometria na Identificação do Café Torrado e Moído Adulterado [dissertação]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2005.
- ⁸⁰ Paradkar MM, Sivakesava S, Irudayaraj J. Discrimination and classification of adulterants in maple syrup with the use of infrared spectroscopic techniques. *J. Sci. Food Agric.* 2002 Feb 15; 82(5): 497-504.
- ⁸¹ Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994.
- ⁸² Browning DR. Espectroscopia. 1º ed. Espanha: McGraw-Hill; 1971.
- ⁸³ Nicolaou N, Goodacre R. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Analyst.* 2008 Oct 11; 133(10):1424.
- ⁸⁴ Souza AKR, Lima DMV, Oliveira SLA. Técnica Ftir e suas Aplicações em Amostras Orgânicas. In: Encontro de Ensino Pesquisa e Extensão NEPEX. Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Dourados, 2014.
- ⁸⁵ Novaes FJ. Espectroscopia de Infravermelho - FTIR Conceitos básicos e como a ferramenta é pouco usada - Polímeros. Society of Plastic Engineers – SPE, São Paulo, 2016.
- ⁸⁶ Assis C. Aplicação de técnicas espectroscópicas, métodos quimiométricos, fusão de dados e seleção de variáveis no controle de qualidade de blends das espécies de café arábica e robusta [tese]. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais; 2018.
- ⁸⁷ Ferreira MMC, Antunes AM, Melgo MS, Volpe PLO. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova.* 1999 Jan 12; 22(5): 724.
- ⁸⁸ Wold S, Sjöström M. Chemometrics, present and future success. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1998 Dec; 44(1-2): 3-14.
- ⁸⁹ Cruz AV, Ferreira MJ, Scotti MT, Kaplan MAC. Chemotaxonomic relationships in Celastraceae inferred from Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS). *Nat. Prod. Commun.* 2008 Jun.3(6):911-917.
- ⁹⁰ Jolliffe I.T. Principal Component Analysis. 2th ed. New York: Springer-Verlag New York; 2002.

- ⁹¹ Duarte IMF. Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Vibrational Spectroscopy for the Characterisation of Fruit Products and Beverages [tese]. Portugal: Universidade de Aveiro; 2003.
- ⁹² Olenka L. Utilização de técnicas fototérmicas na determinação de propriedades ópticas e térmicas de polímeros impregnados [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2003.
- ⁹³ Bell AG. On the production and reproduction of sound by light. Am. J. Sci. 1880 Oct; 9(34): 305-324.
- ⁹⁴ Astrath FBG. Determinação de propriedades térmicas de materiais odontológicos utilizando a técnica fotoacústica com célula aberta [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2007.
- ⁹⁵ Pedroso LS, Araújo MST. Transmissor e Receptor Fotoacústico (Fotofone). Anais Encontro De Produção Discente PUCSP/Cruzeiro do Sul. São Paulo. p. 1-11. 2012.
- ⁹⁶ Sehn E. Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação da propagação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2006.
- ⁹⁷ Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR, Pasquini C. Princípios de análise instrumental. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman; 2009.
- ⁹⁸ Astrath ACN. Espectroscopia fotoacústica: determinação das taxas de difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotossensibilizadores na dentina [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2011.
- ⁹⁹ Pedrochi F, Sehn E, Medina AN, Bento AC, Baesso ML, Storck A, Gesztes J. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration rate of three different sunscreens into human skin in vivo. J. de Physique IV (Proceedings). 2005 Jun;125: 757-759.
- ¹⁰⁰ Melo WLB, Loio DA, Viana JHM. Aplicação da espectroscopia Fotoacústica na identificação de componentes do solo. Comunicado Técnico 114, EMPRAPA, 2010.
- ¹⁰¹ Icn H. ICN - Herbário do Instituto de Ciências Naturais. UFRGS.. Disponível em: <http://ipt1.cria.org.br/ipt/resource?r=icn>. Acesso em: 20 de jul de 2020.
- ¹⁰² Teixeira DF, Tappin MRR, Cardoso IC, Lucchetti L, Jacob SC. Panorama of quality of Espinheira-Santa samples from local productive arrangements and local stores of Rio De Janeiro assayed by pharmacopoeial methods and principal component analysis. Rev. Virtual Quim. 2018 Jan; 10(1):194-209.
- ¹⁰³ Preto MS de M, Tavares MIB, Sebastião PJO. Caracterização dos constituintes poliméricos da *Maytenus ilicifolia* por relaxação nuclear de ¹H por RMN no estado sólido. Polímeros. 2011 Dez 13; 21(5): 416.

- ¹⁰⁴ Sabin JG, Ferrão MF, Furtado JC. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. Parte II: Análise por componentes principais (PCA) e o método de classificação SIMCA. *Rev. Bras. Ciências Farm. J. Pharm. Sci.* 2004 Set; 40(3): 387-396.
- ¹⁰⁵ De Souza AM, Poppi RJ. Teaching experiment of chemometrics for exploratory analysis of edible vegetable oils by mid infrared spectroscopy and principal component analysis: A tutorial, part I. *Quim. Nova.* 2012 Jul 22; 35(1): 223-229.
- ¹⁰⁶ Nadal JM, dos Anjos Camargo G, Novatski A, Macenhan WR, Dias DT, Barboza F. M, Lyra A, Roik JR, Padilha de Paula J, Somer A, Farago PV. Adapalene-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles: Physicochemical characterization and in vitro penetration by photoacoustic spectroscopy. *PLoS One.* 2019 Mar 21; 14(3):1-20.
- ¹⁰⁷ Novais JS. Caracterização da matéria prima vegetal e atividade biológica das folhas de *Senna alata* (L.) Roxb. Em acessos na caatinga (BA) e restinga (RJ), Brasil [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2017.
- ¹⁰⁸ Viani RAG, Vieira AOS. Flora arbórea da bacia do rio Tibagi (Paraná, Brasil): Celastrales sensu Cronquist. *Acta Bot. Brasilica.* 2007; 21(2): 457-472.
- ¹⁰⁹ Galina KJ. Terculiaceae: Estudo Botânico, Químico e Microbiológico Guazuma Ulmifolia Lam, Sterculiaceae: Estudo Botânico, Químico e Microbiológico [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"; 2003.
- ¹¹⁰ Sandini TM, Rodrigues NM, Peloi KE, Perez E, Perez E. Avaliação farmacognóstica de *Phyllanthus tenellus* Roxb., Euphorbiaceae (Quebra-Pedra) coletadas em Rancho Alegre D'Oeste, Paraná. *Biosaúde.* 2011;13(1-2):1-11.
- ¹¹¹ Colacite J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: schinus terebinthifolia, maytenus ilicifolia reissek, tabebuia avellanadae, anadenanthera colubrina (Bell.) Brenan. *Saude e pesqui.* 2015 Dez; 8(3):509-516.
- ¹¹² Grasel FDS, Ferrão MF, Wolf CR. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016 Jan 15; 153: 94-101.
- ¹¹³ Fernández K, Agosin E. Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-transform mid-infrared spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2007 Ago 15; 55(18): 7294-7300.
- ¹¹⁴ Puică NM, Pui A, Florescu M. FTIR spectroscopy for the analysis of vegetable tanned ancient leather. *Eur. J. Sci. Theol.* 2006 Dec; 2(4): 49-53.
- ¹¹⁵ Ajuong EM, Redington M. Fourier transform infrared analyses of bog and modern oak wood (*Quercus petraea*) extractives. *Wood Sci. Technol.* 2004 Jan; 38(3): 181-190.

- ¹¹⁶ Oo CW, Kassim MJ, Pizzi A. Characterization and performance of *Rhizophora apiculata* mangrove polyflavonoid tannins in the adsorption of copper (II) and lead (II). *Ind. Crops Prod.* 2009 Jul; 30(1):152-161.
- ¹¹⁷ Özacar M, Şengil İA, Türkmenler H. Equilibrium and kinetic data, and adsorption mechanism for adsorption of lead onto valonia tannin resin. *Chem. Eng. J.* 2008 Set 15; 143(1-3): 32-42.
- ¹¹⁸ Kim S, Kim HJ. Curing behavior and viscoelastic properties of pine and wattle tannin-based adhesives studied by dynamic mechanical thermal analysis and FT-IR-ATR spectroscopy. *J. Adhes. Sci. Technol.* 2003 Feb 12; 17(10): 1369-1383.
- ¹¹⁹ Ping L, Pizzi A, Guo ZD, Brosse N. Condensed tannins from grape pomace: characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. *Ind. Crops Prod.* 2012 Nov; 40: 13-20.
- ¹²⁰ Jensen JS, Egebo M, Meyer AS. Identification of spectral regions for the quantification of red wine tannins with Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2008 Apr 29; 56(10): 3493-3499.
- ¹²¹ Falcão L, Araújo MEM. Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. *J. Cult. Herit.* 2011 Jun; 12(2):149-156.
- ¹²² Falcão L, Araújo MEM. Tannins characterization in historic leathers by complementary analytical techniques ATR-FTIR, UV-Vis and chemical tests. *J. Cult. Herit.* 2013 Dec; 14(6): 499-508.
- ¹²³ Edelmann A, Lendl B. Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2002 Nov 13; 124(49): 14741-14747.
- ¹²⁴ Arana J, Rendón ET, Rodríguez JMD, Melián JAH, Díaz OG, Peña JP. Highly concentrated phenolic wastewater treatment by the Photo-Fenton reaction, mechanism study by FTIR-ATR. *Chemosphere.* 2001 Aug; 44(5): 1017-1023.
- ¹²⁵ Laghi L, Parpinello GP, Del Rio D, Calani L, Mattioli AU, Versari A. Fingerprint of enological tannins by multiple techniques approach. *Food Chem.* 2010 Aug 01; 121(3): 783-788.
- ¹²⁶ Ozgunay H, Sari O, Tozan M. Molecular investigation of valonea tannin. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 2007 May; 102(5):154-157.
- ¹²⁷ Lazzari E, Schena T, Marcelo MCA, Primaz CT, Silva NA, Ferrão MF, Bjerk T, Caramão EB. Classification of biomass through their pyrolytic bio-oil composition using FTIR and PCA analysis. *Ind. Crops Prod.* 2018 Jan; 111: 856-864.
- ¹²⁸ Musa AE, Gasmelseed GA. Characterization of *Lawsonia inermis* (Henna) as vegetable tanning material. *J. For. Prod. Ind.* 2012 Jan 01;1(2): 35-40.

¹²⁹ Aslan A. Improving the dyeing properties of vegetable tanned leathers using chitosan formate. *Ekoloji*. 2013 Mar; 22(86): 26-35.

¹³⁰ Valladão FN, Miranda RRS, Vale FH, Valladão AS, Silva GDF, Duarte LP, Carvalho-Okano RM, Messias MCTB, Viera Filho SA. Four Brazilian *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) groups studied by TLC and UV/Vis spectrophotometry. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009 Set; 19(3): 733-739.

ANEXO A – Exsicatas das amostras coletadas

Figura 25 – Exsicata depositada herbário UEPG - amostra coletada bairro Nossa Senhora das Graças do município de Ponta Grossa - PR – registro 22245 – amostra a13col



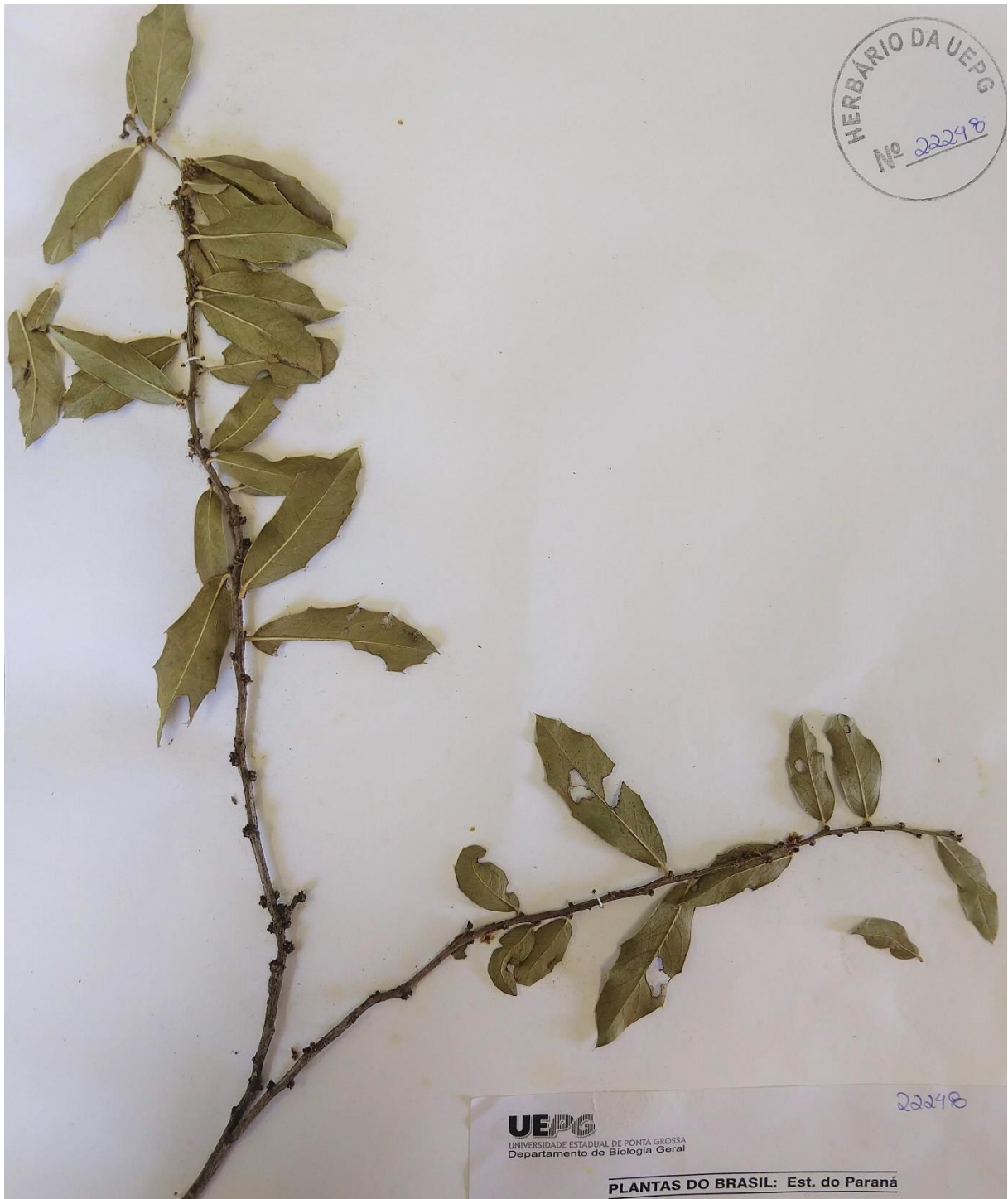
Fonte: O autor

Figura 26 – Exsicata depositada herbário UEPG - amostra coletada no bairro Jardim Carvalho do município de Ponta Grossa - PR - registro 22246 – amostra a11col



Fonte: O autor

Figura 27 – Exsicata depositada herbário UEPG - amostra coletada no bairro SAN MARTIN no município de Ponta Grossa – registro – 22248 – amostra a12col



Fonte: O autor

Figura 28 – Exsicata depositada herbário UEPG - amostra coletada no município de Pirai do Sul - PR
- registro – 22249 – amostra a8col



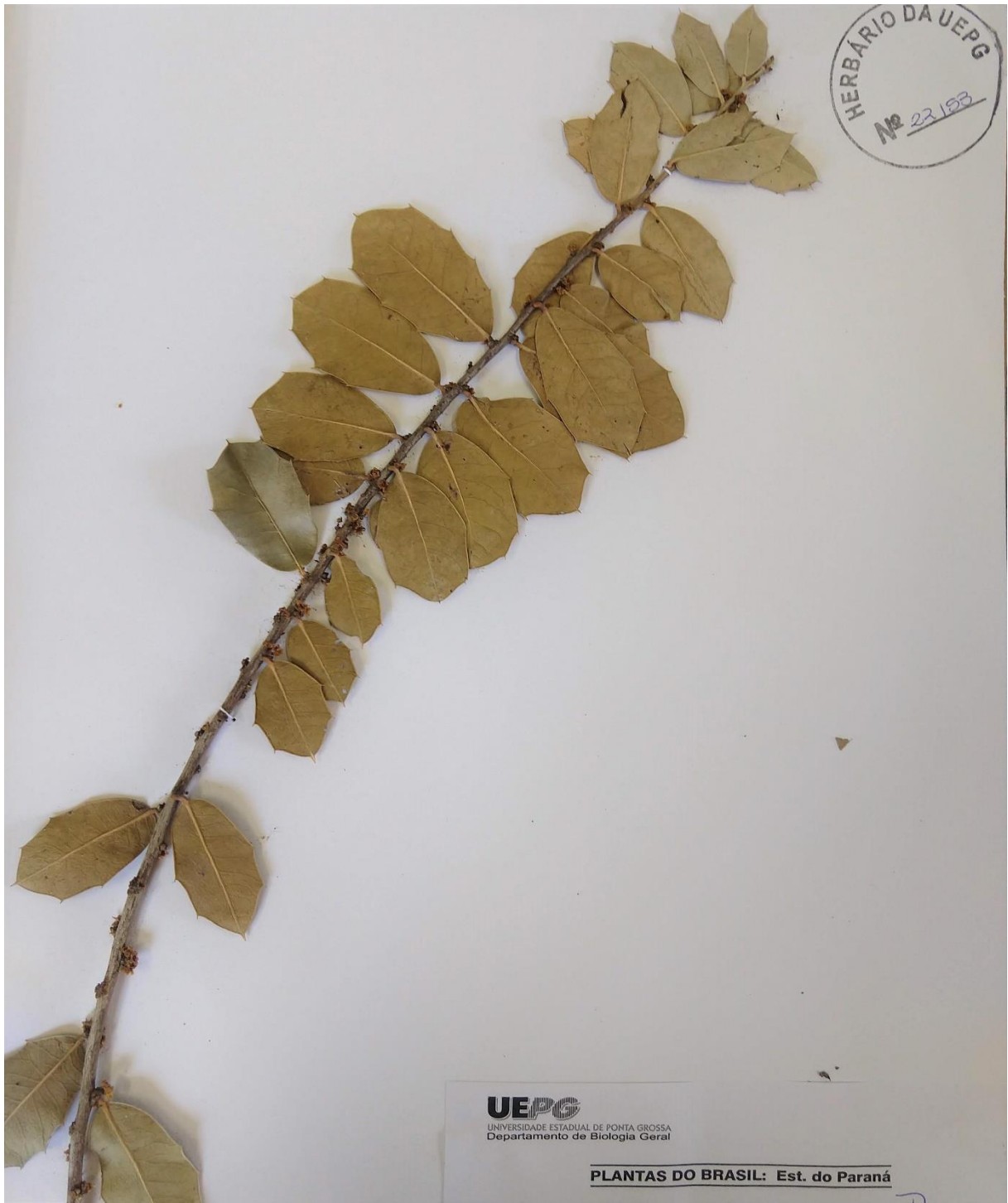
Fonte: O autor

Figura 29 – Exsicata depositada herbário UEPG - amostra coletada no Horto Botânico do município de Ponta Grossa - PR – registro 22151 – amostra a9col



Fonte: O autor

Figura 30 – Exsicata depositada herbário UEPG - amostra coletada no município de Castro - PR - registro 22153 – amostra a7col



Fonte: O autor