

**FLAVONOIDES EM *Montrichardia linifera* (Arruda) SCHOTT (Araceae):
DOSEAMENTO E LOCALIZAÇÃO *IN SITU***

**FLAVONOIDS IN *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae):
DETERMINATION AND LOCALIZATION *IN SITU***

Cristine Bastos do Amarante¹, Ana Cristina Andrade de Aguiar-Dias², Ana Carla Feio dos Santos³,
Paulo Alexandre Panarra Ferreira Gomes das Neves⁴, Raimundo Junior da Rocha Batista⁵ & Alba
Lúcia Ferreira de Almeida Lins⁶

¹Doutora em Química. Pesquisadora da Coordenação de Ciências da Terra e Ecologia do Museu Paraense Emílio Goeldi

²Doutora em Biologia Vegetal. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas

³Mestre em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia Vegetal

⁴Mestre em Ciências Ambientais. Pesquisador/Bolsista na Coordenação de Ciências da Terra e Ecologia do Museu Paraense Emílio Goeldi

⁵Mestre em Agronomia. Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Ciências da Terra e Ecologia.

⁶Doutora em Botânica. Pesquisadora da Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi

Autor correspondente: Paulo Alexandre Panarra Ferreira Gomes das Neves. Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Ciências da Terra e Ecologia. Av. Perimetral, 1901. CEP: 66077 530, Belém, PA. e-mail: paulo.panarra@gmail.com

RESUMO

Montrichardia linifera (Arruda) Schott (Araceae) é uma macrófita aquática pertencente à família Araceae e caracteriza-se por possuir grande amplitude ecológica podendo ser encontrada de emergente a terrestre de solo saturado de água. Conhecida popularmente como aninga é uma planta que possui um amplo espectro etnofarmacológico onde estudos fitoquímicos preliminares indicaram a presença de substâncias da classe dos flavonoides. O presente trabalho teve o objetivo de quantificar o teor de flavonoides totais, bem como realizar a localização *in situ* dos compostos fenólicos totais e flavonoides nas folhas de *M. linifera*. O teor de flavonoides totais foi quantificado em folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) por espectrometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS). A localização anatômica desta classe de substâncias foi identificada por microscopia de luz e de fluorescência. Foi observado que os compostos fenólicos estão contidos nos idioblastos ao longo da lâmina foliar com um teor de 0,14% correspondendo a substâncias do grupo dos flavonoides, que podem ser úteis para a quimiotaxonomia do gênero *Montrichardia* Crüger, além de indicar o possível isolamento e purificação de flavonoides com potencial atividade biológica.

Palavras-Chave - Aninga, Macrófita aquática, Araceae, Compostos fenólicos, Várzea amazônica

ABSTRACT

Montrichardia linifera (Arruda) Schott (Araceae) is an amphibious macrophyte belongs to the Araceae family and is characterized by having wide ecological amplitude can be found emerging terrestrial soil saturated with water. Popularly known as aninga is a plant that has a broad spectrum ethnopharmacological where preliminary phytochemical studies indicated the presence of substances in the class of flavonoids. Therefore, the present study aimed to assess the levels of flavonoids in *Montrichardia linifera*, because besides the strictly medical or taxonomic interest, knowledge about the taxa *Montrichardia* is also desirable from an ecological standpoint and environmental conservation. Total flavonoid content was measured in leaves *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) by absorption spectrometry in ultraviolet-visible (UV-VIS) and by light microscopy and fluorescence was identified its anatomical location. It was observed that phenolic compounds are contained in idioblasts dispersed along the leaf lamina with a content of 0.14% corresponds to substances from the group of flavonoids, which can be useful for the chemotaxonomy of the genus *Montrichardia* Crüger besides indicating the potential for the isolation and purification of flavonoids with potential biological activities.

Keywords: Aninga, Aquatic macrophyte, Araceae, Phenolic compounds, Amazon floodplain.

INTRODUÇÃO

Montrichardia linifera (Arruda) Schott (Araceae) é uma macrófita aquática anfíbia pertencente à família Araceae e caracteriza-se por possuir grande amplitude ecológica podendo ser encontrada de emergente a terrestre de solo saturado de água (Macedo *et al.*, 2005; Lins, 1994; Lins & Oliveira, 1994;). Conhecida popularmente como aninga (Macedo *et al.*, 2005) é uma planta que possui um amplo espectro etnofarmacológico onde estudos fitoquímicos preliminares indicaram a presença de substâncias da classe dos flavonoides, entre elas uma flavona (Amarante, 2010; Costa *et al.*, 2009).

Os flavonoides têm merecido destaque em virtude de sua ampla gama de ações terapêuticas já demonstradas tanto experimentalmente quanto em humanos (Machado, 2008), tais como ação anti-oxidante, anti-carcinogênica, anti-úlceras, anti-trombótica, anti-inflamatória, anti-alérgica, moduladora do sistema imunológico, anti-microbiana, vasodilatadora e analgésica (Wollgast & Anklan, 2000; Zuanazzi, 2000). Outro uso desse grupo de compostos fenólicos tem sido a abordagem taxonômica como marcadores, dentre os quais se destacam os flavonoides, as flavonas, 6- e 8-hidroxi-flavonoides e os flavonoides sulfatados. Estes compostos têm permitido a polarização de caracteres que facilitam a sistemática filogenética na identificação de grupos mono e polifiléticos (Silva, 2007), principalmente.

Flavonoides contém uma ou mais características estruturais que podem ser envolvidas na formação de complexos com metais. E esses complexos muitas vezes desempenham um papel não negligenciável em certas propriedades biológicas. Além disso, flavonoides são usados como reagentes colorimétricos para a detecção e dosagem de traços de metais em solução. Mas pouco se conhece sobre as propriedades estruturais e espectrocópicas dos complexos de flavonoides (Cornard & Merlin, 2002).

A maioria dos flavonoides de origem natural são polifenóis que contém características estruturais que indicam estarem envolvidos na formação de complexos com metais (Cornard & Merlin, 2001; Cornard & Merlin, 2002). A complexação de flavonoides com metais, principalmente com o íon Al^{+3} , é uma técnica comumente empregada no estudo de flavonoides pela análise da espectrometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda (desvio batocrômico) e uma intensificação da absorção (Mabry *et al.*, 1970). Os deslocamentos são devidos à formação do complexo Al^{+3} -flavonoide (Markham, 1982; Robards & Antolovich, 1997; Deng & Van Berkel, 1998). O esquema representado na Figura 1 apresenta os três possíveis sítios quelantes: grupos 3-OH, 5-OH e 3',4'-o-diOH. O cloreto de alumínio ($AlCl_3$) em solução neutra, forma complexos com estes grupos.

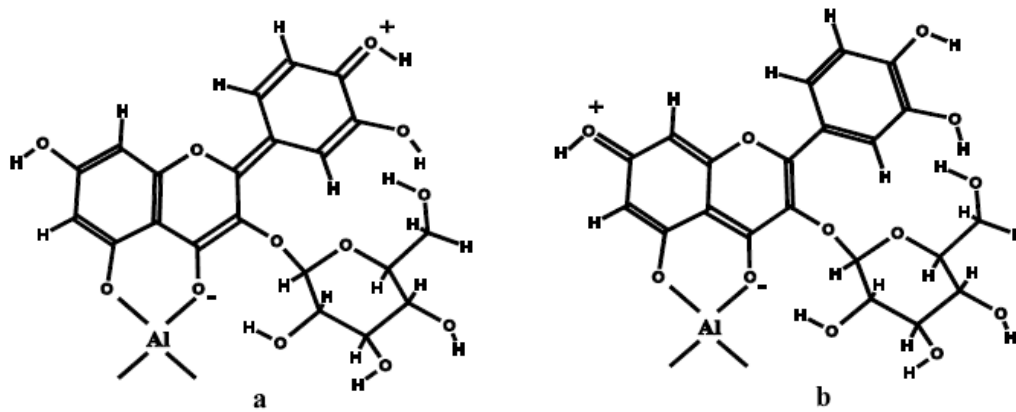


Figura 1. Cinnamoyl (a) e benzoyl (b) formas mesoméricas participando na ressonância do $\text{Al(Iso)(H}_2\text{O)}_4^{2+}$. Moléculas de água foram omitidas (Cornard & Merlin, 2002).

Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais. Comumente a leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol (Woisky, 1996; Woisky & Salatino, 1998). Nessas condições, o complexo Al^{3+} -flavonoide absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonoide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorvância.

A capacidade dos flavonoides em formar complexos metálicos é extensamente utilizada para elucidar sua estrutura, podendo também contribuir para a bioatividade destes compostos, agindo como portadores e reguladores de concentração de metais. Alguns flavonoides possuem um forte efeito antioxidante por sua atividade anti-radicaís e quelação de íons metálicos (Castro & Blanco, 2004).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo conhecer os teores de flavonoides, em *Montrichardia linifera*, pois além do interesse medicinal ou estritamente taxonômico, o conhecimento sobre os táxons de *Montrichardia* é igualmente desejável do ponto de vista ecológico e de conservação ambiental, pois *Montrichardia* segue um amplo gradiente sucessional nas áreas alagáveis, desde ambientes pioneiros até as matas de várzeas, apresentando variações morfológicas e fenotípicas que dificultam a separação entre as espécies *Montrichardia linifera* e *M. arborescens* (Lins, 1994). E os compostos fenólicos podem ser úteis no estabelecimento de afinidades entre diferentes níveis hierárquicos.

O doseamento do teor de flavonoides e a sua localização anatômica são essenciais para se reconhecer como que esta via metabólica se expressa neste táxon e onde que tal composto é armazenado no tecido vegetal. Diante disso, este estudo teve o objetivo de quantificar o teor de

flavonoides totais, bem como realizar a localização *in situ* dos compostos fenólicos totais e flavonoides nas folhas de *M. linifera*.

METODOLOGIA

Material vegetal

Folhas adultas de *Montrichardia linifera* com médias de 44 cm de largura e 52 cm de comprimento foram coletadas no período de estiagem (julho/2008), no horário entre 07:30 h e 09:00 h, durante a maré baixa, em cinco pontos equidistantes ao longo da extensão da orla do Campus da Universidade Federal do Pará (UFPA), margem direita do Rio Guamá (01°28'41,3" S; 48°27'29,0" W), em Belém, no Estado do Pará.

A espécie vegetal *Montrichardia linifera* foi identificada pela Dr^a Alba Lúcia Ferreira de Almeida Lins do herbário “João Murça Pires” do Museu Paraense Emílio Goeldi (MG) e um exemplar foi incorporado ao herbário (MG 188906).

Metodologia analítica

As análises quantitativas foram realizadas em espectrofotômetro Spectro Vision UV-Visível DB 1880S com cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

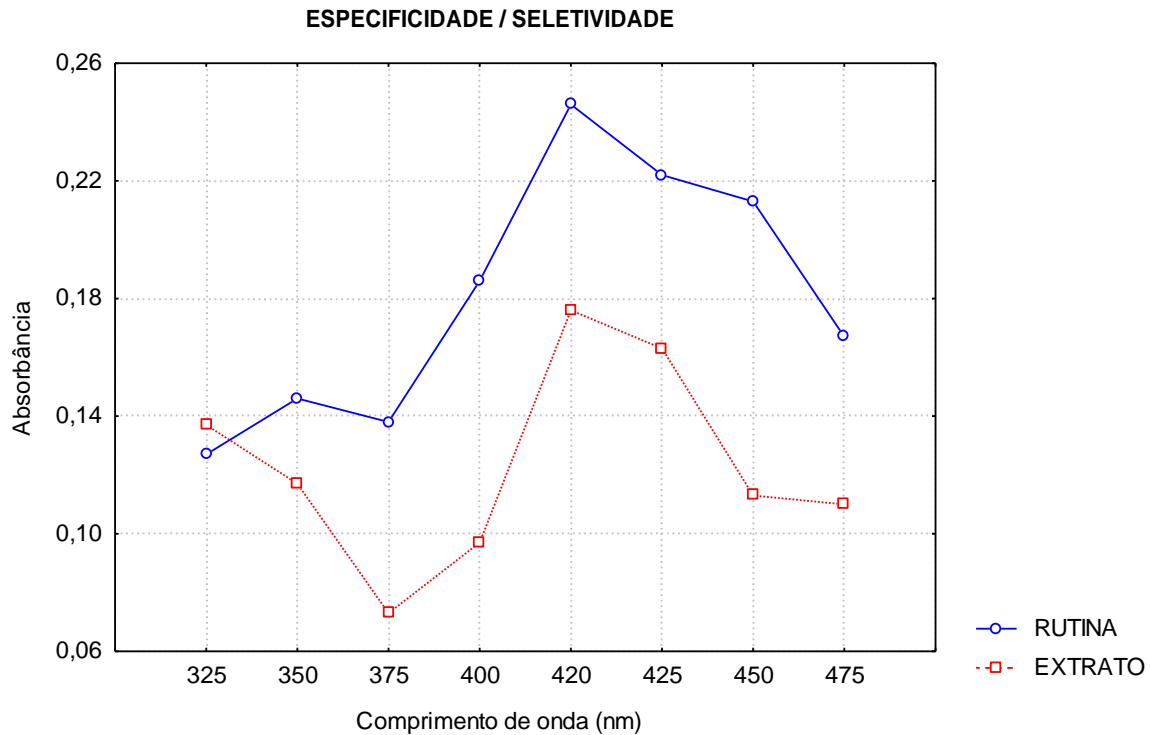
Para a extração foi utilizado metanol p.a. (Vetec). Para metodologia analítica utilizaram-se água destilada e reagente cloreto de alumínio em metanol a 50,0 mg/mL (Vetec). Como padrão para flavonoides foi empregada rutina 99,5% (Merck).

Seguiu-se a metodologia descrita por Woisk (1996) modificada por Santos & Blatt (1998). O extrato foi preparado com 2,0 g de amostra seca e pulverizada com granulometria de 60 mesh em Erlenmeyer de 250 mL, ao qual foram adicionados 150 mL de metanol a 70% e extraído à temperatura ambiente (25°C) por um período de 48 horas. O extrato foi filtrado para balão volumétrico de 250 mL e aferido o volume com o mesmo solvente. Deste extrato foi pipetada e transferida uma alíquota de 15 mL para balão volumétrico de 50,0 mL acrescida de 1 mL de solução de cloreto de alumínio em metanol a 50,0 mg/mL, completando-se o volume com água destilada. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após 30 min, as leituras foram realizadas a 420 nm em cubetas de quartzo.

Para a construção da curva de calibração foram preparadas soluções metanólicas com concentrações crescentes de rutina. A solução padrão de rutina foi preparada com metanol a 70%

numa concentração de 100 µg/mL. Alíquotas de 3,5 mL (7,0 µg/mL) a 10,0 mL (20 µg/mL), com intervalos de 0,5 mL foram utilizadas para a confecção da curva padrão, acrescidas de 1 mL de cloreto de alumínio e completadas para 50 mL com metanol a 70%.

Figura 2. Curva de calibração construída com padrão Rutina (7,0 a 20,0 µg/mL) a 420 nm.



O desempenho do método foi avaliado através do estudo dos seguintes parâmetros analíticos: intervalo de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e seletividade/especificidade. Para a linearidade foi usada a média de três intervalos com repetições autênticas, que contemplavam oito concentrações da solução de Rutina 100 µg/mL (7,0 a 20,0 µg/mL). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo cálculo da linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados para definir o coeficiente de determinação (mínimo aceitável $R^2 = 0,99$) (Brasil, 2003). Os limites de detecção e quantificação foram estimados (em µg/mL) considerando o desvio padrão correspondente a dez leituras do branco em razão ao coeficiente angular (inclinação da reta) obtidos pela linearidade (Woisky, 1996), nos quais foram utilizadas as equações 1 e 2 para determinar o limite de detecção e quantificação, respectivamente:

$$LD = \frac{(3 \times DP)}{a} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{(10 \times DP)}{a} \quad (2)$$

Onde:

LD = Limite de detecção;

LQ = Limite de quantificação;

DP = Desvio padrão das leituras do branco;

a = Coeficiente angular da curva de calibração.

O ensaio de especificidade foi conduzido com o extrato metanólico das folhas de *M. linifera* e rutina como padrão, ambos na concentração de 18,0 µg/mL, para verificação de possíveis interferentes. Os espectros de absorvância foram realizados na faixa compreendida entre 300-450 nm e forneceram os dados para a construção do gráfico de especificidade. O parâmetro recuperação foi realizado em triplicata e o resultado foi obtido através da equação 3.

$$R(\%) = \frac{CTF - CFA}{CFP} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

CTF = Concentração Total de Flavonoides (padrão rutina adicionado à amostra);

CFA = Concentração de Flavonoides na Amostra;

CFP = Concentração de Flavonoides no Padrão rutina;

R(%) = Recuperação obtida

Metodologia anatômica

Microscopia de luz e de fluorescência

Para a análise anatômica, lâminas foliares foram fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 50%, 1:1:18, v/v), por 24 horas para análise estrutural e em sulfato ferroso em formalina (SFF) (Johansen, 1940) para localização *in situ* de compostos fenólicos totais e em solução de Karnovsky por 48 horas para localização *in situ* de flavonoides (Karnovsky, 1965). O material foi mantido em bomba de vácuo durante a fixação, lavado e estocado em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário) (Johansen, 1940) e incluídas em Paraplast. O material foi seccionado transversalmente em micrótomo rotativo RM 1455 *Leica*, corados com Safranina e Azul de Astra (Gerlach, 1969) e as lâminas montadas em resina sintética.

Testes para a localização *in situ* de flavonoides foram efetuados em material tratado com solução de cloreto de alumínio (1% em metanol) (Charrière-Ladreix, 1976) e reagente natural A (ácido difenilbórico 2-aminoetiléster, 1% em metanol) (Wollenweber, 1982; Schnitzler *et al.*, 1996) por 5 minutos e lavados repetidamente em metanol.

Observações das secções sem tratamento sob luz branca, UV e azul foram realizadas previamente para caracterizar o branco e a autofluorescência dos compostos (Charrière-Ladreix, 1976). O controle dos testes para detecção de flavonoides foi efetuado pelo tratamento prévio das peças com uma mistura etanol/ácido clorídrico 1% (9:1 v:v) à temperatura ambiente (modificado de Harborne) (Harborne, 1973).

Observações sob fluorescência nas bandas do UV e azul foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com lâmpada de mercúrio (HBO 100W) e filtros bloqueadores BA420 e BA515 (filtros de excitação BP330-385, BP450-480 e espelho dicromático DM400 e DM500, respectivamente).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da quantificação de flavonoides nas folhas de *M. linifera* obtido neste trabalho foi de $57,42 \pm 12,65$ µg/mL que em termos percentuais representa 0,14%, ou seja, 0,14 g de flavonoides/100 g de amostra. Este valor foi próximo ao encontrado na uva (fruto), *Vitis labrusca*, (0,18%) (Abe *et al.*, 2007) e superior ao encontrado nas folhas do chá verde, *Camellia sinensis*, (0,11%) (Pereira *et al.*, 2009). Na Tabela 1 estão apresentados teores de flavonoides encontrados nestas e em outras espécies vegetais utilizadas tanto na medicina tradicional quanto na alimentação, para efeito de comparação.

Tabela 1. Teores de flavonoides em porcentagem (%) em diferentes espécies.

Espécie	Nome popular	Uso(s) tradicional(is)	Parte utilizada	TFT* (%)	Referência
<i>Camellia sinensis</i>	Chá verde	Emagrecedor	Folhas secas	0,11 %	28
<i>Psidium cattleyanum</i> Sabine var. <i>cattleyanum</i>	Araçá-vermelho	Alimentação	Fruto	2,9%	29
Própolis de <i>Apis mellifera</i> L.	Própolis	Cicatrizante, antiinflamatória	Resina	1,79 %	30
<i>Rubus eubatus</i>	Amora preta	Alimentação	Fruta fresca	0,23%	31
<i>Vitis labrusca</i>	Uva	Alimentação	Fruto	0,18%	27

*Teor de flavonoides totais

Os resultados indicam que são promissores futuros estudos fitoquímicos mais detalhados utilizando técnicas analíticas tais como espectrometria de RMN ¹H e ¹³C, cromatografia líquida e/ou

gasosa e espectrometria na região do infravermelho com a finalidade de se identificar, isolar e purificar os flavonoides detectados por espectrometria na região do UV-VIS presentes nas folhas de *M. linifera*.

Para a análise de especificidade do método proposto pode-se observar na Figura 2 o espectro obtido para o extrato de *M. linifera* e para a solução de Rutina, ambos na concentração de 18,0 µg/mL, na faixa compreendida entre 350–475 nm, sendo evidenciado apenas um pico de absorção máxima a 420 nm. Com isso, foi confirmado que neste comprimento de onda é possível quantificar especificamente o padrão para flavonoide e os contidos no extrato, mesmo na presença de impurezas.

O método espectrofotométrico apresentou linearidade a 420 nm para as concentrações estudadas (7,0 a 20,0 µg/mL). A equação da regressão linear média obtida a partir de três curvas de calibração foi:

$$y = 0,0236x - 0,0284$$

onde:

y= absorvância (nm)

x= concentração (µg/mL) em equivalentes de rutina (Figura 3).

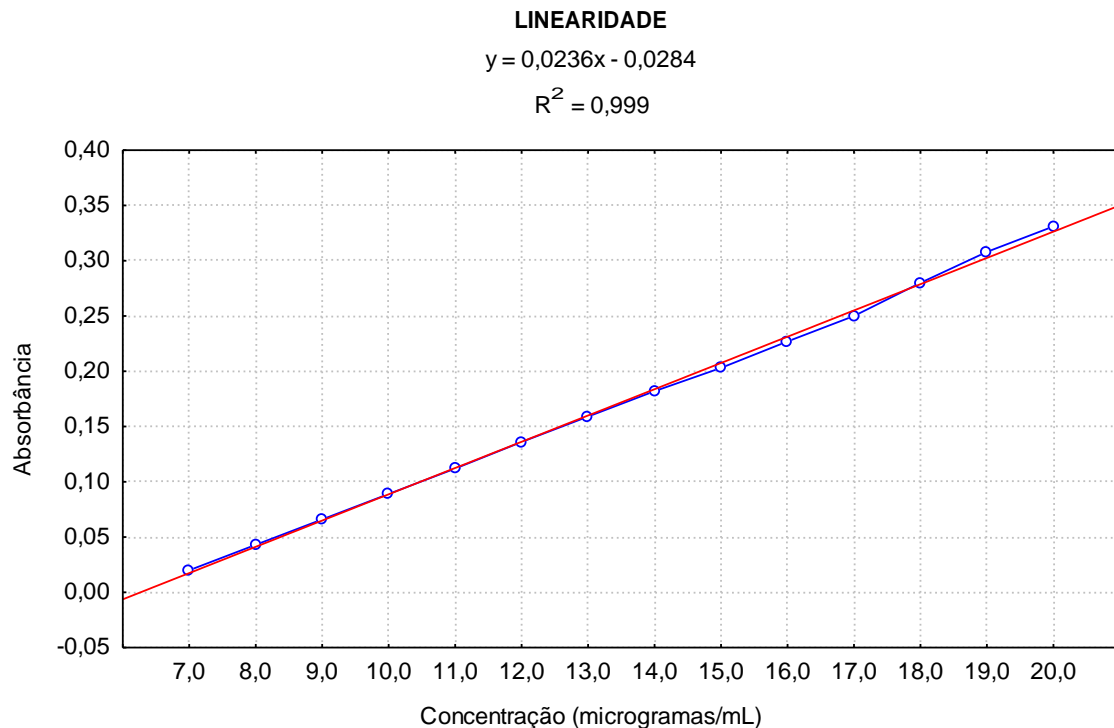


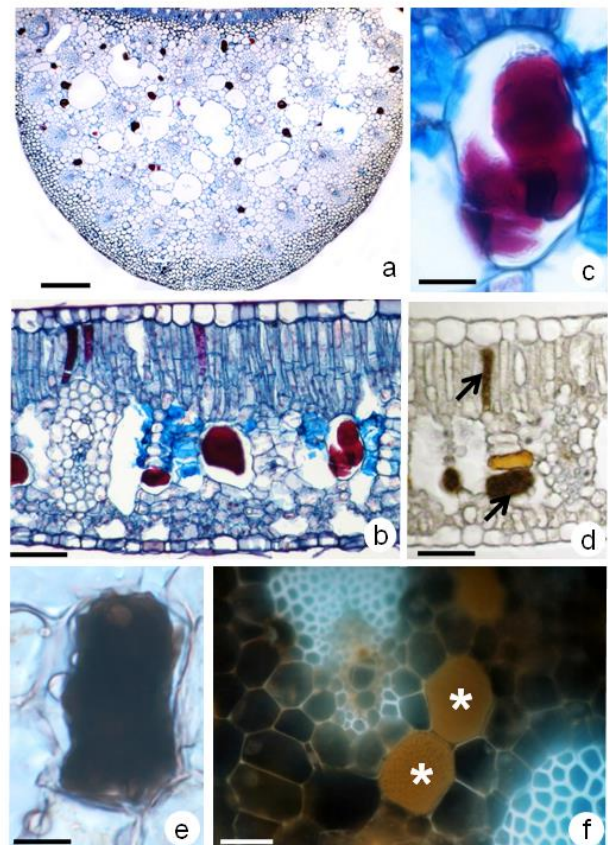
Figura 3. Especificidade do método construído com padrão Rutina (18,0µg/mL) e com o extrato metanólico obtido das folhas de *Montrichardia linifera* (Arr.) Schott (Aracaceae) (18,0 µg/mL). Amplitude compreendida entre 325 – 475 nm.

O coeficiente de determinação obtido foi $R^2 = 0,999$, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado (Brasil, 2003).

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados pelas equações 1 e 2, foram 0,12 $\mu\text{g/mL}$ e 0,42 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Com esses resultados, verifica-se que o método possui alta sensibilidade para detectar e quantificar o padrão, sem sofrer alteração de fatores intrínsecos do equipamento. As recuperações nas amostras foram próximas de 100% (86% - 99%), portanto situaram-se no intervalo considerado dentro dos critérios de aceitação deste tipo de método (80-120%) (Brasil, 2003), mostrando boa exatidão da metodologia proposta.

As estruturas secretoras onde os compostos fenólicos estão contidos são idioblastos, que estão dispersos ao longo da lâmina foliar. Na nervura central, os idioblastos estão nas proximidades dos feixes vasculares (Figura 4a), enquanto no mesofilo, estas estruturas localizam-se tanto no parênquima paliçádico, com idioblastos alongados, como no lacunoso, onde são isodiamétricos e mais conspícuos (Figura 4b, 4c). O material fixado em SFF reagiu positivamente para compostos fenólicos totais (Figura 4d, 4e). Diante da técnica da fluorescência foi possível detectar que parte dos compostos fenólicos totais localizados na lâmina foliar podem ser identificados como flavonoides (Figura 4f). Compostos fenólicos em idioblastos também foram encontrados no parênquima cotiledonar (Lins & Oliveira, 1994), no mesofilo e no tecido de revestimento de bainhas foliares de 3°, 4° e 5° nós (Macedo *et al.*, 2005), porém não foram dosados.

Figura 4. Secções transversais da lâmina foliar de *Montrichardia linifera*. **a.** vista geral da nervura central mostrando idioblastos dispersos (seta); **b.** vista geral do mesofilo com idioblastos nos parênquimas paliçádico (pp) e lacunoso (pl); **c.** detalhe do idioblasto; **d.** reação positiva para compostos fenólicos totais; **e.** detalhe do idioblasto com conteúdo fenólico; **f.** reação positiva para flavonoides nos idioblastos (asteriscos). Barras: 250 μm (a); 50 μm (b, d, f); 30 μm (c, e).



Os compostos fenólicos são uma grande classe de metabólitos secundários, que agregam várias outros compostos de natureza fenólica. Logo, neste estudo foram detectados compostos fenólicos totais e dentro desta grande classe foram detectados os flavonóides, como descrito na metodologia do presente estudo.

De acordo com Soares (2002) os compostos fenólicos nos vegetais têm sido bastante estudados por apresentarem ação farmacológica e antinutricional, inibindo a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Para Farah & Donangelo (2006) os compostos fenólicos estão envolvidos nos processos de adaptação, ou na defesa contra radiação ou contra agressão de patógenos. Braga *et al.* (2007), estudando as atividades anti-leishmaniose e antifúngicas de algumas plantas medicinais brasileiras, puderam concluir que a presença flavonóides em *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) possui forte relação com a sua atividade contra *Leishmania amazonensis*, e, principalmente com sua atividade antifúngica. Logo, há indícios de que a presença de tal metabólito na espécie em estudo possua semelhante atividade biológica.

CONCLUSÃO

Compostos fenólicos presentes nas folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) estão localizados nos idioblastos. Dentre estes compostos, um teor médio de 0,14% corresponde a flavonoides totais, apontando para um grande potencial em estudos fitoquímicos mais detalhados a fim de que se possa isolar e purificar flavonoides com possíveis atividades biológicas descritas na medicina popular. Considera-se este resultado com potencial para a pesquisa de novas moléculas ativas desta classe de substâncias a partir desta planta, as quais poderão também servir como marcadores quimiotaxonômicos no gênero *Montrichardia* Crüger, visto que este gênero ainda carece estudos desta natureza.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Pará (FAPESPA), ao Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e ao Instituto de Botânica de São Paulo (IBT-SP).

REFERÊNCIAS

Abe LT, Mota RV, Lajolo FM, Genovese MI. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ci. Tec. Alim.* 27(2): 394-400, 2007.

Amarante CB. *Estudo químico, farmacognóstico, atividade biológica e farmacológica de Montrichardia linifera (Arruda) Schott (Araceae)*. 2010. Belém-PA. 320p. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Pará. Belém.

Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 111: 396-402, 2007.

Brasil. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 25 jul. 2010.

Castro GT & Blanco SE. Structural and spectroscopic study of 5,7-dihydroxy-flavone and its complex with aluminum. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 60(10): 2235-2241, 2004.

Charrière-Ladreix Y. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta (Berl.)*, 129: 167-174, 1976.

Cornard JP & Merlin JC. Structural and spectroscopic investigation of 5-hydroxyflavone and its complex with aluminium. *J. Mol. Struct.* 569(1-3): 129-138, 2001.

Cornard JP & Merlin JC. Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. *Polyhedron.* 21: 2801-2810, 2002.

Costa ESS, Dolanela MF, Póvoa MM, Oliveira DJ, Muller AH. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19(4): 834-838, 2009.

Deng H & Van Berkel GJ. Electrospray mass specometry and UV/Visible spectrophotometry studies of aluminium (III) – flavonoid complexes. *J. Mass Spectrom.* 33(11): 1080-1087, 1998.

Farah A & Donangelo C M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1): 23-36, 2006.

Gerlach D. *Botanische Mikrotechnik: eine einföhrung*. Stuttgart: Georg Thieme, 1969. 331p.

Harborne, JB. *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall, 1973. p. 49-188.

Hassimotto NMA, Mota RV, Cordenusi BB, Lajolo FM. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* sp.) grown in Brazil. *Ci. Tec.. Aliment.* 28(3): 702-708, 2008.

Johansen DA. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 27: 137-138, 1965.

Lins ALFA. *Aspectos morfológicos e anatômicos de raízes do gênero Montrichardia Crüger. (Aracea)*. 1994. Porto Alegre-RS. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Lins ALFA & Oliveira PL. Origem, aspectos morfológicos e anatômicos das raízes embrionárias de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Aracaceae) (Aracea). *Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi.* 10(2): 221-236, 1994.

Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17(3): 99-105, 2007.

Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

Macedo EG, Santos Filho BG, Potiguara RCV, Santos DSB. Anatomia e arquitetura foliar de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Aracaceae) (Aracea) espécie da várzea amazônica. *Boletim do Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi.* 1(1): 19-43, 2005.

Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Bol. Cent. Biol. Reprod.* 27(1/2): 33-39, 2008

Markham KR. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press, 1982. 144 p.

Pereira AV, Almeida TC, Beltrame FL, Costa ME, Garrido LH. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Acta Scientiarum. Acta Scientiarum. Health Sci.* 31(2): 119-124, 2009.

Ramirez MR, Henriques AT, Raseira MCB, Zuanazzi JA. Estudo Fitoquímico das Frutas de *Psidium cattleianum* Sabine e *Eugenia pyriformis* Cambess. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 32, Fortaleza – Ceará, Brasil, 2009.

Robards K & Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Analyst.* 122:11-34, 1997.

Santos MD & Blatt CTT. Teor de flavonoides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Rev. Bras. Bot.* 21(2), 1998.

Schnitzler JP, Jungblut TP, Heller W, Köfferlein M, Hutzler P, Heinzmann U, Schmelzer E, Ernst D, Langebartels C, Sandermann Junior H. Tissue localization of u.v.-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytol.* 132(2): 247 – 258. 1996.

Silva AG. A importância de flavonoides na taxonomia de Monocotiledôneas. *Natureza on line*. 5(1): 44-47. 2007.

Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidants. *Rev. Nutrição*. 15(1): 71-81, 2002

Woisky RG. *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. 1996. São Paulo-SP. 74p. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos), Universidade de São Paulo. São Paulo.

Woisky RG & Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Research*. 37(2): 99-105, 1998.

Wollenweber E. Flavones and flavonols. In: Harborne JB, Mabry TJ. *The flavonoids: advances in research*. London: Chapman and Hall, p.189–259.

Wollgast J & Anklan E. Review in polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6): 423-447, 2000.

Zuanazzi JAS. Flavonoides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2000. p.489-516.

.