

VICTOR PEÇANHA DE MIRANDA COELHO

**ANATOMIA FOLIAR, PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Ficus* SUBGÊNERO *Pharmacosycea*
(Miq.) Miq. (MORACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C672a
2013

Coelho, Victor Peçanha de Miranda, 1980-
Anatomia foliar, prospecção fitoquímica e da atividade
antioxidante de extratos de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*
(Miq.) Miq. (Moraceae) / Victor Peçanha de Miranda Coelho.
– Viçosa, MG, 2013.
viii, 69 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Marília Contin Ventrella.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

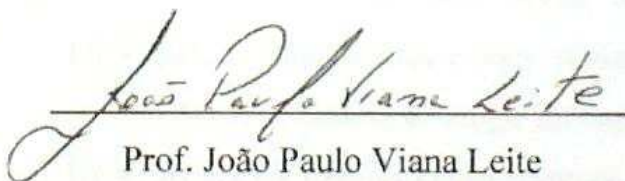
1. *Ficus* - Anatomia. 2. Química vegetal. 3. Histoquímica.
4. Antioxidantes. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Botânica . II. Título.

CDD 22. ed. 583.45

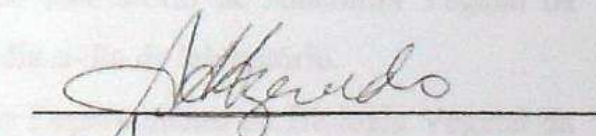
ESTUDO ANATÔMICO, FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE *Ficus* SUBGEN. *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. (MORACEAE) DO BRASIL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

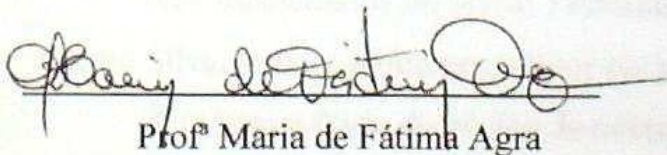
APROVADA: 01 de julho de 2013



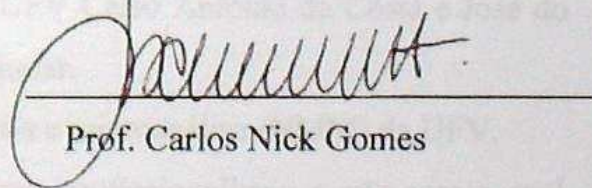
Prof. João Paulo Viana Leite
(Coorientador)



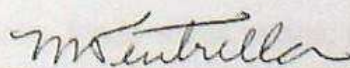
Prof.^a Aristéa Alves Azevedo
(Coorientadora)



Prof.^a Maria de Fátima Agra



Prof. Carlos Nick Gomes



Prof.^a Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Vegetal, por me oferecerem condições para realização do doutorado em Botânica.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Botânica da UFV, por terem compartilhado tanto conhecimento.

À CAPES pela bolsa concedida e financiamento do “PNADB-*Pharmacosycea*”.

À Prof^a. Dr^a. Marília Contin Ventrella, pela orientação, confiança, apoio, respeito, compreensão e amizade durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. João Paulo Viana Leite, pela coorientação e por todo apoio e incentivo.

À Prof^a. Dr^a. Aristéa Alves Azevedo, pela coorientação e por todo apoio e incentivo.

Aos estagiários Mateus, Carol, Thaline, Andrea e Isadora por todo apoio para a execução desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pelos ensinamentos dentro e fora da academia, além da confiança, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Sergio Romaniuc Neto e os demais amigos do Instituto de Botânica de São Paulo: Leandro, André, Gisela e Alessandra pelas valiosas sugestões, apoio, incentivo, ajuda nas coletas e principalmente pelos bons momentos juntos.

Ao Prof. Dr. Josean Tavares da UFPB, por todo apoio e incentivo.

À Prof^a. Dr^a. Milene Vieira da UFV, por todo apoio e incentivo.

À Aurora, Patrícia e Nívea, técnicas do laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, pelos ensinamentos e bons momentos no dia-a-dia do laboratório.

Ao funcionário e amigo da secretaria do Departamento de Biologia Vegetal da UFV: Ângelo Valentim Lopes, sempre muito eficiente e atencioso.

Aos funcionários do Horto Florestal da UFV Celso Antônio da Costa e José do Carmo Silva, sempre muito prestativos em me ajudar.

À Gilmar e Carla do núcleo de microscopia e microanálise (NMM) da UFV.

Ao Ilustrador Reinaldo Pinto pela destreza, profissionalismo e arte com a qual ilustrou esse trabalho.

À Mychelle Carvalho, minha mulher, companheira, amiga e cúmplice! Sempre me incentivando a terminar a tese, lendo meus textos, me ajudando em casa e em tudo mais que tenha feito na vida desde que estamos juntos.

Ao companheiro Raul Carvalho pelo ensino diário de como me tornar uma pessoa melhor e bons momentos de convívio!

Aos meus irmãos Artur e Hugo, por todo amor, dedicação e pelo apoio nas horas mais difíceis de minha vida.

Aos meus pais Jairo Artur (*in memoriam*) e Elaine Peçanha por todo amor, dedicação e pelo incentivo.

Ao amigo e professor fluminense Pedro Paulo de Souza, por tornar o trabalho em grupo agradável e muito mais produtivo e acima de tudo os ensinamentos na “arte da vida”.

Ao amigo Hugo Rody, um irmão em Viçosa, além da inestimável ajuda para realização desse trabalho.

À Lays Neri amiga e incentivadora, da qual tenho grande admiração.

Aos amigos mineiros Advanio Inácio S. da Silva e Joseane Bessa Barbosa pelo companheirismo e ajuda nas atividades do laboratório de anatomia.

Aos amigos de Pós-graduação Clébio, Daniel, Tiago, Luiz, Reinaldo e Bruno, pelos bons momentos de convívio e aprendizado.

Às amigas da Pós-graduação Carol (todas elas!), Gláucia, Claudinéia, Talita, Rúbia e Luana pelos bons momentos de convívio e aprendizado.

Aos amigos paraibanos Ailton (Preto), Arlindo, Kiriaki, Natália, Naiara, Rafael, Ionaldo, Emerson e Ricardo pelos bons momentos juntos e por todo incentivo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho, meus respeitos e sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

VICTOR PEÇANHA DE MIRANDA COELHO, filho de Jairo Artur de Miranda Coelho (*in memoriam*) e Elaine Peçanha de Miranda Coelho, nasceu em João Pessoa, Paraíba, no dia 29 de maio de 1980.

Completo o primeiro grau no Colégio ECO em João Pessoa, Paraíba, em dezembro de 1996 e o Segundo Grau no Colégio Anglo da mesma cidade, em dezembro de 1999.

Em agosto de 2001 ingressou no Curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, graduando-se em setembro de 2006.

Em março de 2007 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se a defesa da dissertação no dia 17 de fevereiro de 2009.

Em março de 2009 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Botânica, na mesma instituição, submetendo-se a defesa da tese no dia 01 de julho de 2013.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Anatomia aplicada à taxonomia de <i>Ficus</i>	1
1.2. Estudos químicos e atividades biológicas em <i>Ficus</i>	3
2. JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DA TESE	4
3. OBJETIVOS	4
4. ORGANIZAÇÃO DA TESE	5
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO I: Anatomia foliar aplicada à taxonomia de <i>Ficus</i> subgênero <i>Pharmacosycea</i> seção <i>Pharmacosycea</i> (Moraceae)	10
RESUMO	10
INTRODUÇÃO	11
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II: Estudo histoquímico, fitoquímico e potencial antioxidante de extratos de folhas de <i>Ficus</i> subgênero <i>Pharmacosycea</i> (Miq.) Miq. (Moraceae)	44
RESUMO	44
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	46
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6. CONCLUSÕES GERAIS	68

RESUMO

COELHO, Victor Peçanha de Miranda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Anatomia foliar, prospecção fitoquímica e da atividade antioxidante de extratos de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. (Moraceae).** Orientadora: Marília Contin Ventrella. Coorientadores: Aristéa Alves Azevedo e João Paulo Viana Leite.

As dificuldades encontradas na identificação e delimitação das espécies do subgênero *Pharmacosycea* podem ser mitigadas com a associação de estudos anatômicos das folhas à taxonomia convencional. Soma-se a isso, a importância medicinal e farmacológica de *Ficus* que deve ser melhor investigada nas espécies brasileiras, onde os estudos são voltados, sobretudo, para à investigação de suas propriedades vermífugas. Os objetivos deste trabalho foram: (1) realizar o estudo anatômico das folhas das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, visando à seleção de caracteres úteis para a taxonomia do grupo; (2) realizar o estudo histoquímico das folhas e a prospecção fitoquímica e da atividade antioxidante de extratos de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. O estudo anatômico foliar dessas espécies e as análises fenéticas conduzidas neste trabalho confirmam a importância da anatomia da folha como subsídio para taxonomia de *Ficus*. Mais da metade das espécies do subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* poderão ser reconhecidas em fase vegetativa a partir desse trabalho. A ausência de monocristais prismáticos e de fibras pericíclicas anteriormente apontadas como diagnósticas para o subgênero *Pharmacosycea* são inconsistentes. Não foi possível separar as espécies estudadas nas subseções *Bergianae* e *Petenenses* a partir do contorno e distribuição dos feixes vasculares do pecíolo como proposto na literatura. A presença de epiderme lisa e de periderme que descama, foram as únicas características anatômicas que deram suporte à subdivisão da seção *Pharmacosycea* nas subseções *Bergianae* e *Petenenses*, respectivamente. O número e distribuição dos cordões de floema na medula do pecíolo e da nervura principal são características anatômicas promissoras para a taxonomia da seção *Pharmacosycea*. Entretanto, devem ser avaliadas em um número maior de espécies para confirmar a validade das mesmas na taxonomia do subgênero *Pharmacosycea*, como também nos outros subgêneros e seções de *Ficus*. A composição química dos extratos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* estudadas mostrou-se bastante heterogênea, sendo taninos e flavonoides as únicas classes de substâncias que ocorrem

em todas as espécies. As análises histoquímicas demonstraram que os tricomas e o parênquima paliçádico são os principais sítios de acúmulo de fenólicos, enquanto os laticíferos são os principais sítios de acúmulo de proteínas, lipídios e terpenos. Os extratos etanólicos brutos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* estudadas são ricos em compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante. *F. piresiana* é a espécie mais promissora para estudos futuros relacionados ao potencial antioxidante de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* nativas do Brasil.

ABSTRACT

COELHO, Victor Peçanha de Miranda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Leaf anatomy, phytochemical and antioxidant activity of extracts of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. (Moraceae).** Adviser: Marília Contin Ventrella. Co-advisers: Aristéa Alves Azevedo and João Paulo Viana Leite.

The difficulties encountered in the identification and delimitation of species of the subgenus *Pharmacosycea* can be mitigated with combination of anatomical studies of leaves to conventional taxonomy. Added to this, the importance medicinal and pharmacological of *Ficus* which should be further investigated in the Brazilian species, where studies are directed mainly to the investigation of their anthelmintic properties. The aims of this study were: (1) perform the anatomical study of the leaves of *Ficus* species subgenus *Pharmacosycea* aimed at the selection of useful characters for the taxonomy of the group, (2) perform histochemical study of the leaves, phytochemical and antioxidant activity of extracts of species of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea*. The anatomical study of these species and phenetic analyzes conducted in this study confirm the importance of leaf anatomy as a basis for taxonomy of *Ficus*. More than half of the species of the subgenus *Pharmacosycea* section *Pharmacosycea* may be recognized in the vegetative phase from that work. The absence of single crystals prismatic and pericyclic fibers previously identified as diagnostic of the subgenus *Pharmacosycea* are inconsistent. Unable to distinguish the species studied in subsections *Bergianae* and *Petenenses* from contour and distribution of the vascular bundles of the petiole as proposed in the literature. The presence of smooth epidermis and periderm, were the only anatomical features that supported the subdivision of section *Pharmacosycea* in subsections *Bergianae* and *Petenenses* respectively. The number and distribution of phloem in the medulla of the petiole and midrib anatomical features are promising for taxonomy section *Pharmacosycea*. However, should be evaluated in a larger number of species to confirm their validity in the taxonomy of the subgenus *Pharmacosycea*, but also in other subgenera and sections of *Ficus*. The chemical composition of the extracts of six species of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* studied proved to be very heterogeneous, tannins and flavonoids are the only classes that occur in all species. Histochemical analyzes showed that trichomes and palisade parenchyma are the main sites of accumulation of phenolics, while the laticiferous are the main sites of accumulation of proteins, lipids and terpenes. The crude ethanol extracts of six species

of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* studied are rich in phenolic compounds that exhibit antioxidant activity. *F. piresiana* is the species most promising for future studies related to the antioxidant potential of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* native Brazil.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Anatomia aplicada à taxonomia de *Ficus*

Moraceae Gaudich. possui 37 gêneros e cerca de 1.100 espécies, distribuídas por todas as regiões tropicais e temperadas do mundo (Clement e Weiblen 2009). No neotrópico ocorrem 19 gêneros e cerca de 270 espécies. O hábito arbóreo se destaca dentro da família, mas também existem representantes hemiepífitos, lianas, arbustos e ervas (Berg 2001).

Corner (1958, 1962) propôs classificações de Moraceae que serviram como base para a proposta de classificação de Berg (1989a), que dividiu a família em cinco tribos: *Ficeae*, *Castilleae*, *Dorstenieae*, *Moreae* e *Artocarpeae*. A tribo *Ficeae* constitui um grupo monofilético e monogenérico, representada pelo gênero *Ficus* L. (Corner 1962, Weiblen 2000, Datwyler e Weiblen 2004, Clement e Weiblen 2009). No presente trabalho foi adotada a classificação de Berg (1989b) que dividiu *Ficus* em quatro subgêneros: *Ficus*, *Sycomorus*, *Urostigma* e *Pharmacosycea*, sendo as espécies brasileiras pertencentes aos dois últimos.

O subgênero *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. possui cerca de 70 espécies divididas em duas seções: *Pharmacosycea* seção *Oreosycea* (Miq.) Corner, com cerca de 50 espécies paleotropicais e *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* (Miq.) Benth & Hook f., com cerca de 20 espécies neotropicais (Berg 1989b). Carvajal e Shabes (1998) propuseram a subdivisão da seção *Pharmacosycea* em duas subseções: *Bergianae* e *Petenenses*.

Ainda não há consenso sobre quantas espécies do subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* existem no Brasil. Na *Flora brasiliensis*, Miquel (1853) descreveu nove espécies para o Brasil: *Pharmacosycea radula*, *P. anthelminthica*, *P. adhatodaefolia*, *P. perforata*, *P. obtusiuscula*, *P. vermifuga*, *P. grandaeva*, *P. laurifolia* e *P. guyanensis*. Posteriormente, Carauta (1989) aceitou apenas cinco espécies para o Brasil, incluindo-as no gênero *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*: *F. insipida*, *F. maxima*, *F. obtusiuscula*, *F. piresiana* e *F. pulchella*. Posteriormente, Carauta e Diaz (2002) estimaram oito espécies para o Brasil, mas não citam todas as espécies em seu trabalho. O dado mais recente é de Romaniuc Neto *et al.* (2010), que listaram sete espécies de *Pharmacosycea* no catálogo de plantas e fungos do Brasil: *F. adhatodifolia*, *F. insipida*, *F. maxima*, *F. obtusiuscula*, *F. piresiana*, *F. pulchella* e *F. nevesiae*. Outro fator

complicador para a taxonomia do grupo relaciona-se às espécies consideradas válidas e seus sinônimos. Para as 70 espécies do subgênero *Pharmacosycea* listadas em todo mundo (Berg 1989b) são citados cerca de 140 binômios, dos quais cerca de 70 binômios são referidos para as espécies brasileiras, grande parte sinonímias (Romaniuc Neto, comunicação pessoal). Fica claro que existe confusão na taxonomia de *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea*, principalmente nas espécies que ocorrem no Brasil, como é o caso de *Ficus insipida*, *F. adhatodifolia* e *F. nevesiae*, que apresentam dificuldade de circunscrição, sendo bastante confundidas entre si. Destas, *F. adhatodifolia* tem sido tratada como uma espécie sem delimitação muito clara, sendo sinonimizada com *F. insipida* (Mendonça-Souza 2006, Santos 2010). Já *F. nevesiae* é uma espécie nativa, ameaçada de extinção, descrita por Carauta (2002) e considerada como sinônimo de *F. adhatodifolia* por Berg e Villavicencio (2004).

A maioria dos trabalhos com anatomia foliar de *Ficus* contemplam as espécies do subgênero *Urostigma* ou espécies que não são nativas do Brasil (Mello Filho 1963; Mello Filho e Nolla Leitão 1975; Mello Filho e Neves 1976; 1978; 1982; 1989; Mello Filho *et al.* 1983; Neves 1981; 1987; Neves e Mello Filho 1986; Neves *et al.* 1991; 1993; 2002; Sharawy 2004). Em relação ao subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* destacam-se os trabalhos de Carvajal e Shabes (2006) e Carvajal (2012) que aplicaram caracteres anatômicos do pecíolo à taxonômica de *Ficus*. Segundo esses autores, as características mais informativas do pecíolo foram: contorno, distribuição e estrutura do sistema vascular, presença ou ausência de tecido mecânico (colênquima e esclerênquima) e pigmentação de células secretoras, contribuindo para a separação dos subgêneros *Pharmacosycea* e *Urostigma* e para criação de subseções e séries.

De maneira geral os estudos anatômicos têm revelado que a anatomia da folha é um dos elementos definidores e úteis na avaliação de similaridades e diferenças entre espécies no gênero *Ficus* (Mello Filho e Neves 1976, 1978; Mello Filho *et al.* 1983; Sharawy 2004; Carvajal e Shabes 2006). São também úteis para análise taxonômica de *Ficus* em nível subgenérico e específico, os litocistos, os laticíferos, as glândulas baselaminares e os tricomas (Metcalf e Chalk 1950, Sharawy 2004, Carvajal e Shabes 2006). Glândulas baselaminares estão localizadas na axila das nervuras laterais basais no subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* ou são acropeciulares no subgênero *Urostigma* seção *Americana*. Há carência de estudos anatômicos e histoquímicos relacionados a essas glândulas, que têm sido chamadas de glândulas de cera (Metcalf e Chalk 1950) ou de glândulas fenólicas (Pennisi *et al.* 1999).

A anatomia vegetal tem sido aplicada com sucesso à taxonomia de diversos grupos de plantas (Metcalf e Chalk 1950, Dickson 2000). Entretanto, em *Ficus*, a maioria dos estudos anatômicos aborda apenas espécies do subgênero *Urostigma*, havendo carência de dados anatômicos detalhados para as espécies do subgênero *Pharmacosycea*.

1.2. Estudos químicos e atividades biológicas em *Ficus*

Desde a antiguidade, as espécies de *Ficus* fazem parte da tradição cultural, religiosa e alimentícia de vários povos. Os ameríndios brasileiros já usavam figueiras nativas, em especial as espécies do subgênero *Pharmacosycea*, como fonte de remédio para o tratamento de verminoses. Nas figueiras do subgênero *Pharmacosycea* (*Ficus maxima*, *F. adhatodifolia*, *F. pulchella*, *F. obtusiuscula* e *F. insipida*) o látex é amargo e usado contra vermes. Em *Urostigma*, o outro subgênero com espécies nativas do Brasil, o látex é adocicado e também é usado contra vermes, destacando-se as espécies: *F. glabra*, *F. hirsuta*, *F. tomentella* e *F. gomelleira*. Por serem utilizadas no tratamento de verminoses, as figueiras desses subgêneros são designadas no Brasil por lombrigueiras (Carauta e Diaz 2002).

O gênero *Ficus* é uma fonte promissora para estudos químicos e farmacológicos do látex (Hagel *et al.* 2008) e desde a década de 60, trabalhos com isolamento e identificação de compostos naturais de *Ficus* estão sendo realizados no Brasil e no mundo (Carauta 1989, Carauta e Diaz 2002, Lansky *et al.* 2008). Em apenas 12 espécies de *Ficus* foram encontrados mais de 130 compostos naturais, sendo 37 triterpenoides, 22 flavonoides, 20 alcaloides, 11 cumarinas, sete esteróis e mais 33 outros compostos fenólicos, antocianinas e lectinas (Lansky *et al.* 2008).

Inúmeros trabalhos reportam usos e atividades biológicas do látex, ou de diferentes extratos de folhas ou mesmo de compostos isolados extraídos do látex ou de folhas de diferentes espécies de *Ficus*. Destacam-se as atividades: anti-helmíntica (*Ficus insipida*, Hansson *et al.* 1986; Amorin *et al.* 1999; Hansson *et al.* 2005), antineoplásica (*F. sycomorus*, Lansky *et al.* 2008; *Ficus microcarpa*, Chiang *et al.* 2005, *Ficus carica*, Rubnov *et al.* 2001), anti-inflamatória (*Ficus racemosa*, Mandal *et al.* 2000), hipoglicemiante/ antidiabética (*Ficus carica*, Serraclara *et al.* 1998; *Ficus bengalensis*, Singh *et al.* 2009; *Ficus religiosa*, Pandit *et al.* 2010; *Ficus glumosa*, Madubunyi *et al.* 2010), antifilarial (*Ficus racemosa*, Mishra *et al.* 2005), gastroprotetora (*Ficus racemosa*, Rao *et al.* 2008), cicatrizante, antidiarreica, analgésica

(*Ficus racemosa*, Joseph e Raj 2010), hipocolesterolêmica (*Ficus racemosa*, Joseph e Raj 2010), hepatoprotetora (*F. glomerata*, Channabasavaraj *et al.* 2008; *Ficus racemosa*, Joseph e Raj 2010), antidiurética (*Ficus racemosa*, Joseph e Raj 2010), antipirética (Bafor *et al.* 2010), antiulcerogênica (*Ficus exasperata*, Akah *et al.* 1998), na redução da pressão arterial (*Ficus exasperata*, Ayinde *et al.* 2007), sobre a musculatura lisa do útero (*Ficus exasperata*, Bafor *et al.* 2009; *Ficus capensis*, Owolabi *et al.* 2009; *Ficus asperifolia*, Watcho *et al.* 2010), antioxidante (*F. glomerata*, Channabasavaraj *et al.* 2008; *Ficus glumosa*, Madubunyi *et al.* 2010), antibacteriana (*Ficus benjamina*, Reschke *et al.* 2007) e na eliminação de verrugas (*Ficus carica*, Bohlooli *et al.* 2007).

Embora haja um número considerável de estudos químicos e farmacológicos envolvendo espécies do gênero *Ficus*, pouco se sabe a respeito das espécies do subgênero *Pharmacosycea* nativas Brasil, que são utilizadas na medicina popular. Assim, investigações fitoquímicas poderão contribuir para a caracterização química do grupo e para seleção das espécies mais promissoras para estudos farmacológicos.

2. JUSTIFICATIVA PARA REALIZAÇÃO DA TESE

As dificuldades encontradas na identificação e delimitação das espécies do subgênero *Pharmacosycea* podem ser mitigadas com a associação de estudos anatômicos das folhas à taxonomia convencional. Soma-se a isso a importância medicinal e farmacológica de *Ficus* que deve ser melhor investigada nas espécies brasileiras, onde os estudos estão voltados para a investigação de suas propriedades vermífugas. Por isso foi elaborado o subprojeto “Anatomia foliar, prospecção fitoquímica e da atividade antioxidante de extratos de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. (Moraceae)” que é parte integrante do projeto intitulado “Estudos etnobotânicos, taxonômicos, anatômicos, fitoquímicos, farmacológicos e agrônômicos de figueiras brasileiras (*Ficus* subgênero *Pharmacosycea* (Miq.) Miq.)”, aprovado em 04 de março de 2010 no edital PNADB N°17/2009 da CAPES.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Realizar estudo anatômico das folhas das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea*, visando à seleção de caracteres úteis para taxonomia do grupo;

- Realizar o estudo histoquímico das folhas e a prospecção fitoquímica e da atividade antioxidante de extratos de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar anatomicamente as folhas de 11 espécies do subgênero *Pharmacosycea*, identificando caracteres anatômicos úteis para a taxonomia e filogenia do grupo;
- Identificar caracteres anatômicos diagnósticos para todas as espécies estudadas, em especial para *Ficus insipida*, *F. adhatodifolia* e *F. nevesiae*, espécies bastante confundidas entre si;
- Elaborar uma chave dicotômica para o reconhecimento das espécies a partir de material vegetativo;
- Comparar as espécies estudadas por meio de análises estatísticas multivariadas aplicadas aos caracteres anatômicos;
- Realizar o estudo histoquímico das folhas;
- Realizar estudo fitoquímico de extratos das folhas;
- Identificar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos das folhas.

4. ORGANIZAÇÃO DA TESE

O presente trabalho encontra-se organizado em capítulos, como disposto nas normas de redação de teses da Universidade Federal de Viçosa.

O primeiro capítulo é referente à anatomia foliar de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* como ferramenta adicional à taxonomia. O segundo capítulo é referente ao estudo histoquímico das folhas e prospecção fitoquímica, conteúdo fenólico e potencial antioxidante dos extratos etanólicos de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akah PA, Orisakwe OE, Gamaniel KS e Shittu A. 1998. Evaluation of Nigerian traditional medicines II: effects of some Nigerian folk remedies on peptic ulcer. **Journal of Ethnopharmacology** **62**: 123-127.
- Amorin A, Borba HR, Carauta JPP, Lopes D e Kaplan MAC. 1999. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. **Journal of Ethnopharmacology** **64**: 255-258.
- Ayinde BA, Omogbai EKI e Amaechina FC. 2007. Pharmacognosy and hypotensive evaluation of *Ficus exasperata* Vahl (Moraceae) leaf. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research** **64**(6): 543-546.
- Bafor EE, Omogbai EKI e Ozolua RI. 2009. Evaluation of the uterotonic activity of the leaf extract of *Ficus exasperata* in rats. **Research Journal of Medicinal Plants** **3**: 34-40.
- Bafor EE, Uwumarongie HO e Idiake JO. 2010. Antipyretic effects of the aqueous, ethyl acetate and hexane leaf extracts of *Ficus exasperata* (Moraceae) in mice. **Journal of Thermal Biology** **35**: 275-279.
- Berg CC. 2001. *Moraceae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae) - with introduction to the family and Ficus and with additions and corrections to Flora Neotropica Monograph 7*. New York, The New York Botanical Garden. 347p.
- Berg CC. 1989a. Systematics and phylogeny of the Urticales. In: Crane, P.R. e Blackmore, S. (eds.) **Evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae 2, 'Higher' Hamamelidae**. Oxford, Clarendon Press. pp. 193-220.
- Berg CC. 1989b. Classification and distribution of *Ficus*. **Experientia** **45**: 605-611.
- Berg CC e Villavicencio X. 2004. Taxonomic studies on *Ficus* (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil, and Bolivia. **Illicifolia** **5**: 1-132.
- Bohlooli S, Mohebipoor A, Mohammadi S, Kounhavard M e Pashapoor S. 2007. Comparative study of fig tree efficacy in the treatment of common warts *Verruca vulgaris* vs. cryotherapy. **International Journal of Dermatology** **46**: 524-526.
- Carauta JPP. 1989. *Ficus* (Moraceae) no Brasil: conservação e taxonomia. **Albertoa** **2**: 365p.
- Carauta JPP. 2002. *Ficus nevesiae* Carauta (Moraceae) nova espécie e ameaçada de extinção. **Albertoa** **10**: 65-67.
- Carauta JPP e Diaz BE. 2002. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro, Editora UFRJ. 212p.
- Carvajal S e Shabes LK. 1998. Two new subsections of American species of the genus *Ficus* L. (Moraceae) Subgenus *Pharmacosycea* Miq. Section *Pharmacosycea*. **Boletín IBUG** **6**: 213-217.
- Carvajal S e Shabes LK. 2006. Estructura anatómica de los pecíolos de especies americanas del género *Ficus* L. (Moraceae). **Boletín IBUG** **13**(1): 49-66.

Carvajal S. 2012. Sistema para la familia Moraceae en México. **Ibugana 3**: 3-103.

Channabasavaraj KP, Badami S e Bhojraj S. 2008. Hepatoprotective and antioxidant activity of methanol extract of *Ficus glomerata*. **Journal of Natural Medicines 62**: 379-383.

Chiang Yi-Ming, Chang Jang-Yang, Kuo Ching-Chuan, Chang Chi-Yen e Kuo Yueh-Hsiung. 2005. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. **Phytochemistry 66**: 495-501.

Clement WL e Weiblen GD. 2009. Morphological Evolution in the Mulberry Family (Moraceae). **Systematic Botany 34**(3): 530-552.

Corner EJH. 1958. An introduction to the distribution of *Ficus*. *Reinwardtia* 4(3): 352-355.

Corner EJH. 1962. Classification of Moraceae. *Gard. Bull. Singapore* 19(2): 187-252.

Datwyler SL e Weiblen GD. 2004. On the origin of the Fig: phylogenetic relationships of Moraceae from NDHF sequences. **American Journal of Botany 91**(5): 767-777.

Dickson WC. 2000. **Integrative Plant Anatomy**. San Diego, Harcourt Academic Press.

Hagel JM, Yeung EC e Facchini PJ. 2008. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science 13**(12): 631-639.

Hansson A, Veliz G, Naquira C, Amren M, Arroyo M e Arevalo G. 1986. Preclinical and clinical studies with latex from *Ficus glabrata* HBK, a traditional intestinal anthelmintic in the Amazonian area. **Journal of Ethnopharmacology 17**(2): 105-138.

Hansson A, Zelada JC e Noriega HP. 2005. Reevaluation of risks with the use of *Ficus insipida* latex as a traditional anthelmintic remedy in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology 98**: 251-257.

Joseph B e Raj SJ. 2010. Phytopharmacological properties of *Ficus racemosa* Linn - an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 3**(2): 134-138.

Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD e Newman RA. 2008. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology 119**: 195-213.

Madubunyi II, Onoja SO e Asuzu IU. 2010. In vitro antioxidant and in vivo antidiabetic potential of the methanol extract of *Ficus glumosa* Del (Moraceae) stem bark in alloxan-induced diabetic mice. **Comparative Clinical Pathology 19**: 1-6.

Mandal SC, Maity TK, Das J, Saba BP e Pal M. 2000. Anti-inflammatory evaluation of *Ficus racemosa* Linn. leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology 72**: 87-92.

Mello Filho LE. 1963. **Introdução ao Estudo do Gênero *Ficus* (Moraceae) da Guanabara e arredores**. Tese, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade do Estado da Guanabara, Rio de Janeiro. 51f.

- Mello Filho LE e Neves LJ. 1976. Sobre a anatomia foliar de *Ficus sagittifolia* Warb. Ex Mildbraed & Burret. **Revista Brasileira de Biologia** 36 (1): 139-156.
- Mello Filho LE e Neves LJ. 1978. Sobre a anatomia foliar de *Ficus lyrata* Warb. **Revista Brasileira de Biologia** 38 (2): 431-444.
- Mello Filho LE e Neves LJ. 1982. Anatomia foliar de *Ficus religiosa* L. **Bradea** 3(33): 261-272.
- Mello Filho LE e Neves LJ. 1989. Anatomia foliar de *Ficus organensis* (Miq.) Miq. **Bradea** 5 (15): 156-165.
- Mello Filho LE e Nolla Leitão MM. 1975. Contribuição a anatomia foliar de *Ficus nymphaeifolia* L. **Revista Brasileira de Biologia** 35 (1): 141-153.
- Mello Filho LE, Neves LJ e Caldas RLS. 1983. Anatomia foliar de *Ficus microcarpa* L.f. **Bradea** 3(44): 387-398.
- Mendonça-Souza LR. 2006. *Ficus (Moraceae) no Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. 140f.
- Metcalf CR e Chalk L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**. v. 2. Oxford, Clarendon Press.
- Miquel FAG. 1853. Urticineae. In: Von Martius CFP, Eichler AW e Urban I. **Flora brasiliensis**. Munchen, Wien, Leipzig 4: 77-218.
- Mishra V, Khan NU e Singhal KC. 2005. Potential antifilarial activity of fruit extracts of *Ficus racemosa* Linn. against *Setaria cervi* in vitro. **Indian Journal of Experiment Biology** 43: 346-350.
- Neves LJ. 1981. Origem e classificação dos esclerócitos foliares em espécies de *Ficus* no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional** 56: 185-212.
- Neves LJ. 1987. **Morfologia, desenvolvimento e anatomia de *Ficus tomentella* Miq. (Moraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 285f.
- Neves LJ e Mello Filho LE. 1986. Anatomia foliar de *Ficus benjamina* L. **Bradea** 4(37): 295-304.
- Neves LJ, Isaias RMS e Mello Filho LE. 1993. Estudo anatômico da folha de *Ficus elliotiana* Sp. Moore. **Bradea** 6(22): 196-204.
- Neves LJ, Mello Filho LE e Carauta JPP. 2002. Anatomia de *Ficus* (Moraceae) Aplicada à Taxonomia. **Albertoa Série Urticineae** 7: 45-51.
- Neves LJ, Mello Filho LE, Fernandes LDRS e Ferreira AK. 1991. Anatomia foliar de *Ficus semicordata* B. Ham. Ex J.E. Smith. **Bradea** 5(50): 479-496.
- Owolabi OJ, Nworgu ZA, Falodun A, Ayinde BA e Nwako CN. 2009. Evaluation of tocolytic activity of ethanol extract of the stem bark of *Ficus capensis* Thunb. (Moraceae). **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research** 66(3): 293-296.

- Pandit R, Phadke A e Jagtapa A. 2010. Antidiabetic effect of *Ficus religiosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology** **128**: 462-466.
- Pennisi SV, Mcconnell DB e Henlev RW. 1999. Occurrence and development of a dorsal gland in leaves of *Ficus benjamina* L. (Weeping Fig) cultivars. **HortScience A** **34**(6): 1051-1053.
- Rao CV, Verma AR, Vijayakumar M e Rastogi S. 2008. Gastroprotective effect of standardized extract of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology** **115**: 323-326.
- Reschke A, Marques LM e Mayworm MAS. 2007. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicais** **9**(2): 67-70.
- Romaniuc-Neto S, Carauta JPP, Vianna-Filho MDM, Pereira RAS, Ribeiro JELS, Machado AFP, Dos Santos A e Pelissari G. 2010. Moraceae. In: Campostrini Forzza *et al.* (Orgs.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. vol 2. Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Rubnov S, Kashman Y, Rabinowitz R, Schlesinger M e Mechoulam R. 2001. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. **Journal of Natural Products** **64**: 993-996.
- Santos OA. 2010. **Taxonomia e hipótese filogenética da seção Americana, subgênero Urostigma, gênero Ficus L. (Moraceae)**. Tese de Doutorado, INPA/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 101f.
- Serraclara A, Hawkins F, Peez C, Dominguez E, Campillo JE e Torres MD. 1998. Hypoglycemic action of an oral fig-leaf decoction in type-1 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice** **39**: 19-22.
- Sharawy SM. 2004. Numerical taxonomic evaluation of calcium oxalate and calcium carbonate crystals in the leaves of certain *Ficus* species (Moraceae). **Feddes Repertorium** **115**(5-6): 441-452.
- Singh RK, Mehta S, Jaiswal D, Rai PK e Watal G. 2009. Antidiabetic effect of *Ficus bengalensis* aerial roots in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology** **123**: 110-114.
- Watcho P, Ngadjui E, Nkeng-Efouet PA, Nguelefack TB e Kamanyi A. 2010. Evaluation of *in vitro* uterotonic activities of fruit extracts of *Ficus asperifolia* in rats. **eCAM**: 1-7.
- Weiblen GD. 2000. Phylogenetic relationships of functionally dioecious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology. **American Journal of Botany** **87**(9): 1342-1357.

CAPÍTULO I

ANATOMIA FOLIAR APLICADA À TAXONOMIA DE *Ficus* SUBGÊNERO *Pharmacosycea* SEÇÃO *Pharmacosycea* (MORACEAE)

RESUMO: As dificuldades encontradas na identificação e delimitação das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* podem ser mitigadas com a associação de dados anatômicos das folhas à taxonomia convencional. Além disso, a criação de duas novas subseções na seção *Pharmacosycea* a partir de caracteres anatômicos levou à procura de novas características que ampliassem a circunscrição desses táxons, como também se faz necessário avaliar a ocorrência das características anatômicas já existentes em mais espécies. Os objetivos desse trabalho foram verificar a consistência das características anatômicas já aplicadas à taxonomia da seção *Pharmacosycea*, indicar outras que contribuam para esclarecer problemas taxonômicos existentes, como também eleger caracteres anatômicos diagnósticos que facilitem a identificação das espécies em material estéril. O estudo anatômico foliar e as análises fenéticas conduzidas neste trabalho confirmam a importância da anatomia da folha como subsídio para taxonomia de *Ficus*. Mais da metade das espécies do subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* poderão ser reconhecidas em fase vegetativa a partir desse trabalho. A ausência de monocristais prismáticos e de fibras pericíclicas anteriormente apontadas como diagnósticas para o subgênero *Pharmacosycea* são inconsistentes. Do mesmo modo, não foi possível separar as espécies estudadas nas subseções *Bergianae* e *Petenenses* a partir do contorno e distribuição dos feixes vasculares do pecíolo como proposto na literatura. A presença de epiderme lisa e de periderme que descama, foram as únicas características anatômicas que deram suporte à subdivisão da seção *Pharmacosycea* nas subseções *Bergianae* e *Petenenses*, respectivamente. O número e distribuição dos cordões de floema na medula do pecíolo e da nervura principal são características anatômicas promissoras para a taxonomia da seção *Pharmacosycea*. Entretanto, devem ser avaliadas em um número maior de espécies para confirmar a validade das mesmas na taxonomia do subgênero *Pharmacosycea*, como também nos outros subgêneros e seções de *Ficus*.

PALAVRAS-CHAVE: *Pharmacosycea*, *Bergianae*, *Petenenses*, UPGMA, PCA.

1. INTRODUÇÃO

Em *Ficus* são reconhecidos quatro subgêneros: *Ficus*, *Sycomorus*, *Urostigma* e *Pharmacosycea* (Berg 1989b), sendo as espécies brasileiras incluídas nos dois últimos. O subgênero *Pharmacosycea* tem cerca de 70 espécies, divididas em duas seções: *Pharmacosycea* seção *Oreosycea*, com cerca de 50 espécies paleotropicalis e *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea*, com cerca de 20 espécies neotropicais (Berg 1989a, b). Apesar de apenas 70 espécies terem sido relatadas para o subgênero *Pharmacosycea*, são citados 140 binômios, dos quais 70 binômios são referidos para as espécies brasileiras, a maior parte deles sinonímias (Romaniuc Neto, comunicação pessoal).

Na identificação das espécies de *Ficus*, leva-se em consideração o hábito, a forma do caule, as folhas, as estípulas e principalmente o sicônio (Carauta 1989). Em muitos casos, essas características se mostram insuficientes ou até mesmo inexistentes, o que geralmente dá margem a equívocos no momento da identificação da espécie (Bertoldo 1995). Além disso, algumas espécies de *Ficus* não apresentam sincronismo em suas fenofases, ocorrendo alguns indivíduos que permanecem um longo tempo sem floração e frutificação (De Souza 2002), fato que também dificulta a identificação.

Comparando a literatura que aborda as espécies brasileiras da seção *Pharmacosycea* (Miquel 1853, Carauta 1989, Carauta e Diaz 2002), fica evidente que ainda não há consenso sobre quantas espécies existem no Brasil, sendo o dado mais recente de Romaniuc Neto *et al.* (2010), que listaram 7 espécies: *F. adhatodifolia*, *F. insipida*, *F. maxima*, *F. obtusiuscula*, *F. piresiana*, *F. pulchella* e *F. nevesiae*. Entre elas, *F. adhatodifolia*, *F. insipida* e *F. nevesiae* apresentam dificuldade de circunscrição, sendo confundidas entre si, ou até mesmo consideradas sinônimo uma da outra (Berg e Villavicencio 2004, Mendonça-Souza 2006, Santos 2010).

A anatomia foliar de *Ficus* tem sido apontada como um dos elementos definidores e úteis na avaliação de similaridades e diferenças entre as espécies (Mello Filho e Neves 1976, 1978; Mello Filho *et al.* 1983, Sharawy 2004, Carvajal e Shabes 2006). Caracteres anatômicos do pecíolo como o tipo de cristal de oxalato de cálcio, presença ou ausência de fibras perivasculares e pigmentação de células secretoras têm sido apontados como excelentes fontes de dados para a separação dos subgêneros *Pharmacosycea* e *Urostigma*; outros caracteres anatômicos como o contorno e a distribuição dos feixes vasculares do pecíolo em corte transversal serviram como base para a subdivisão da seção *Pharmacosycea* em duas subseções: *Bergianae* e *Petenenses*

(Carvajal e Shabes 1998). Além da estrutura anatômica do pecíolo, litocistos, laticíferos, glândulas baselaminares e tricomas também são úteis na análise taxonômica de *Ficus* em nível subgenérico e específico (Metcalf e Chalk 1950, Sharawy 2004, Carvajal e Shabes 2006).

O estabelecimento de duas novas subseções na seção *Pharmacosycea* a partir de caracteres anatômicos levou à procura de novas características morfológicas que ampliassem a circunscrição desses táxons, tal como realizado por Berg (2006). Entretanto, também é necessário avaliar a ocorrência das características anatômicas já relatadas em um número maior de espécies do grupo. Além disso, a ampla sinonímia dificulta, sobremaneira, a correta identificação e aplicação dos binômios específicos criados a partir de descrições morfológicas.

Os objetivos desse trabalho foram verificar a consistência das características anatômicas já aplicadas à taxonomia de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea*; indicar outras características que contribuam para esclarecer problemas taxonômicos relatados na literatura e também eleger caracteres anatômicos diagnósticos que facilitem a identificação das espécies em material estéril.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e local de coleta

Foram realizadas coletas de folhas frescas de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* no Brasil e de material herborizado na Venezuela. As folhas frescas foram fixadas em FAA₅₀ (Johansen 1940) e os materiais herborizados foram submetidos ao processo de reversão de herborização (Smith & Smith 1942), ambos estocados em etanol 70%. Para as espécies com os maiores problemas de circunscrição (*Ficus insipida*, *F. adhatodifolia* e *F. nevesiae*) optou-se por comparar apenas materiais da região onde a coleção tipo foi coletada (Venezuela para *F. insipida* e Rio de Janeiro para *F. adhatodifolia* e *F. nevesiae*). A identificação das espécies foi realizada pelos especialistas Leandro Pederneiras e Sergio Romaniuc Neto do Instituto de Botânica de São Paulo (IBT-SP) e Pedro Paulo de Souza da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os materiais testemunho foram depositados nos Herbários VIC da UFV e SP do IBT-SP (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea*.

Nome científico	Município-UF	Voucher
<i>Ficus pulchella</i> Schott	Angra dos Reis-RJ	VIC 37046
<i>Ficus nevesiae</i> Carauta	Rio de Janeiro-RJ	SP 444342
<i>Ficus adhatodifolia</i> Schott ex Spreng.	Rio de Janeiro-RJ	SP 444343
<i>Ficus</i> sp.	Viçosa-MG	VIC 31644
<i>Ficus obtusiuscula</i> (Miq.) Miq.	Viçosa-MG	VIC 31713
<i>Ficus maxima</i> Mill.	Belém-PA	SP 443494
<i>Ficus piresiana</i> Vázq. & C.C. Berg	Belém-PA	SP 443493
<i>Ficus ernanii</i> Carauta <i>et al.</i> *	Entre Três forquilhas e Três cachoeiras-RS	R!
<i>Ficus whitei</i> Rusby	Seropédica-RJ	VIC 35854
<i>Ficus longistipula</i> Pittier**	Venezuela-Caracas	SP 443506
<i>Ficus insipida</i> Willd.**	Venezuela-Maracay	SP 443505

* material da coleção tipo, ** materiais herborizados.

2.2. Processamento das amostras

Para o estudo anatômico foram utilizadas folhas totalmente expandidas do 3° ao 5° nó coletadas a partir do ápice do ramo, em três indivíduos para os materiais coletados no campo e de um indivíduo para os materiais herborizados. Foram utilizadas porções do pecíolo, da nervura principal e da região entre a margem e a nervura principal, conforme amostragem representada no esquema da figura 1. Parte do material foi desidratado em série etanólica, incluído em metacrilato (Historesin, Leica, Nussloch, Heidelberg, Germany), cortado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica, Deerfield, Illinois, USA) com 5 µm de espessura, corado com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1964) e montado em resina sintética (Permout, Fisher, Fair Lawn, New Jersey, USA). Para avaliar se as características observadas no material incluído também poderiam ser observadas em material não incluído, outra parte do material foi cortada em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação Ltda), clarificado com hipoclorito de sódio 10%, corado com uma mistura de safranina e azul de astra e montado em gelatina glicerizada (lâminas semipermanentes).

As amostras da região entre a margem e a nervura principal foram utilizadas para o estudo da epiderme em microscopia de luz (ML). Essas amostras foram diafanizadas com hipoclorito de sódio 20% durante 3 a 5 dias ou submetidas à

dissociação de epiderme com solução de Jeffrey (Johansen 1940), coradas com fucsina 0,1% em solução alcoólica 50% e montadas em gelatina glicerinada.

As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger Alemanha) e microcomputador com o *software* de captura de imagens Axion Vision. Os cristais foram detectados pela birrefringência sob luz polarizada com mesmo microscópio equipado com lente de polarização.

Para o estudo de epiderme em microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras da região entre a margem e a nervura principal foram fixadas em FAA₅₀ por 48 h, desidratadas em série etanólica, secas em ponto crítico de CO₂ (CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) e metalizadas com ouro (FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). A análise e a captura de imagens foram realizadas com microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, UK).

A distribuição dos tecidos no pecíolo foi representada de acordo com as legendas propostas por Metcalfe e Chalk (1950). Para a classificação do contorno do pecíolo foi utilizada a diferença entre as medidas dos eixos x e y (Figura 1), sendo considerado oval quando essa diferença foi \geq que 1,3 e circular quando a diferença foi \leq que 1,0.

Os feixes vasculares do pecíolo foram classificados em arco ou anel de acordo com as descrições apresentadas por Hare (1944) e Carvajal e Shabes (2006) com algumas modificações. Foram classificados em arco, os feixes distribuídos como ferradura, normalmente massivos e, principalmente, com lacuna voltada para face adaxial que pode apresentar alguns cordões de floema ou apenas parênquima. Em anel foram classificados os feixes vasculares distribuídos em círculo, normalmente equidistantes, não massivos e, principalmente, sem lacuna voltada para face adaxial.

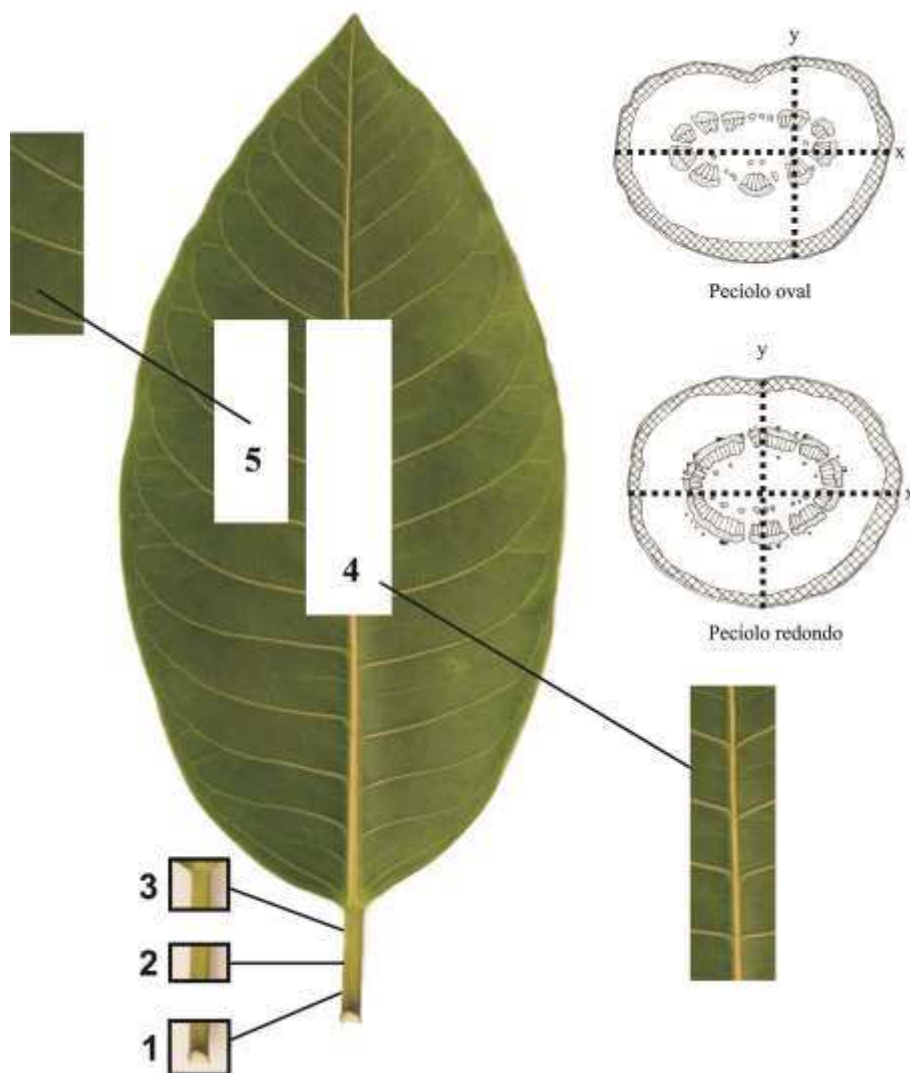


Figura 1. Esquemas representativos da amostragem realizada nas folhas das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* e medidas avaliadas para classificação do contorno do pecíolo. 1, 2 e 3. Amostras da base, meio e ápice do pecíolo, respectivamente. 4. Amostra da nervura principal na região mediana. 5. Amostra da região entre a margem e a nervura principal para estudo da epiderme.

2.3. Análises fenéticas

As folhas de todas as espécies estudadas foram caracterizadas anatomicamente e comparadas entre si, a partir de 40 características anatômicas descritas na matriz de presença e ausência (dados binários). A matriz foi inicialmente digitada no programa Microsoft Excel[®] e posteriormente exportada para o programa PAST versão 2.17 para realização de análises de agrupamento. Foram utilizados o método não hierárquico de análise de componentes principais (PCA) e o método hierárquico da ligação média não ponderada entre grupos (UPGMA) baseado na distância euclidiana.

3. RESULTADOS

3.1. Epiderme

Em vista frontal, as células epidérmicas ordinárias possuem paredes de contorno reto em ambas as faces da folha (Figura 2A e B) em todas as espécies estudadas. Em vista transversal, a epiderme é múltipla com duas ou três camadas em ambas as faces (Figura 2C, D, I e J); as exceções são *F. pulchella* (Figura 2H), *F. piresiana* e *F. maxima* que não apresentam epiderme múltipla na face abaxial. As células das camadas mais internas da epiderme múltipla possuem formato variado e normalmente são mais volumosas (Figura 2C). Os litocistos são alongados na face adaxial (Figura 2C) e arredondados na face abaxial (Figura 2D) das folhas; as exceções são *F. piresiana* que não possui litocistos na face adaxial e *F. longistipula* que possui litocistos alongados (Figura 2E) em ambas as faces da folha. Os litocistos apresentam projeções de parede voltadas para a superfície da folha que podem ter formato mamiloso (Figura 2F) ou de acícula (Figura 2G). As folhas são hipoestomáticas com estômatos do tipo anomocítico (Figura 2B, H-J). Os estômatos estão no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 2H) em três espécies ou abaixo do nível das demais células epidérmicas (Figura 2I e J) como na maioria das espécies e, normalmente, apresentam cristas estomáticas (Figura 2H-J) (Tabela 2). Os estômatos de *F. whitei* (Figura 2J) são os mais profundos entre todas as espécies analisadas.

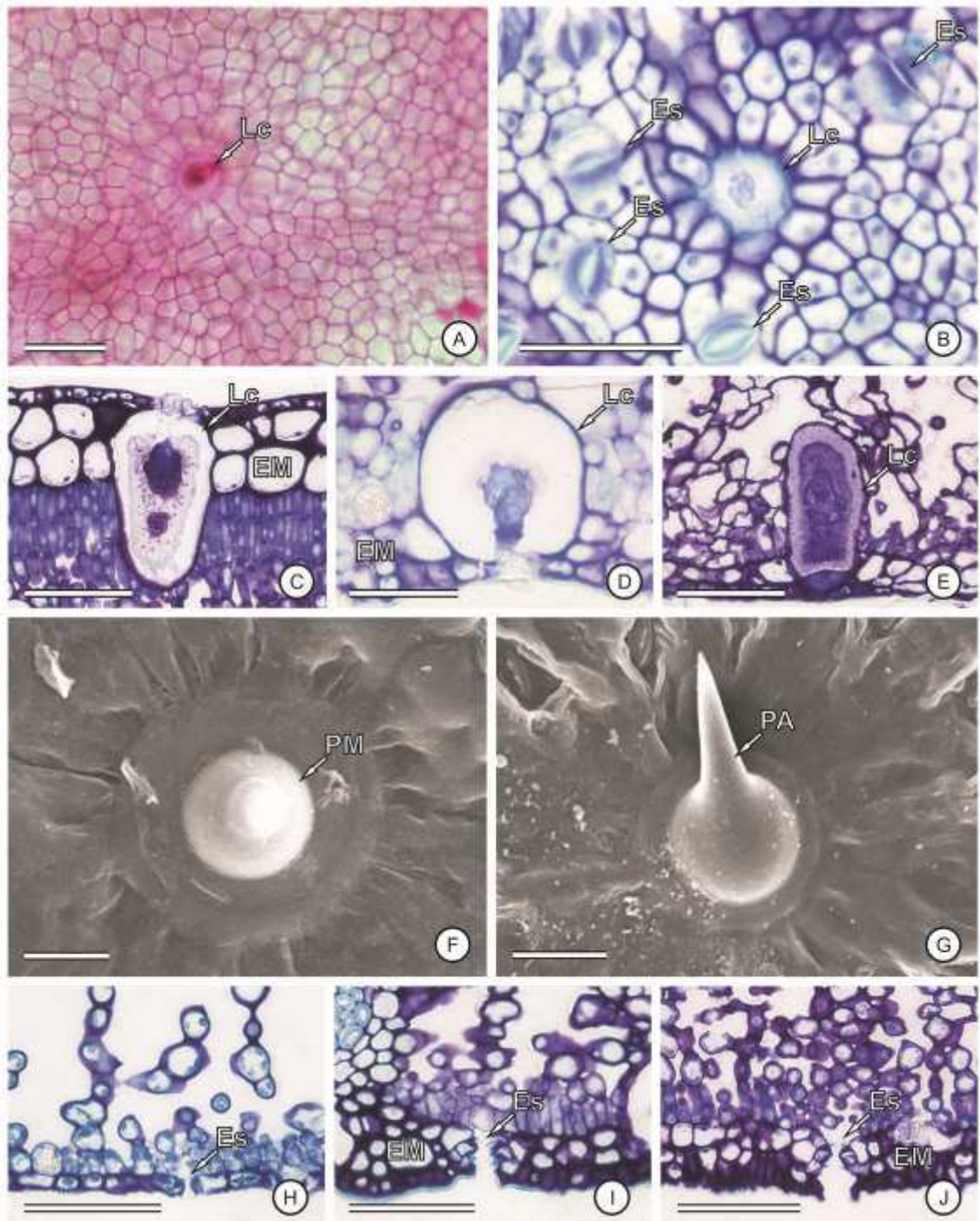


Figura 2. Epiderme foliar de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A e B (*Ficus obtusiuscula*); C e J (*Ficus whitei*); D e I (*Ficus nevesiae*); E (*Ficus longistipula*); F e G (*Ficus* sp.); H (*Ficus pulchella*). A. Diafanização. B. Corte paradérmico. C-E e H-J. Cortes transversais. F e G. MEV. A. Face adaxial. B. Face abaxial. C. Litocisto na face adaxial. D e E. Litocistos na face abaxial. F. Litocisto com projeção mamilosa (PM). G. Litocisto com projeção acicular (PA). H. Estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas. I e J. Estômatos abaixo do nível das demais células epidérmicas. Lc (litocisto), Es (estômato), EM (epiderme múltipla). Barras: A, B e D = 50 μ m; C, E e H-J = 100 μ m; F = 10 μ m; G = 20 μ m.

Tabela 2. Matriz de presença (1) e ausência (0) dos caracteres anatômicos das folhas de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. *Ficus ernanii* (ERN), *F. insipida* (INS), *Ficus* sp. (FSP), *F. adhatodifolia* (ADH), *F. nevesiae* (NEV), *F. whitei* (WHI), *F. longistipula* (LON), *F. obtusisucula* (OBT), *F. pulchella* (PUL), *F. piresiana* (PIR), *F. maxima* (MAX), tricoma glandular digitiforme(TGD), tricoma glandular capitado (TGC), dado não observado(?).

	ERN	INS	FSP	ADH	NEV	WHI	LON	OBT	PUL	PIR	MAX
(1) Pecíolo com contorno oval sulcado	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
(2) Pecíolo com contorno oval sem sulco	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
(3) Pecíolo com contorno circular sem sulco	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
(4) Pecíolo com tricomas tectores	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
(5) Pecíolo com faixa de colênquima deslocada para o interior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
(6) Pecíolo com periderme que descama	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
(7) Pecíolo com sistema vascular em anel	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
(8) Pecíolo com sistema vascular em arco	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
(9) Pecíolo com fibras perivasculares	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
(10) Pecíolo com 4-8 cordões de floema	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
(11) Pecíolo com 10-15 cordões de floema	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
(12) Pecíolo com cordões de floema em arco ou anel	1	?	0	1	1	0	1	1	1	1	1
(13) Pecíolo com cordões de floema difusos	0	?	1	0	0	1	0	0	0	0	0
(14) Nervura principal convexa obtusa na face adaxial	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
(15) Nervura principal convexa aguda na face adaxial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
(16) Nervura principal convexa obtusa na face abaxial	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
(17) Nervura principal plana na face abaxial	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
(18) Parênquima paliçádico invade a nervura principal	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
(19) Nervura principal com tricomas tectores	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
(20) Nervura principal com 4-8 cordões de floema	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
(21) Nervura principal com 10-15 cordões de floema	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
(22) Nervura principal com cordões de floema difusos	1	?	0	1	1	1	1	1	0	0	1
(23) Nervura principal com cordões de floema em linha ou arco	0	?	1	0	0	0	0	0	1	1	0
(24) Mesofilo dorsiventral	0	?	1	1	0	0	?	0	1	1	0
(25) Mesofilo isobilateral	1	?	0	0	1	1	?	1	0	0	1
(26) Extensão de bainha do feixe vascular	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
(27) Ausência de epiderme múltipla na face abaxial	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
(28) Tricomas tectores no limbo	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
(29) TGD no mesmo nível das células epidérmicas	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
(30) TGD abaixo do nível das células epidérmicas	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
(31) TGC	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Continuação da tabela 2.

(32) Estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
(33) Estômatos abaixo do nível das demais células epidérmicas	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
(34) Litocisto alongado na face adaxial	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
(35) Ausência de litocisto na face adaxial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
(36) Litocisto alongado na face abaxial	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
(37) Litocisto arredondado na face abaxial	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
(38) Monocristais no pecíolo e nervura principal	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1
(39) Drusas na nervura principal	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
(40) Drusas na lâmina foliar	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1

Apenas *Ficus obtusiuscula* (Figura 3A), *Ficus* sp. e *F. ernanii* apresentam tricomas tectores nas folhas. Todas as espécies apresentam tricomas glandulares digitiformes, constituídos por uma célula basal, uma célula do pescoço e uma cabeça alongada com até 16 células (Figura 3A-C). Somente *F. obtusiuscula* apresenta tricoma glandular capitado (Figura 3D). Os tricomas estão no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 3E) em *F. pulchella* e *F. piresiana* ou abaixo das demais células epidérmicas (Figuras 3F e G) como na maioria das espécies (Tabela 2). Os tricomas de *F. whitei* (Figura 3G) são os mais profundos entre todas as espécies analisadas.

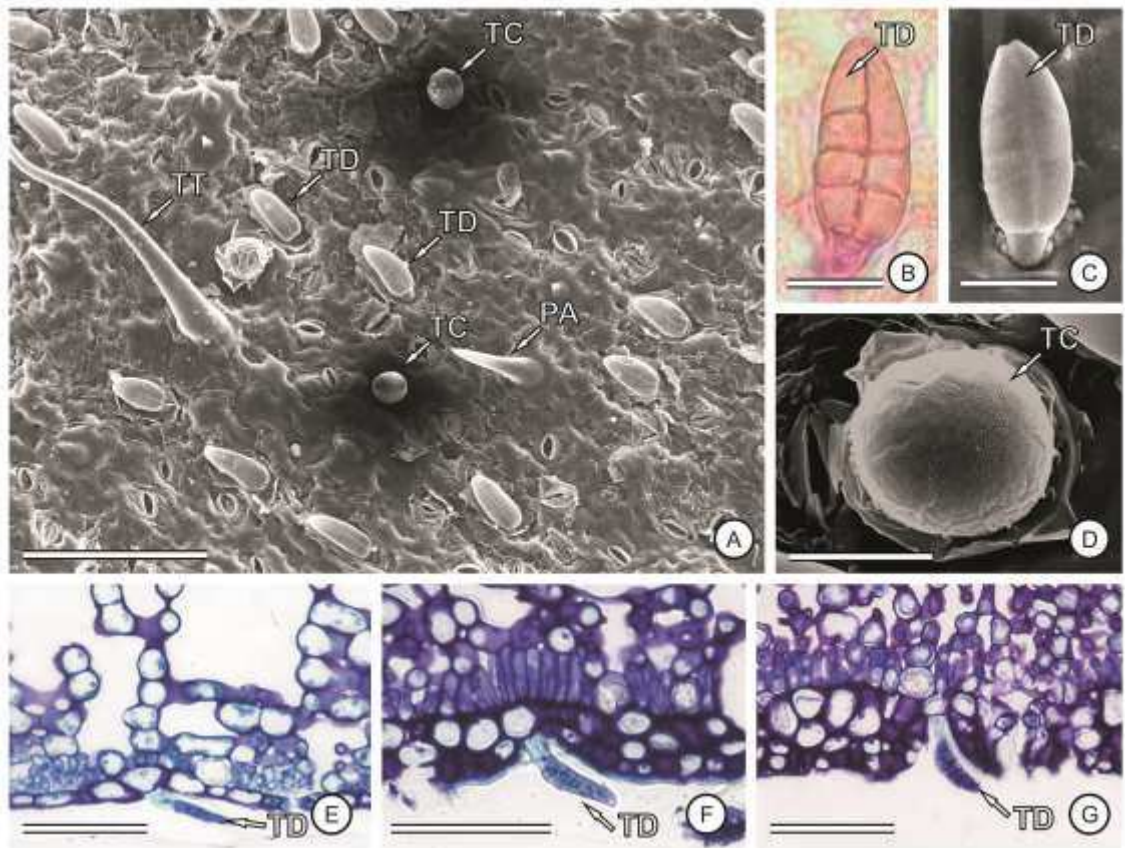


Figura 3. Tricomas foliares de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A-D (*Ficus obtusiuscula*); E (*Ficus pulchella*); F (*Ficus nevesiae*); G (*Ficus whitei*). A, C e D. MEV. B. Diafanização. E-G. Cortes transversais. A. Visão geral da face abaxial. B e C. Detalhe dos tricomas glandulares digitiformes. D. Detalhe da cabeça do tricoma capitado com a cutícula rompida. E. Tricoma no mesmo nível das demais células epidérmicas. F e G. Tricomas abaixo do nível das demais células epidérmicas. TD (tricoma glandular digitiforme), TC (tricoma glandular capitado), TT (tricoma tector), PA (projeção acicular de parede). Barras: A e E-G = 100 μ m; B-D = 20 μ m.

3.2. Lâmina foliar

O mesofilo é dorsiventral (Figura 4A e B) em quatro espécies e isobilateral (Figura 4C e D) em cinco espécies. Em *F. insipida* e *F. longistipula* não foi possível identificar o tipo de mesofilo devido ao mau estado do material herborizado (Tabela 2). O parênquima paliçádico é formado por duas ou três camadas de células (Figura 4A-F) que são interrompidas por idioblastos contendo drusas na maioria das espécies (Figura 4E), exceto *F. insipida* e *F. piresiana*. Os feixes vasculares de menor calibre que ocorrem na lâmina foliar apresentam extensão de bainha na maioria das espécies (Figura 4A, D e F), exceto em *F. maxima* (Figura 4C), *F. insipida* e *F. pulchella*. Em *F. maxima*, o parênquima paliçádico voltado para face abaxial é formado por células curtas com projeções laterais, típicas das células braciformes (Figura 4G). As demais espécies não apresentam essa característica (Figura 4H). Compostos fenólicos estão presentes em células do parênquima paliçádico (Figura 4B, I e J), na epiderme (Figura 4K) ou nos laticíferos entremeados com o floema nos feixes vasculares (Figura 4L).

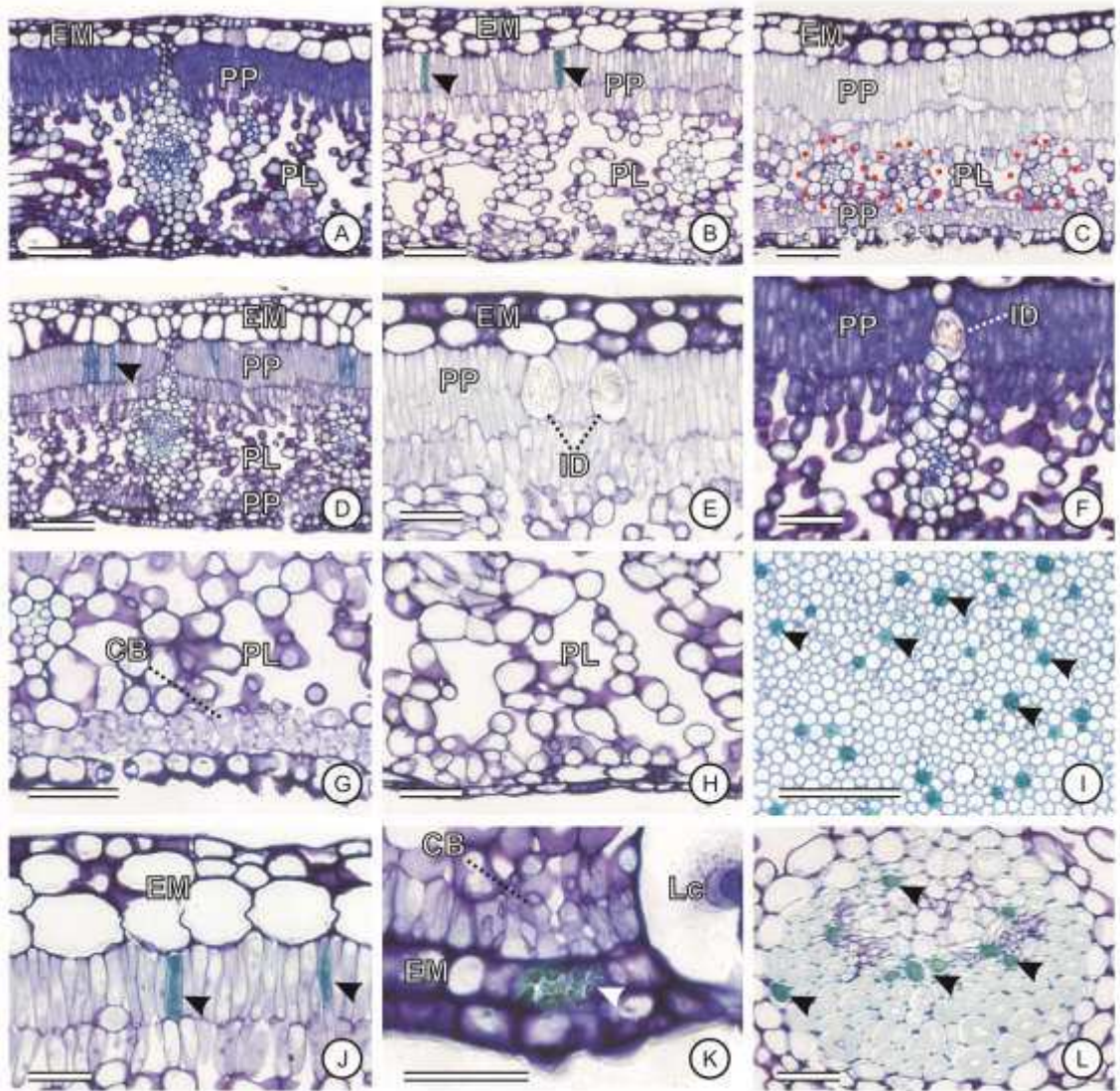


Figura 4. Cortes transversais (A-H e J-L) e paradérmico (I) do limbo de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A (*Ficus adhatodifolia*); B, H, I, J e L (*Ficus piresiana*); C, E e G (*Ficus maxima*); D (*Ficus obtusiuscula*); F (*Ficus whitei*); K (*Ficus nevesiae*). A e B. Mesofilo dorsiventral. C e D. Mesofilo isobilateral. E. Idioblastos cristalíferos contendo drusas (ID). F. Extensão de bainha do feixe vascular. G. Detalhe do parênquima paliçádico com células braciformes. H. Ausência de células braciformes. I e J. Parênquima paliçádico com compostos fenólicos. K. Epiderme múltipla com compostos fenólicos. L. Laticíferos com compostos fenólicos no feixe vascular. EM (epiderme múltipla), PP (parênquima paliçádico), PL (parênquima lacunoso), CB (célula braciforme), Lc (litocisto), cabeça de seta (compostos fenólicos), círculo pontilhado (ausência de extensão de bainha). Barras: A-D = 100µm; E-L = 50µm.

3.3. Nervura principal

A nervura principal é glabra em oito espécies e com tricomas tectores em três espécies (Tabela 2). A face adaxial da nervura principal possui contorno convexo obtuso em dez espécies (Figura 5A) ou convexo agudo em *F. maxima* (Figura 5B). Na maioria das espécies a face abaxial da nervura principal tem contorno convexo obtuso (Figura 5A e B), exceto em *F. pulchella* onde é plana (Figura 5C). O parênquima paliádico invade a região da nervura na maioria das espécies (Figura 5B e C), exceto em *F. whitei* (Figura 5A) e *F. obtusiuscula*. Colênquima do tipo angular está presente em todas as espécies. A região mais interna do córtex (após o colênquima) pode ser formada somente por parênquima de preenchimento como em *F. maxima* (Figura 5D) ou por parênquima de preenchimento e aerênquima como nas demais espécies (Figura 5E e F). Há presença de fibras perivasculares em todas as espécies (Figura 5A-C e G), mas a ocorrência dessa característica é fortemente influenciada pela idade da folha. Há ocorrência de drusas (Figura 5M e N) na nervura da maioria das espécies, exceto em *F. piresiana* e *F. maxima*. Em cinco espécies, além das drusas, também ocorrem monocristais prismáticos (Figura 5O e P e Tabela 2). A medula da nervura principal possui cordões de floema que podem formar linha ou arco (Figura 5G-I) em três espécies ou ter distribuição difusa (Figura 5J-L) em sete espécies (Tabela 2). Em *F. insipida* não foi possível identificar o tipo de distribuição dos cordões de floema da medula devido ao mau estado do material herborizado (Tabela 2). O número de cordões de floema na medula da nervura principal tem intervalo de 4 a 8 em quatro espécies (Figura 5G) ou de 10 a 15 na maioria das espécies (Figura 5H).

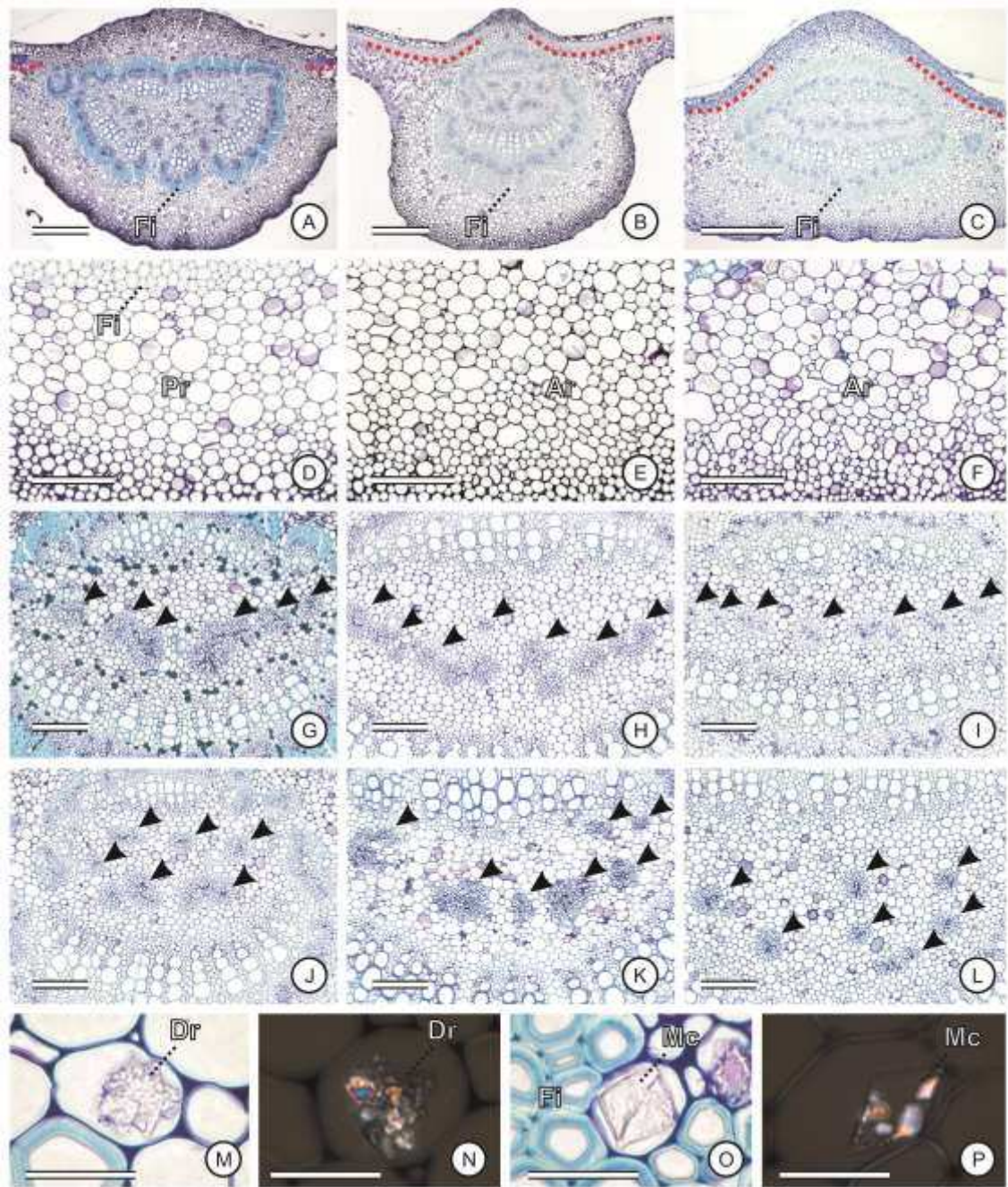


Figura 5. Cortes transversais da nervura principal de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A (*Ficus whitei*); B, D e J (*Ficus maxima*); C e I (*Ficus pulchella*); E e H (*Ficus* sp.); F, M-P (*Ficus nevesiae*); G (*Ficus piresiana*); K (*Ficus adhatodifloia*); L (*Ficus obtusiuscula*). A-C. Visão geral. D. Córtex sem aerênquima. E e F. Córtex com aerênquima. G-I. Cordões de floema da medula com distribuição em linha ou arco. J-L. Cordões de floema da medula com distribuição difusa. M e N. Drusas em ML e luz polarizada. O e P. Monocristais prismáticos em ML e luz polarizada. Fi (fibras perivasculares), Pr (parênquima de preenchimento), Ar (aerênquima), Dr (drusa), MP (monocristal prismático), cabeça de seta (cordões de floema na medula), pontilhado (parênquima paliçádico). Barras: A-C = 500 μ m; D-L = 200 μ m; M-P = 50 μ m.

3.4. Pecíolo

O pecíolo é glabro em oito espécies (Figura 6A, B, E-F, L) ou provido de tricomas tectores em três espécies (Figura 6C, D, K e Tabela 2). O contorno do pecíolo é oval em nove espécies (Figura 6A-I, K) ou circular em *F. maxima* e *F. nevesiae* (Figura 6J e L). A face abaxial do pecíolo é sulcada em sete espécies (Figuras 6A-G, K) ou sem sulco (Figura 6H-J, L) como nas demais espécies (Tabela 2). A profundidade do sulco varia de acordo com a região do pecíolo (Figura 6K) ou com a idade da folha (Figura 6E e F). A presença de mais de um sulco, como em *F. insipida* (Figura 6I), são artefatos gerados pelo mau estado de material herborizado. A epiderme é unisseriada, com células pequenas, recoberta por uma cutícula espessa (Figura 7A). Em *F. pulchella* (Figura 7B) e *F. maxima* (Figura 7C) o tecido de revestimento é formado por periderme que descama. Há presença de colênquima do tipo angular subepidérmico na maioria das espécies (Figura 6A-F, H-L) ou formando uma faixa mais interna como em *F. piresiana* (Figura 6G e 7A). No córtex, há presença de aerênquima bem desenvolvido na maioria das espécies (Figura 7D-F) ou pouco desenvolvido em *Ficus* sp. (Figura 7G), *F. obtusiuscula*, *F. pulchella* e *F. maxima*. Em *F. longistipula* o aerênquima chega a ocupar quase todo o córtex (Figura 7D). Fibras perivasculares ocorrem em seis espécies (Figura 6A, C-E, I, L; 7I) e são raras ou ausentes em cinco espécies (Figura 6B, F, G, H, K; 7H). A ocorrência de fibras perivasculares é fortemente influenciada pela idade da folha, pois no mesmo indivíduo de uma mesma espécie, foram encontradas fibras bem desenvolvidas nas folhas adultas (Figura 6E) e não foi encontrado fibras (Figura 6F) nas folhas jovens. Cristais do tipo drusa ocorrem no pecíolo de todas as espécies e em cinco espécies, além das drusas, também ocorrem monocristais prismáticos (Tabela 2). A distribuição dos feixes vasculares do pecíolo forma um arco em quatro espécies (Figura 6A, C, D, I) ou um anel em sete espécies (Figura 6B, E, G, H, J, L, K). A classificação da distribuição dos feixes em arco ou anel pode causar confusão devido à idade da folha. Em *F. adhatodifolia* os feixes formam um anel nas folhas adultas (Figura 6E), mas nas folhas jovens parte dos feixes voltados para face adaxial ainda não diferenciaram, formando uma lacuna e conseqüentemente um sistema vascular em arco (Figura 6F). A medula do pecíolo possui cordões de floema que podem formar um arco ou anel na maioria das espécies (Figura 6A, D-L) ou ter distribuição difusa em *Ficus whitei* (Figura 6B) e *Ficus* sp. (Figura 6C e 7L). O número de cordões de floema na medula do pecíolo tem intervalo de 4 a 8 em quatro espécies (Figura 6E, G, H e I) ou de 10 a 15 na maioria das espécies (Figura 6A-C, D, F, J-L). A classificação do número de

cordões de floema na medula pode causar confusão devido à idade da folha, pois as folhas jovens tendem a apresentar um número menor de cordões (Figura 6F). A região do pecíolo (ápice, meio ou base) parece não interferir na distribuição dos feixes vasculares ou no número e distribuição dos cordões de floema da medula (Figura 6K e L).

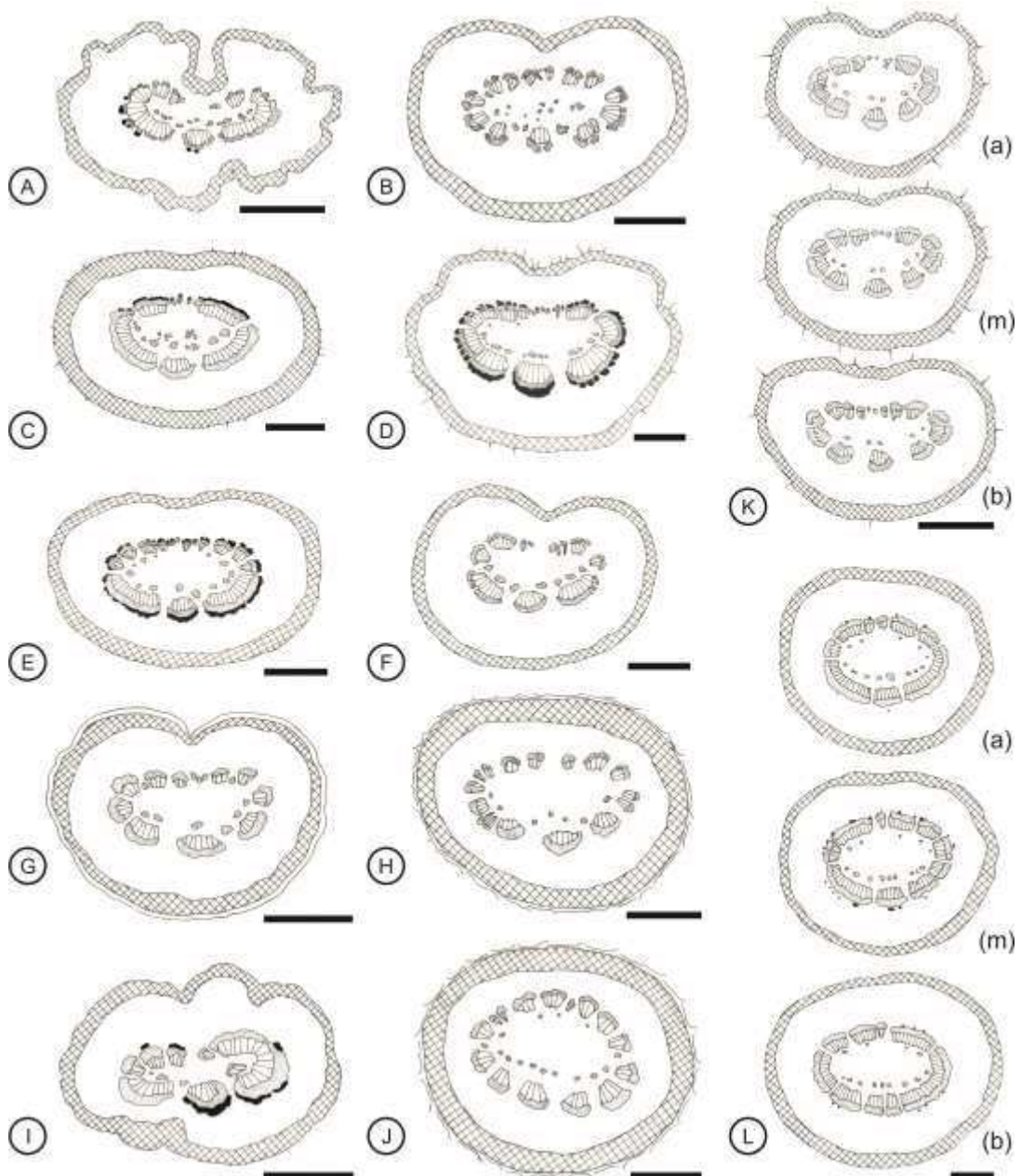








Figura 6. Pecíolos de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A (*Ficus longistipula*), B (*Ficus whitei*), C (*Ficus* sp.), D (*Ficus ernanii*), E e F (*Ficus adhatodifolia*), G (*Ficus piresiana*), H (*Ficus pulchella*), I (*Ficus insipida*), J (*Ficus maxima*), K (*Ficus obtusiuscula*) e L (*Ficus nevesiae*). A, D e I. Pecíolos de materiais herborizados. E e F. Folha totalmente expandida e folha jovem, respectivamente. K e L. Regiões da base (b), meio (m) e ápice (a) do pecíolo. Símbolos:  periderme,  colênquima,  fibras,  parênquima,  floema,  xilema. Barras: A-L = 1mm.

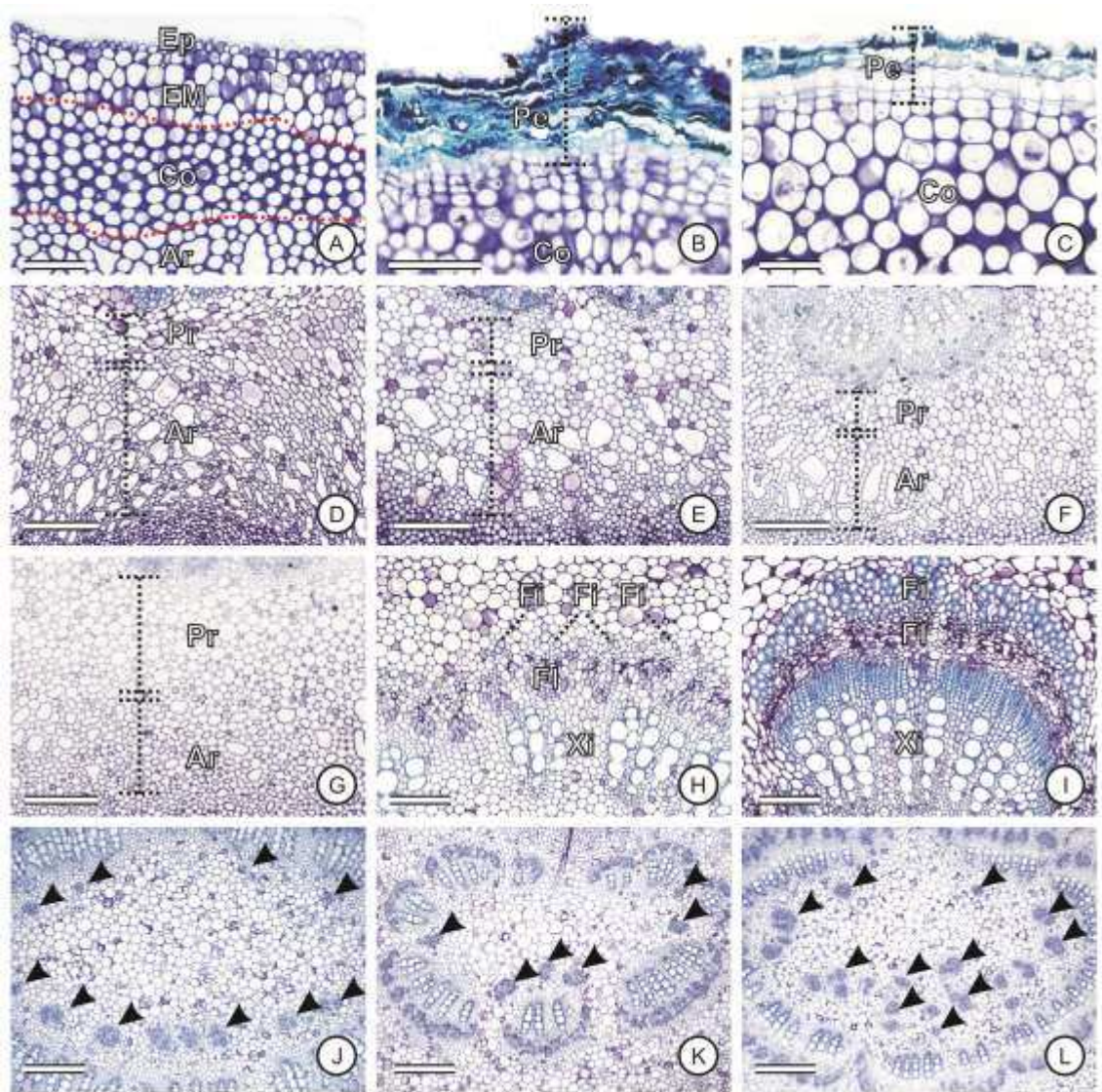


Figura 7. Anatomia do pecíolo de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A e F (*Ficus piresiana*); B (*Ficus pulchella*); C (*Ficus maxima*); D e I (*Ficus ernanii*); E e K (*Ficus adhatodifolia*); G e L (*Ficus* sp.); H e J (*Ficus nevesiae*). A. Detalhe da faixa interna de colênquima. B e C. Periderme. D-G. Proporção entre o parênquima de preenchimento e o aerênquima do córtex. H. Fibras raras. I. Fibras bem desenvolvidas. J e K. Cordões de floema da medula com distribuição em arco ou anel. L. Cordões de floema da medula com distribuição difusa. Ep (epiderme), EM (epiderme múltipla), Pr (parênquima), Co (colênquima), Ar (aerênquima), Pe (periderme), Fi (fibras), Fl (floema), Xi (xilema), cabeça de seta (cordões de floema na medula). Barras: A e B = 100 μ m; C = 50 μ m; D-G = 300 μ m; H e I = 200 μ m; J-L = 500 μ m.

3.5. Estruturas secretoras

Todas as espécies estudadas apresentaram laticíferos não articulados ramificados (Figura 8A e B). No pecíolo e na nervura principal ocorrem nas regiões do córtex, medula e entremeados nas células do floema. No limbo estão entremeados no parênquima paliçádico ou lacunoso e associados às células da bainha dos feixes vasculares de menor calibre.

Um par de glândulas baselaminares que secretam material semelhante a cera (Figura 8C e D) ocorrem próximo a nervura principal das folhas. Anatomicamente, são caracterizadas por 2-4 camadas de células, sendo a camada mais externa constituída por células com lúmen em formato de garrafa (Figura 8E e F). A ocorrência do par de glândulas é bastante variável, de modo que nem todo ramo analisado apresentou folhas com glândulas e nos ramos que possuíam folhas com glândulas, apenas algumas folhas portavam essa estrutura. Essas glândulas só foram encontradas nos espécimes coletados em campo. Nos materiais herborizados não foi possível identificar o par de glândulas.

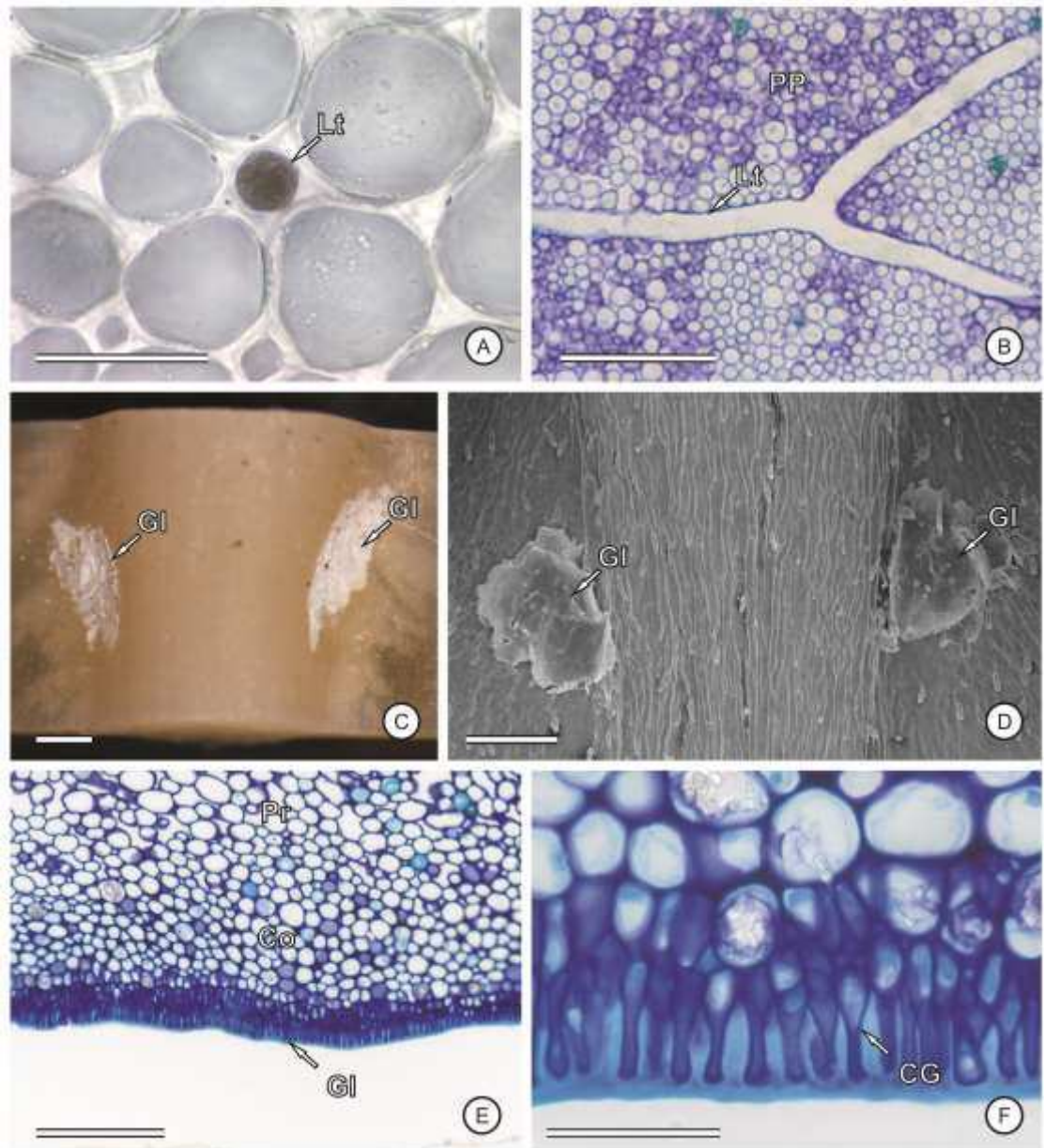


Figura 8. Laticíferos e glândulas baselaminares das folhas de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A (*Ficus nevesiae*); B (*Ficus piresiana*); C (*Ficus* sp.); D (*Ficus obtusiuscula*); E e F (*Ficus pulchella*). A. Detalhe do laticífero em seção transversal (corte a fresco). B. Detalhe do laticífero ramificado em seção paradérmica. C. Secreção da glândula da base da folha em estereomicroscópio. D. Secreção da glândula da base da folha em MEV. E. Visão geral da região da glândula em seção transversal. F. Detalhe da glândula em seção transversal. Lt (laticífero), PP (parênquima paliádico), Gl (glândula), Co (colênquima), Pr (parênquima de preenchimento), CG (célula com lúmen em forma de garrafa). Barras: A e F = 50 μ m; B = 100 μ m; C e D = 300 μ m; E = 200 μ m.

Todas as espécies podem ser identificadas por meio de suas características anatômicas da folha (Chave 1). Todas as características utilizadas para elaboração da chave são de microscopia de luz e foram observadas tanto em material emblocado em resina quanto em material fresco cortado em microtomo de mesa.

Chave 1. Identificação das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea*, baseada em caracteres anatômicos foliares.

1. Contorno do pecíolo circular sem sulco4
2. Contorno do pecíolo oval sem sulco5
3. Contorno do pecíolo oval sulcado6
4. Tecido de revestimento formado por epiderme; epiderme múltipla em ambas as faces da folha; extensão de bainha no limbo; fibras perivasculares no pecíolo; contorno da nervura convexo obtuso na face adaxial; 10-20 cordões de floema medulares na nervura principal *F. nevesiae*
- 4'. Tecido de revestimento formado por periderme que descama; epiderme múltipla somente na face adaxial; ausência de fibras perivasculares no pecíolo; contorno da nervura convexo agudo na face adaxial; 4-8 cordões de floema medulares na nervura principal *F. maxima*
5. Tecido de revestimento formado por epiderme; presença de fibras perivasculares e monocristais no pecíolo *F. insipida*
- 5'. Tecido de revestimento formado por periderme que descama; ausência de fibras perivasculares e monocristais no pecíolo *F. pulchella*
6. Estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas; 4-8 cordões de floema medulares no pecíolo7
- 6'. Estômatos abaixo do nível das demais células epidérmicas; 10-15 cordões de floema medulares no pecíolo8
7. Mesofilo isobilateral; litocistos em ambas as faces; colênquima subepidérmico no pecíolo *F. obtusiuscula*
- 7'. Mesofilo dorsiventral; litocistos somente na face abaxial; colênquima formando uma faixa mais interna no pecíolo *F. piresiana*
8. Com tricomas tectores no pecíolo, nervura principal e limbo9
- 8'. Sem tricomas tectores nas folhas, nervura principal e limbo10
9. Mesofilo isobilateral; cordões de floema medulares em arco ou anel no pecíolo e difusos na nervura principal *F. ernanii*

- 9'. Mesofilo dorsiventral; cordões de floema medulares difusos do pecíolo e em linha ou arco na nervura principal *Ficus* sp.
10. Sistema vascular do pecíolo em arco, litocistos alongados em ambas as faces, monocristais no pecíolo *F. longistipula*
- 10'. Sistema vascular do pecíolo em anel, litocistos alongados somente na face adaxial, sem monocristais no pecíolo 11
11. Mesofilo isobilateral, parênquima paliçádico ausente na nervura principal, cordões de floema medulares difusos no pecíolo, ausência de fibras perivasculares *F. whitei*
- 11'. Mesofilo dorsiventral, parênquima paliçádico na nervura principal, cordões de floema medulares em anel no pecíolo, presença de fibras perivasculares *F. adhatodifolia*

3.6. Análise fenética

Foram avaliadas 74 características anatômicas da folha, das quais 45 foram variáveis e 40 dessas foram informativas. Foram utilizadas as características que apresentaram variação em relação à idade da folha (presença ou ausência de fibras perivasculares), pois essa interferência poderá ser anulada quando seguida a padronização da amostragem do material descrita no tópico de material e métodos. Também foram utilizadas as características consideradas diagnósticas para algumas espécies, como por exemplo, a ausência de litocistos na face adaxial da folha de *F. piresiana*. As espécies que apresentaram dados não observados (*Ficus insipida* e *F. longistipula*) foram retiradas das análises de agrupamento (Tabela 2).

3.6.1. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) formou três agrupamentos principais: o grupo I constituído por *Ficus pulchella* e *F. piresiana*, o grupo II constituído por *Ficus* sp., *F. ernanii*, *F. nevesiae*, *F. adhatodifolia*, *F. obtusiuscula* e *F. whitei* e o grupo III formado apenas por *F. maxima* (Figura 9). As características que mais contribuíram para formação do grupo I foram: presença de 4-8 cordões de floema na medula do pecíolo e da nervura, cordões de floema com distribuição em linha ou arco na nervura, ausência de epiderme múltipla na face abaxial da lâmina foliar e tricoma glandular digitiforme e estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas (vetores 10, 20, 23, 27, 29, 32). Já as características que mais contribuíram para formação do grupo II foram: contorno do pecíolo oval sulcado, presença de 10-20

cordões de floema na medula do pecíolo e da nervura, cordões de floema com distribuição difusa na nervura, presença de epiderme múltipla na face abaxial e tricoma glandular digitiforme e estômatos abaixo do nível das demais células epidérmicas (vetores 1, 11, 21, 22, 30, 33). Dentro do grupo II formou-se o subgrupo I constituído por *Ficus* sp. e *F. ernanii* e suportado pela presença de tricomas tectores e sistema vascular do pecíolo em arco. Os tricomas tectores de *F. obtusiuscula* evidenciam uma proximidade com o subgrupo I, porém não existem características anatômicas que sustentem a formação de um subgrupo constituído por essas três espécies. *Ficus obtusiuscula* se diferencia do subgrupo I pelo tipo de sistema vascular, número cordões de floema no pecíolo, nível dos estômatos e presença de tricomas glandulares capitados. Do mesmo modo, há uma proximidade entre *F. nevesiae*, *F. adhatodifolia* e *F. whitei*, mas também não existem características anatômicas que sustentem a formação de um grupo. *F. maxima* ficou isolada no grupo III devido a presença de pecíolo circular com periderme que descama, monocristais no pecíolo e contorno da nervura convexo agudo na face adaxial (vetores 3, 6, 15, 38).

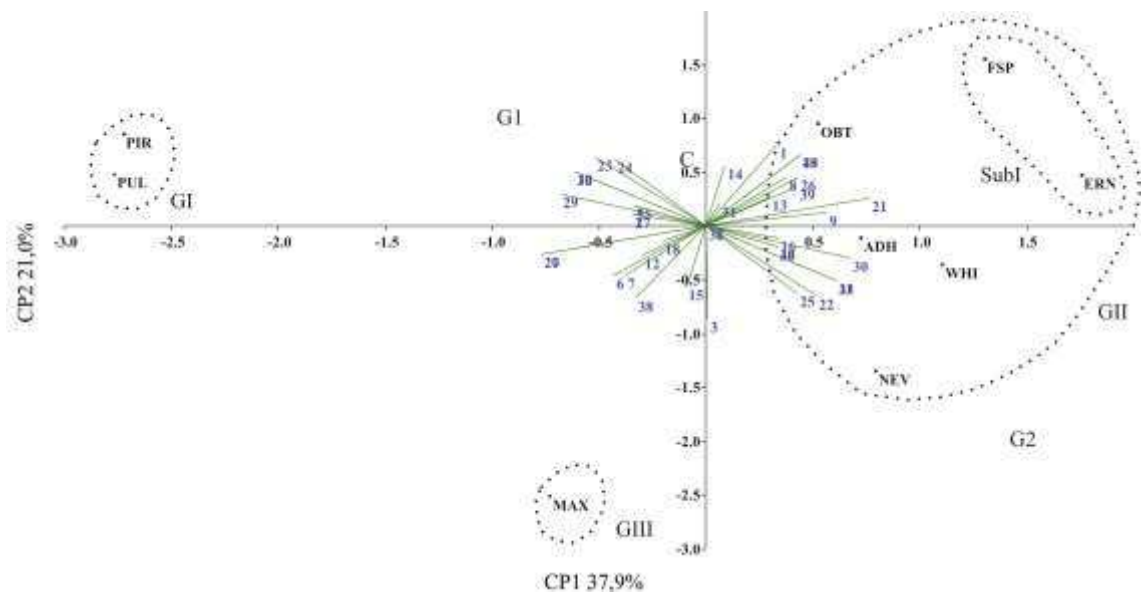


Figura 9. Dispersão gráfica de nove espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea*, em relação ao primeiro e ao segundo componente principal, estabelecido pela combinação linear de 40 características anatômicas foliares. Os componentes 1 (CP1) e 2 (CP2) são apresentados seguidos da porcentagem de variância acumulada em cada eixo. Os números dos vetores correspondem a sequência numérica de características apresentada na tabela 2. GI (grupo I), GII (grupo II), GIII (grupo III) e SubI (subgrupo I). *Ficus ernanii* (ERN), *F. insipida* (INS), *Ficus* sp. (FSP), *F. adhatodifolia* (ADH), *F. nevesiae* (NEV), *F. whitei* (WHI), *F. longistipula* (LON), *F. obtusiuscula* (OBT), *F. pulchella* (PUL), *F. piresiana* (PIR), *F. maxima* (MAX).

3.6.2. Análise de agrupamento hierárquico (UPGMA)

O fenograma gerado pela análise de agrupamento com base na distância euclidiana tem 7 agrupamentos artificiais representados por letras de A a G (Figura 10). O grupos A e B têm os melhores suportes de *bootstrap*, confirmando a segregação de *F. pulchella* e *F. piresiana* (grupo A) do restante das espécies (grupo B), como demonstrado no PCA. As espécies do grupo A compartilham 4-8 cordões de floema em linha ou arco na medula da nervura principal, tricomas e estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas. A maioria das 7 espécies do grupo B possuem 10-15 cordões de floema no pecíolo, 10-15 cordões de floema difusos na nervura, tricomas e estomatos abaixo das demais células epidérmicas. A presença de feixes em anel e ausência de tricomas tectores separa o grupo F do grupo E, este último caracterizado pelos feixes em arco e presença de tricomas tectores. *Ficus whitei* se separa do grupo G pelos cordões de floema difusos no pecíolo e pela ausência de fibras perivasculares e de parênquima paliçádico que invade a nervura. *Ficus obtusiuscula* se separa dos grupos F e E pelos tricomas glandulares capitados, 4-8 cordões de floema no pecíolo e estômatos no mesmo nível das demais células epidérmicas. Como no PCA, *F. maxima* se separou das demais espécies do grupo B, pois esta espécie possui um conjunto exclusivo de caracteres anatômicos idêntico ao já descrito no PCA.

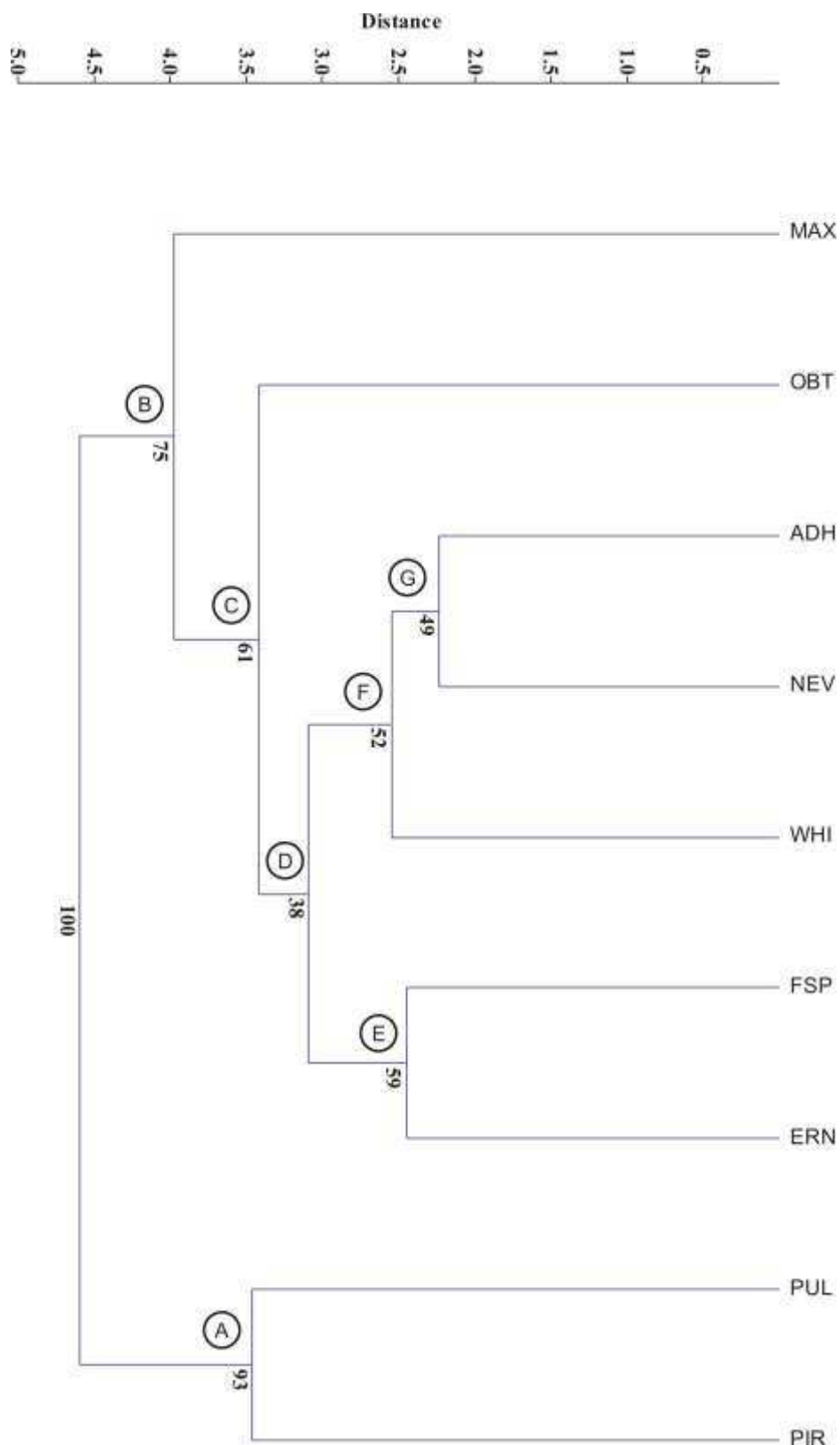


Figura 10. Fenograma gerado pelo método UPGMA, baseado na distância euclidiana, a partir de dados anatômicos foliares das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. Coeficiente de correlação fenético de 0.91. Os números nos nós correspondem ao valor de *bootstrap*. *Ficus ernanii* (ERN), *F. insipida* (INS), *Ficus* sp. (FSP), *F. adhatodifolia* (ADH), *F. nevesiae* (NEV), *F. whitei* (WHI), *F. longistipula* (LON), *F. obtusisucula* (OBT), *F. pulchella* (PUL), *F. piresiana* (PIR), *F. maxima* (MAX).

4. DISCUSSÃO

Algumas características anatômicas comuns em espécies de *Ficus* são: presença de epiderme múltipla; tricomas tectores e glandulares; estômatos anomocíticos, no mesmo nível ou abaixo das demais células epidérmicas; litocistos; mesofilo dorsiventral ou isobilateral; sistema vascular do pecíolo em anel com cordões de floema na medula; laticíferos não articulados e ramificados e; glândulas baselaminares (Metcalf e Chalk 1950; Mello Filho 1963; Mello Filho e Nolla Leitão 1975; Mello Filho e Neves 1976, 1978; 1982; 1989; Mello Filho *et al.* 1983; Neves 1981; 1987; Neves e Mello Filho 1986; Neves *et al.* 1991; 1993; 2002; Mendonça-Souza 2006). Entretanto, algumas dessas características variaram entre as espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* estudadas.

A ausência de epiderme múltipla na face abaxial foi distintiva para algumas espécies do subgênero *Pharmacosycea*. O colênquima mais interno no pecíolo é uma característica diagnóstica de *F. piresiana* e ocorre devido à existência de várias camadas de células periféricas que provavelmente constituem uma epiderme múltipla. Entretanto, para confirmação dessa estrutura é necessário à realização de um estudo ontogenético. O formato e a localização dos litocistos foram diagnósticos para algumas espécies estudadas e têm sido amplamente aplicados à taxonomia de *Ficus* (Neves *et al.* 2002, Sharawy 2004, Klimko e Truchan 2006).

A presença ou ausência de tricomas glandulares (Berg 2001) ou a pubescência (Carauta 1989) tem sido utilizada para separar seções ou espécies de *Ficus*. Nas espécies abordadas neste trabalho e em várias outras espécies de *Ficus* (Sonibare *et al.* 2006, Klimko e Truchan 2006) o tipo e o nível dos tricomas em relação às demais células epidérmicas foram mais informativos do que apenas sua presença ou ausência. Alguns tricomas de *Ficus* não são visualizados à vista desarmada, outros são difíceis de serem visualizados em estereomicroscópio ou até mesmo em microscopia de luz (ML). Entretanto, estudos com técnicas de microscopia eletrônica de varredura têm demonstrado ampla ocorrência de tricomas nas espécies de *Ficus* (Klimko e Truchan 2006, Mendonça-Souza 2006). Em várias espécies de *Ficus* os tricomas glandulares, que estão presentes nas folhas jovens, desaparecem quando as folhas atingem a maturidade (Van Greuning 1984). Assim, para utilização desse caráter a padronização das amostras e a utilização de técnicas apropriadas são essenciais.

O nível dos estômatos em relação às demais células da epiderme em espécies de *Ficus*, cultivadas sob as mesmas condições, apresentou diferenças sugerindo que está

característica seja geneticamente marcada, sendo os estômatos profundos foram considerados como característicos dos subgêneros *Urostigma* e *Pharmacosycea* (Klimko e Truchan 2006). Entretanto, no presente trabalho, as espécies de *Pharmacosycea* apresentaram estômatos no mesmo nível ou abaixo das demais células epidérmicas, que sugere uma característica geneticamente marcada em nível específico e não em nível de subgênero como descrito por esses autores.

O tipo de organização do mesofilo e a presença ou ausência de extensão de bainha nos feixes vasculares foram características informativas da lâmina foliar. Alguns trabalhos têm demonstrado a ocorrência de uma camada em paliçada adjacente à epiderme voltada para face abaxial, mas não classificam o mesofilo como isobilateral (Nolla Leitão 1975, Mello Filho e Neves 1976, Neves *et al.* 1993). Entretanto, o mesofilo em *Ficus* pode ser dorsiventral, isobilateral ou até mesmo homogêneo (Metcalf e Chalk 1950). No presente trabalho, o mesofilo das espécies de *Pharmacosycea* que apresentaram essa camada em paliçada, adjacente a epiderme abaxial, foi classificado como isobilateral.

O presente trabalho demonstrou a inconsistência dos caracteres ausência de monocristais prismáticos e de fibras pericíclicas que vêm sendo utilizados como diagnósticos para o subgênero *Pharmacosycea* (Carvajal e Shabes 2006, Carvajal 2012). Quase a metade das espécies estudadas apresentaram cristais prismáticos e, além disso, a presença ou ausência de fibras perivasculares foi influenciada pela idade da folha, de modo que a atribuição de valor taxonômico para essa característica deve ser cautelosa e somente realizada com comparações entre folhas totalmente desenvolvidas.

O sistema vascular descrito com distribuição em arco para as espécies da seção *Petenenses* (*F. maxima* e *F. pulchella*) por Carvajal e Shabes (1998, 2006), contrastou com a distribuição em anel nas mesmas espécies avaliadas no presente trabalho. A distribuição dos feixes vasculares no pecíolo é influenciada pela idade da folha, pois em folhas jovens os feixes ainda não se diferenciaram totalmente e o sistema vascular do pecíolo pode apresentar uma lacuna voltada para face adaxial característica dos sistemas vasculares em arco, mas que irá ser preenchida posteriormente. Assim, tal como a presença de fibras pericíclicas, a atribuição de valor taxonômico para o tipo de sistema vascular deve ser cautelosa e somente realizada em comparações entre folhas totalmente desenvolvidas.

Carvajal e Shabes (1998, 2006) e Carvajal (2012) não descrevem qual critério foi adotado para a classificação do contorno do pecíolo como oval ou circular. Portanto,

algum material classificado por eles como circular poderia ser classificado no presente trabalho como oval. Todo material utilizado por Carvajal e Shabes (2006) foi proveniente de herbário, dos quais alguns apresentaram invaginações chamadas por esses autores de costelas. Essas costelas não foram encontradas na maioria das espécies de *Ficus* deste trabalho, exceto nas também provenientes de herbário. Dos três materiais herborizados utilizados no presente trabalho, dois deles (*F. insipida* e *F. longistipula*) estavam em pior estado de conservação e apresentaram as maiores distorções no formato do pecíolo. O exemplar herborizado de *Ficus maxima* estudado por Carvajal e Shabes (2006) possui costelas que contrastam com a falta de costelas nos espécimes de *Ficus maxima* estudados no presente trabalho, o que indica que existe divergência na identificação dos dois materiais ou as costelas encontradas naquele trabalho são artefatos do processo de herborização.

O contorno e a distribuição dos feixes vasculares no pecíolo das espécies estudadas não serviram para separá-las nas subseções *Bergianae* e *Petenenses* como proposto na literatura (Carvajal e Shabes 1998, 2006). Das características anatômicas usadas na circunscrição dessas duas subseções, apenas a presença de epiderme lisa na subseção *Bergianae* e de periderme que descama na subseção *Petenenses* foram corroboradas pelo presente trabalho. A periderme que descama é apontada por Carvajal e Shabes (1998) como uma característica geneticamente marcada. A subdivisão da seção *Pharmacosycea* nas subseções *Bergianae* e *Petenenses* também não foi sustentada por dados moleculares, mas a seção *Pharmacosycea* e a subseção *Petenenses* foram reconhecidas como monofiléticas (Santos 2010).

A presença de vários cordões de floema na medula do pecíolo e da nervura de *Ficus* tem sido notada há muito tempo (Metcalf e Chalk 1950, Mello Filho e Neves 1976, 1978, Neves *et al.* 2002). Até o presente trabalho ainda não se tinha atribuído valor taxonômico a essa característica. Tanto a distribuição quanto o número desses cordões foram informativos para a separação das espécies da seção *Pharmacosycea*. Entretanto, a variação dessa característica em um número maior de espécies, como também sua aplicabilidade em outros subgêneros de *Ficus* ainda não foi verificada.

Embora, exista registro da presença de laticíferos articulados com anastomoses em folhas de *Ficus retusa* (Milanez, 1954), os laticíferos de *Ficus* normalmente têm sido classificados como não-articulados, sejam ramificados ou não (Rachmilevitz e Fahn 1982, Hagel *et al.* 2008), tal como os encontrados em todas as espécies do subgênero *Pharmacosycea*.

A posição das glândulas baselaminares tem valor diagnóstico para os dois subgêneros neotropicais (*Pharmacosycea* e *Urostigma*) de *Ficus* (Berg 2001, Mendonça-Souza 2006). Entretanto, a presença dessas glândulas nas folhas das espécies estudadas no presente trabalho foi extremamente variável. Ainda não se sabe ao certo que tipo de glândula é essa e qual a natureza da sua secreção (Metcalf e Chalk 1950, Lersten e Peterson 1974, Berg 2001). Especula-se que sejam glândulas de cera (Metcalf e Chalk 1950, Berg 2001), glândulas fenólicas (Pennisi *et al.* 1999) e até estruturas com função de atração de polinizadores (Berg 2001) ou resultado da oviposição de insetos (Pennisi *et al.* 1999). A secreção encontrada nas folhas se assemelhava a cera, mas não existe se quer estrutura glandular nesses locais e sim alguns extratos da epiderme modificados, principalmente na superfície, e grande impregnação de material lipídico entre as células epiteliais que acaba se confundindo com a própria cutícula.

Os resultados das análises de agrupamento (PCA e UPGMA) também não sustentam a subdivisão da seção *Pharmacosycea* em duas subseções (*Bergianae* e *Petenenses*) como proposto por Carvajal e Shabes (1998, 2006). De forma geral as duas análises foram semelhantes, com poucas exceções. De acordo com as análises de PCA, as características que apresentaram variação em relação à idade da folha ou região amostrada, como o tipo de sistema vascular e presença ou ausência de fibras perivasculares no pecíolo não foram as mais importantes para formação dos grupos. Entretanto, se mostraram úteis para separação das espécies na chave dicotômica. No agrupamento hierárquico (UPGMA) *F. maxima* apresenta mais afinidade com o complexo de espécies de epiderme lisa do que com as espécies com periderme que descama. Já na análise de PCA *F. maxima* tem mais afinidade com o complexo das espécies com periderme que descama.

As três espécies com maiores problemas de circunscrição (*F. adhatodifolia*, *F. insipida* e *F. nevesiae*) foram claramente separadas pela anatomia foliar. *F. nevesiae* e *Ficus adhatodifolia*, consideradas sinônimos por Berg e Villavicencio (2004), são diferenciadas pelo contorno do pecíolo, tipo de mesófilo e tipo de cristal de oxalato de cálcio. Já *F. adhatodifolia* considerada sinônimo de *F. insipida* por Mendonça-Souza (2006) e Santos (2010) pode ser diferenciada desta pela ausência de monocristais, contorno, sistema vascular e número dos cordões de floema no pecíolo.

F. ernanii foi recentemente descrita por Carauta *et al.* (2012) e apontada como uma espécie que tem afinidade com *F. adhatodifolia* e *F. nevesiae*. O espécime de *F. ernanii*, estudado no presente trabalho, apresentou afinidade com o táxon identificado

apenas em nível de gênero (*Ficus* sp.), que já foi determinado anteriormente como *F. adhatodifolia* em um levantamento das espécies de Moraceae no município de Viçosa (De Souza 2009). Entretanto, as características anatômicas dos espécimes de *Ficus* sp. apontam para a existência de uma espécie distinta.

5. CONCLUSÕES

O estudo anatômico foliar e as análises fenéticas conduzidos neste trabalho confirmam a importância da anatomia da folha como subsídio para taxonomia de *Ficus*.

As 11 espécies estudadas representam mais da metade das espécies do subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* que, a partir desse trabalho, poderão ser reconhecidas em fase vegetativa por meio da chave elaborada a partir dos caracteres anatômicos. As três espécies com maiores problemas de circunscrição (*F. adhatodifolia*, *F. insipida* e *F. nevesiae*) são claramente separadas pela anatomia foliar.

O presente trabalho demonstrou a inconsistência de algumas características anatômicas que vêm sendo utilizadas como diagnósticas para o subgênero *Pharmacosycea* e também para separar a seção *Pharmacosycea* nas subseções *Bergianae* e *Petenenses*. Das características anatômicas usadas na circunscrição dessas duas subseções, apenas a presença de epiderme lisa na subseção *Bergianae* e de periderme que descama na subseção *Petenenses* foram corroboradas pelo presente trabalho. É necessário um estudo comparativo que aborde espécies do subgênero *Urostigma* para eleição de novas características anatômicas diagnósticas em nível de subgênero.

O número e distribuição dos cordões de floema na medula do pecíolo e da nervura principal são características anatômicas promissoras para a taxonomia da seção *Pharmacosycea*. Entretanto, devem ser avaliadas em um número maior de espécies para confirmar a validade das mesmas na taxonomia do subgênero *Pharmacosycea*, como também nos outros subgêneros e seções de *Ficus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berg CC. 1989a. Systematics and phylogeny of the Urticales. In: Crane, P.R. e Blackmore, S. (eds.) **Evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae 2, 'Higher' Hamamelidade**. Oxford, Clarendon Press. pp. 193-220.
- Berg CC. 1989b. Classification and distribution of *Ficus*. **Experientia** **45**: 605-611.
- Berg CC. 2001. **Moraceae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae) - with introduction to the family and Ficus and with additions and corrections to Flora Neotropica Monograph 7**. New York, The New York Botanical Garden. 347p.
- Berg CC e Villavicencio X. 2004. Taxonomic studies on *Ficus* (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil, and Bolivia. **Ilicifolia** **5**: 1-132.
- Berg CC. 2006. The subdivision of subgenus *Phamacosycea* section *Pharmacosycea* (Moraceae). **BLUMEA** **51**: 147-151.
- Bertoldo A. 1995. **Anatomia foliar comparada de *Ficus enormis*, *F. hirsuta* e *F. luschnathiana***. Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, UFRJ. 128f.
- Carauta JPP e Diaz BE. 2002. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro, Editora UFRJ. 212p.
- Carauta JPP, Pederneiras LC, De Souza PP, Machado AFP, Vianna Filho MDM, Romaniuc Neto S. 2012. *Ficus ernanii* (Moraceae), nova espécie para flora do Brasil. **Albertoa. Série Urticineae** **36**: 277-284.
- Carauta JPP. 1989. *Ficus* (Moraceae) no Brasil: conservação e taxonomia. **Albertoa** **2**: 365p.
- Carvajal S e Shabes LK. 1998. Two new subsections of American species of the genus *Ficus* L. (Moraceae) Subgenus *Pharmacosycea* Miq. Section *Pharmacosycea*. **Boletín IBUG** **6**: 213-217.
- Carvajal S e Shabes LK. 2006. Estructura anatómica de los pecíolos de espécies americanas del género *Ficus* L. (Moraceae). **Boletín IBUG** **13**(1): 49-66.
- Carvajal S. 2012. Sistema para la familia Moraceae en México. **Ibugana** **3**: 3-103.
- De Souza PP. 2002. *Ficus* (Moraceae): Observações fenológicas de algumas espécies. **Albertoa Série Urticineae** **9**: 57-62.

- De Souza PP. 2009. **Moraceae Gaudich de Viçosa, Minas Gerais, Brasil: florística e anatomia foliar de *Ficus mexiae* Standl.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 157f.
- Hagel JM, Yeung EC e Facchini PJ. 2008. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science** **13**(12): 631-639.
- Hare C. 1944. On taxonomic value of the anatomical structure of the vegetative organs of the dicotyledons. 5. The anatomy of the petiole and its taxonomic value. **Proc. Linnean Soc. London** **155**: 223-229.
- Johansen DA. 1940. **Plant microtechnique.** McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Klimko M e Truchan M. 2006. Morphological variability of the leaf epidermis in selected taxa of the genus *Ficus* L. (Moraceae) and its taxonomic implications. **Acta societatis botanicorum poloniae** **75**(4): 309-324.
- Lersten NR e Peterson WH. 1974. Anatomy of hydattodes and pigment disks in leaves of *Ficus diversifolia* (Moraceae). **J. Linn. Soc.** **68**: 109-113.
- Mello Filho LE. 1963. **Introdução ao Estudo do Gênero *Ficus* (Moraceae) da Guanabara e arredores.** Tese, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade do Estado da Guanabara, Rio de Janeiro. 51f.
- Mello Filho LE e Neves LJ. 1976. Sobre a anatomia foliar de *Ficus sagittifolia* Warb. Ex Mildbraed & Burret. **Revista Brasileira de Biologia** **36** (1): 139-156.
- Mello Filho LE e Neves LJ. 1978. Sobre a anatomia foliar de *Ficus lyrata* Warb. **Revista Brasileira de Biologia** **38** (2): 431-444.
- Mello Filho LE e Neves LJ. 1982. Anatomia foliar de *Ficus religiosa* L. **Bradea** **3**(33): 261-272.
- Mello Filho LE e Neves LJ. 1989. Anatomia foliar de *Ficus organensis* (Miq.) Miq. **Bradea** **5** (15): 156-165.
- Mello Filho LE e Nolla Leitão MM. 1975. Contribuição a anatomia foliar de *Ficus nymphaeifolia* L. **Revista Brasileira de Biologia** **35** (1): 141-153.
- Mello Filho LE, Neves LJ e Caldas RLS. 1983. Anatomia foliar de *Ficus microcarpa* L.f. **Bradea** **3**(44): 387-398.

- Mendonça-Souza LR. 2006. *Ficus (Moraceae) no Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. 140f.
- Metcalf CR e Chalk L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. v. 2. Oxford, Clarendon Press.
- Milanez, FR. 1954. Sobre os laticíferos foliares de *Ficus retusa*. **Rodriguésia** 16/17 (28/29): 159-192.
- Miquel FAG. 1853. Urticineae. In: Von Martius CFP, Eichler AW e Urban I. **Flora brasiliensis**. Munchen, Wien, Leipzig 4: 77-218.
- Neves LJ. 1981. Origem e classificação dos esclerócitos foliares em espécies de *Ficus* no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos do Museu Nacional** 56: 185-212.
- Neves LJ. 1987. **Morfologia, desenvolvimento e anatomia de *Ficus tomentella* Miq. (Moraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 285f.
- Neves LJ e Mello Filho LE. 1986. Anatomia foliar de *Ficus benjamina* L. **Bradea** 4(37): 295-304.
- Neves LJ, Isaias RMS e Mello Filho LE. 1993. Estudo anatômico da folha de *Ficus elliotiana* Sp. Moore. **Bradea** 6(22): 196-204.
- Neves LJ, Mello Filho LE e Carauta JPP. 2002. Anatomia de *Ficus* (Moraceae) Aplicada à Taxonomia. **Albertoa Série Urticineae** 7: 45-51.
- Neves LJ, Mello Filho LE, Fernandes LDRS e Ferreira AK. 1991. Anatomia foliar de *Ficus semicordata* B. Ham. Ex J.E. Smith. **Bradea** 5(50): 479-496.
- O'Brien TP, Feder N e McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59:368-373.
- Pennisi SV, Mcconnell DB e Henlev RW. 1999. Occurrence and development of a dorsal gland in leaves of *Ficus benjamina* L. (Weeping Fig) cultivars. **HortScience** A 34(6): 1051-1053.
- Rachmilevitz T e Fahn A. 1982. Ultrastructure and Development of the Laticifers of *Ficus carica* L. **Ann. Bot.** 49: 13-22.
- Romaniuc Neto S, Carauta JPP, Vianna-Filho MDM, Pereira RAS, Ribeiro JELS, Machado AFP, Dos Santos A e Pelissari G. 2010. Moraceae. In: Campostrini Forzza *et*

al. (Orgs.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. vol 2. Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Santos OA. 2010. **Taxonomia e hipótese filogenética da seção *Americana*, subgênero *Urostigma*, gênero *Ficus* L. (Moraceae)**. Tese de Doutorado, INPA/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 101f.

Sharawy SM. 2004. Numerical taxonomic evaluation of calcium oxalate and calcium carbonate crystals in the leaves of certain *Ficus* species (Moraceae). **Feddes Repertorium** **115**(5-6): 441-452.

Smith FH e Smith EC. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. **Am J Bot** **29**:464-471.

Sonibare MA, Jaycola, Egunyomi A. 2006. Comparative leaf anatomy of *Ficus* Linn. Species (Moraceae) from Nigeria. **J Appl Sci** **6**: 3016-3025.

CAPÍTULO II

ESTUDO HISTOQUÍMICO, FITOQUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Ficus* SUBGÊNERO *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. (MORACEAE)

RESUMO: As espécies de *Ficus* são reconhecidamente ricas em compostos fenólicos que apresentam forte ação antioxidante. Entretanto, os estudos químicos e farmacológicos com espécies do subgênero *Pharmacosycea* concentram-se, sobretudo, na investigação da atividade dessas plantas contra vermes. Em relação a possível atividade antioxidante nas espécies do subgênero *Pharmacosycea*, apenas o composto fenólico metoxiflavona foi isolado de *Ficus maxima*. O objetivo do presente trabalho foi identificar o potencial antioxidante e as principais classes de produtos naturais das folhas de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* nativas do Brasil. As classes de compostos foram analisadas por meio de testes histoquímicos em folhas frescas e cromatografia em camada delgada (CCD) nos extratos. Também foram obtidos os cromatogramas dos extratos em CLAE. A quantificação de fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico e pelo método de captura do radical estável DPPH. A composição química dos extratos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* mostrou-se bastante heterogênea, sendo os taninos e flavonoides as únicas classes que ocorrem em todas as espécies. As análises histoquímicas demonstraram que os tricomas e o parênquima paliçádico são os principais sítios de acúmulo de fenólicos, enquanto os laticíferos são os principais sítios de acúmulo de proteínas, lipídios e terpenos. Os extratos etanólicos brutos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* são ricos em compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante, sendo *F. piresiana* a espécie mais promissora para estudos futuros relacionados ao potencial antioxidante de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* nativas do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, atividade antioxidante, compostos fenólicos, histoquímica.

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, espécies de *Ficus* fazem parte da tradição cultural, alimentícia e de cura de vários povos (Carauta e Diaz 2002, Lansky *et al.* 2008). As folhas e o látex das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* são usadas na medicina popular, principalmente, para o tratamento de verminoses (Peckolt 1942, Hansson *et al.* 2005), mas também há relatos de usos para inflamações reumáticas, feridas e dores no estômago (Duke 1994), gengivite (Lentz *et al.* 1998), picadas, feridas na pele (Hansson *et al.* 1986) e febre (Diaz *et al.* 1997).

As espécies de *Ficus* são reconhecidamente ricas em compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante (Solomon *et al.* 2006, Lansky *et al.* 2008, Manian *et al.* 2008, Abdel-Hameed 2009, Sirisha *et al.* 2010, Kiem *et al.* 2011, Shi *et al.* 2011). A produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, o estresse oxidativo estão intimamente ligados a várias condições inflamatórias (Geronikaki e Gavalas 2006). Compostos fenólicos presentes nas plantas podem proteger os sistemas biológicos contra os efeitos danosos das ROS, pois atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio, sequestradores de oxigênio singlete e quelantes de metais (Rice-Evans *et al.* 1996, Kähkönen *et al.* 1999).

Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixa concentração, sejam capazes de impedir, retardar e prevenir a auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres (Rice-Evans *et al.* 1996). Vários métodos podem detectar a atividade antioxidante *in vitro* de uma mistura de compostos ou de substâncias químicas purificadas em baixa concentração (Silva *et al.* 1999), mas devido à complexidade dos compostos químicos presentes em extratos vegetais e aos diferentes mecanismos de ação, faz-se necessário a avaliação por diferentes métodos (Shi *et al.* 2011, Duarte-Almeida *et al.* 2006). O sistema β -caroteno/ ácido linoleico e o método de sequestro do radical livre DPPH[•] são metodologias simples e rápidas, muito convenientes para realização de “*screening*” de atividade antioxidante (Roesler *et al.* 2007).

Os estudos químicos e farmacológicos com espécies de *Pharmacosycea* concentram-se, sobretudo, na investigação da atividade dessas plantas contra vermes (Hansson *et al.* 1986, Amarin *et al.* 1999, Hansson *et al.* 2005). Em relação a possível atividade antioxidante nas espécies do subgênero *Pharmacosycea*, apenas o composto fenólico metoxiflavona foi isolado de *Ficus maxima* (Diaz, 1997), entretanto, não se sabe quais células ou tecidos acumulam esse composto. O objetivo do presente trabalho

foi identificar as principais classes de produtos naturais dos extratos de folhas de espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* e o potencial antioxidante desses extratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e local de coleta

Foram realizadas coletas de folhas de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. (Tabela 1) nos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Pará. A identificação das espécies foi realizada pelos especialistas Leandro Pederneiras e Sergio Romaniuc Neto do Instituto de Botânica de São Paulo (IBT-SP) e Pedro Paulo de Souza da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os materiais testemunho foram depositados nos Herbários VIC da UFV e SP do IBT-SP.

Tabela 1. Espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* coletadas.

Nome científico	Município	Voucher
<i>Ficus pulchella</i> Schott	Angra dos Reis-RJ	VIC 37046
<i>Ficus nevesiae</i> Carauta	Arraial do Cabo-RJ	*
<i>Ficus adhatodifolia</i> Schott ex Spreng.	Viçosa-MG	VIC 31644
<i>Ficus obtusiuscula</i> (Miq.) Miq.	Viçosa-MG	VIC 31713
<i>Ficus maxima</i> Mill.	Belém-PA	SP 443494
<i>Ficus piresiana</i> Vázq. & C.C. Berg	Belém-PA	SP 443493

* material coletado em fase estéril, portanto sem número de registro em herbário.

2.2. Obtenção de extratos etanólicos e soluções padrão

Para obtenção dos extratos etanólicos, as folhas coletadas foram separadas dos ramos, secadas em estufa ventilada a 39 °C por três dias, pulverizadas em moinho de facas e armazenadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os extratos etanólicos de folhas foram obtidos por extração exaustiva em percolador, empregando etanol 95° GL. Em seguida, os extratos etanólicos brutos foram filtrados com papel filtro e concentrados em evaporador rotatório à vácuo até completa remoção do solvente. Os extratos secos foram armazenados em frascos de vidro hermeticamente fechados em refrigerador a -20°C.

Para obtenção das soluções padrão utilizaram-se o antioxidante sintético BHT (Vetec®) e comprimidos com extrato padronizado de *Ginkgo biloba* L. (GinkoLab®) com 17,6-21,6 mg de flavonoides. Os extratos etanólicos secos foram utilizados para as

análises cromatográficas (CCD e CLAE), quantificação de fenólicos totais e para os ensaios de atividade antioxidante e, sempre que necessário, comparados com as soluções padrão.

2.3. Análise histoquímica

Os testes histoquímicos foram realizados em material fresco ou fixado em FAA₅₀ (Johansen 1940) por 48h e conservados em etanol 70%. Todas as amostras foram seccionadas em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação Ltda). Os cortes foram submetidos aos seguintes reagentes: sudan IV (Pearse 1972) para lipídios; sulfato azul do Nilo (Cain 1947) para lipídios ácidos e neutros; reagente NADI (David e Carde 1964) para terpenóides (óleos essenciais e oleoresinas); cloreto férrico (Johansen 1940) para compostos fenólicos; vanilina clorídrica (Mace e Howell 1974) para taninos; cloreto de alumínio (Charrière-Ladreix 1976) para flavonoides; reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg 1981) para alcaloides e xilidine ponceau (Vidal 1970) para proteínas. O controle foi conduzido simultaneamente para cada teste, de acordo com a especificação de cada autor.

As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger Alemanha) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision. A análise com fluorocromos (vermelho neutro, cloreto de alumínio e acetato neutro de chumbo) e a autofluorescência foram realizadas no mesmo microscópio, utilizando o sistema de epifluorescência com lâmpada de mercúrio HBO50W, filtro UV (WU: 340-380nm), espelho dicróico (400nm) e filtro de barreira (420nm).

2.4. Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada utilizando cromatografia em camada delgada (CCD) com sílica gel GF254 (Merck), camada delgada de 0,25 mm, 10 cm de comprimento, com diferentes sistemas eluentes. A visualização de mudança na coloração das manchas dos cromatogramas foi realizada após borrifação com reveladores específicos para grupos de metabólitos secundários e, em alguns casos, com exposição a luz UV 254 e, ou 365 nm, segundo as metodologias descritas por Wagner *et al.* (1984). Os resultados obtidos pela CCD foram confrontados com padrões de referência (Tabela 2).

Tabela 2. Fases móveis, reveladores e padrões de referência utilizados na prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*.

Metabólito secundário	Fase móvel/revelador	Padrão de referência
Cumarinas	acetato de etila:metanol:água (100:17:13)/KOH 10% em etanol	<i>Ficus carica</i>
Alcaloides	acetato de etila:metanol:água (100:14:10)/ Reagente de Drangendorff	Quinina
Triterpenos e esteroides	tolueno:eter:ácido acético 10% (45:45:10)/ reagente de Lieberman Burchard	β -sitosterol
Heterosídeos flavônicos	acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (55:5:5:12)/ AlCl ₃ 5% em metanol	Rutina
Geninas flavônicas	clorofórmio:acetato de etila (60:40) / AlCl ₃ 5% em metanol	Quercetina
Taninos	tolueno:butanol:ácido acético:água (50:25:25:5)/ K ₃ Fe(CN) ₆ 1% e FeCl ₃ 2% (1:1)	Ácido pirogálico
Saponinas	clorofórmio:ácido acético glacial:metanol:água (15:8:3:2)/ Anisaldeído em etanol	Escina

2.5. Caracterização dos extratos por CLAE

Para preparação das amostras foram diluídos 5 mg de cada extrato de *Ficus* em 1,5 mL de metanol grau CLAE com auxílio de sonicador por 30 minutos. Após a diluição, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm durante 5 minutos e depois filtrada com membrana milipore 0,45 μ m. Para as análises foram injetados 10 μ L de cada amostra em aparelho Shimadzu UFLC equipado com bomba binária LC-20AD (Tokyo, Japan), detector de arranjo de diodos SPD-M20A, injetor automático SIL-A0AHT, modulo de comunicação CBM-20A e forno de coluna CTO-20A. A separação cromatográfica foi obtida com coluna Shim-pack VP-ODS (150x4.6mm i.d., 4.6 μ m de tamanho de partícula) da Shimadzu, com coluna guarda (10x4.6mm). As análises foram realizadas a 254 nm, com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel consistiu de solvente A: água pura e solvente B: acetonitrila. O sistema gradiente empregado para obtenção dos cromatogramas está demonstrado na Tabela 3. Todas as amostras foram preparadas e injetadas nas mesmas concentrações e condições cromatográficas, o que permite avaliar a variação na composição química dos constituintes presentes dos extratos de cada espécie.

Tabela 3. Sistema gradiente empregado para obtenção dos cromatogramas dos extratos de seis espécies de *Pharmacosycea* subgênero *Pharmacosycea*.

Tempo (min)	Solvente B (%)
0	5
35	23
40	95
45	95
47	5
50	5

2.6. Quantificação de polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu utilizando padrão de ácido tânico. Foram diluídos, separadamente, 0,01 g de cada extrato de *Ficus* e do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* em 5 mL de metanol com o auxílio de sonificador por 5 minutos. As amostras dos extratos de *Ficus*, do padrão de *Ginkgo biloba* e uma constituída apenas por 5 mL de metanol (branco) foram vertidas em balão volumétrico de 50 mL, e o volume completado com água destilada. Em tubos de ensaio, foram adicionados 8,5 mL da solução de cada extrato, 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 15% e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica[®]). A mistura foi homogeneizada por agitação e deixada em repouso por 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para o branco. As leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata, a 760 nm, com espectrofotômetro UV-1600 Pró-Análise, frente ao branco. Para quantificação dos polifenóis foi empregada uma curva padrão com solução de ácido tânico (CRQ[®]) nas concentrações de: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL. O resultado da quantificação foi expresso como miligramas de equivalentes a ácido tânico por grama de extrato etanólico (EAT/gext) e em miligramas de equivalentes ácido tânico por grama de droga vegetal (EAT/gms).

2.7. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos

2.7.1. Sistema β-caroteno/ ácido linoleico

Este ensaio foi realizado como descrito por Duarte-Almeida *et al.* (2006), com algumas modificações. Para a preparação da emulsão β-caroteno/ ácido linoleico (mistura reativa), foram dissolvidos 2 mg de β-caroteno (Fluka[®]) em 10 mL de clorofórmio (Vetec[®]) e misturados a 250 µL de ácido linoleico (Vetec[®]) e 1,835 mL de

Tween 20 (Vetec®). O clorofórmio foi removido em evaporador rotatório a 50°C por 2 minutos. Foram adicionados 500 mL de água destilada aerada por 30 minutos ao resíduo semi-sólido da solução concentrada, que foi agitado vigorosamente para formar a emulsão.

Os extratos etanólicos brutos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* foram diluídos em metanol a uma concentração de 160 µg/mL. O mesmo foi realizado para as soluções padrão (extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e BHT).

Para determinar as absorvâncias, utilizou-se microplaca de poliestireno com 96 cavidades. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 240 µL da mistura reativa e 10 µL dos extratos de *Ficus* ou o mesmo volume para as soluções padrão. Para o controle utilizou-se 240 µL da mistura reativa e 10 µL de metanol.

As leituras das absorvâncias foram realizadas em triplicata, com leitor de microplaca a 470 nm e temperatura de 45°C. A primeira leitura foi realizada logo após o enchimento das cavidades, com leituras sucessivas em intervalos de 15 minutos até completar o total de 120 minutos.

A porcentagem de inibição das amostras foi avaliada em termos de diminuição das absorvâncias comparadas ao controle, usando a seguinte fórmula:

$$\%I = \left(\frac{((A_{i\text{cont}} - A_{f\text{cont}}) - (A_{i\text{ext}} - A_{f\text{ext}}))}{(A_{i\text{cont}} - A_{f\text{cont}})} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde %I é porcentagem de inibição, $A_{i\text{cont}}$ a absorvância inicial do controle, $A_{f\text{cont}}$ a absorvância final do controle (após 120 min), $A_{i\text{ext}}$ a absorvância inicial do extrato e $A_{f\text{ext}}$ a absorvância final do extrato (após 120 min).

2.7.2. Determinação da capacidade de sequestrar radicais livres

A capacidade de sequestrar radicais livres foi avaliada em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). Este ensaio foi realizado como descrito por Duarte-Almeida *et al.* (2006), com algumas modificações. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH a 0,1 mM. Os extratos etanólicos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* e os padrões (extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e BHT) foram diluídos em metanol em diferentes concentrações (Apêndice I).

Para determinar as absorbâncias, utilizou-se microplaca de poliestireno com 96 cavidades. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 µL da solução de DPPH e 40 µL dos extratos de *Ficus* ou o mesmo volume para as soluções padrão. Para o controle utilizaram-se 250 µL da solução de DPPH e 40 µL de metanol.

Após 30 minutos de reação ao abrigo da luz e a temperatura de 25°C, as leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata, com leitor de microplaca a 470 nm.

A atividade sequestradora de radical livre DPPH^{*} (diminuição da absorbância) de cada amostra foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ captura de radical livre DPPH} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: A_{amostra} e A_{controle} são as absorbâncias das amostras e do controle, respectivamente. A concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical livre DPPH^{*} (IC₅₀) foi estimada pela equação da reta obtida nas regressões.

A concentração de extrato necessária para atingir 50% de captura dos radicais livres DPPH^{*} (IC₅₀) foi calculada a partir de regressões logarítmicas ou lineares (apenas para *Ginkgo biloba*).

2.8. Análises estatísticas

Os dados de quantificação fenólica e da atividade antioxidante *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi realizada por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Também foi avaliada a correlação de Pearson entre o conteúdo de polifenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos (p<0,05).

3. RESULTADOS

3.1. Histoquímica

Há compostos fenólicos, compostos de natureza lipídica e proteínas nas seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* (Figura 1A-Q). Todas as espécies apresentaram resultados positivos para compostos fenólicos totais nos tricomas glandulares (Figura 1A e B), mas apenas *F. piresiana* e *F. obtusiuscula* apresentaram resultados positivos para taninos condensados (proantocianidinas) no parênquima paliçádico (Figura 1C e D). Os laticíferos de todas as espécies apresentaram resultado positivo para substâncias lipídicas (Figura 1F-H e K-O) e proteínas (Figura 1Q). As substâncias lipídicas são caracterizadas por uma mistura de terpenos (Figura 1G e M) e partículas de borracha (Figura 1H e N). Apenas *F. piresiana* possui compostos fenólicos nos laticíferos que estão no córtex, medula ou entremeados no floema da nervura principal (Figura 1D e P). Os testes realizados para detecção de flavonoides e alcaloides não apresentaram resultados positivos. Para comparação com os resultados dos testes também são apresentadas seções de materiais sem aplicação de corantes ou reagentes (branco) (Figura 1 A, C, E e J).

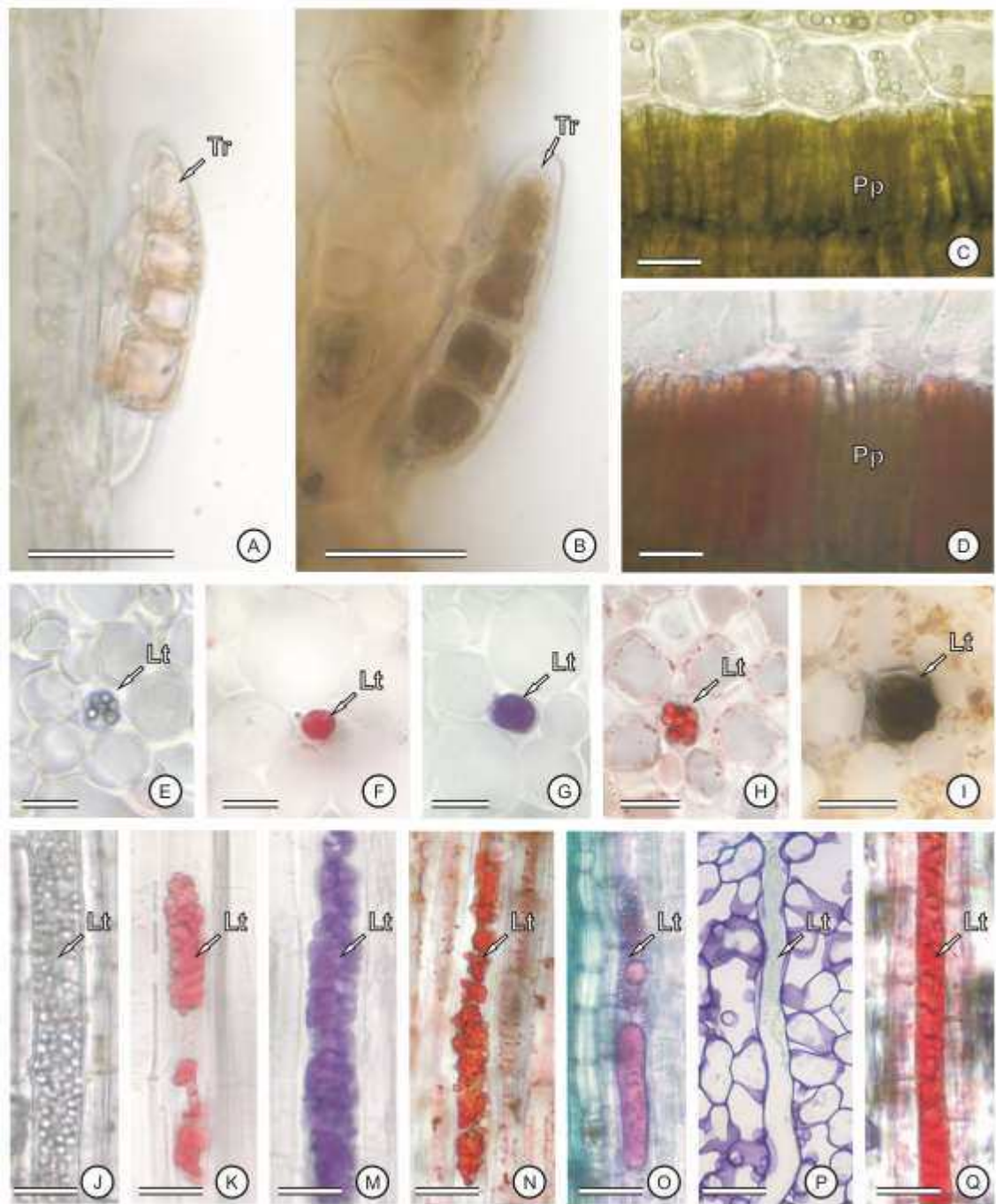


Figura 1. Testes histoquímicos em folhas de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*. A, B, E-H e J-O (*Ficus adhatodifolia*); C, D e Q (*Ficus obtusiuscula*); I e P (*Ficus piresiana*). Fotomicrografias das seções transversais (A-I) e longitudinais (J-Q). A, C, E e J. Material sem aplicação de corantes ou reagentes (branco). B e I. Cloreto férrico para fenólicos (positivo: coloração negra). D. Vanilina clorídrica para taninos (positivo: coloração vermelha). F e K. Sudan IV para lipídeos totais (positivo: coloração vermelha). G e M. Reagente NADI para terpenos (positivo: coloração violeta). H e N. Oil Red para borracha (positivo: coloração vermelha). O. Sulfato de azul do Nilo para lipídeos neutros (positivo: coloração rosa); P. Compostos fenólicos corados de verde pelo azul de toluidina. Q. Xilidine ponceau para proteínas (positivo: coloração vermelha). Lt (laticíferos); Tt (tricomatos). Barras: A e B, E-Q = 25 μ m; C e D = 50 μ m.

3.2. Prospecção fitoquímica

Há presença de triterpenos e esteroides nos extratos etanólicos de *F. adhatodifolia*, *F. nevesiae*, *F. obtusiuscula* e *F. pulchella*; cumarinas em *F. adhatodifolia*, *F. nevesiae* e *F. obtusiuscula*; heterosídeos flavônicos em todas as espécies (exceto *F. pulchella*); e de taninos em todas as espécies. Saponinas, alcaloides e geninas flavônicas não foram encontrados em nenhum dos extratos (Tabela 4).

Tabela 4. Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*.

Grupo de compostos	ADH	NEV	OBT	MAX	PIR	PUL
Saponinas	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Triterpenos e esteroides	+	+	+	-	-	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	-
Taninos	+	+	+	+	+	+

(+) presença; (-) ausência. *Ficus adhatodifolia* (ADH); *F. nevesiae* (NEV); *F. obtusiuscula* (OBT); *F. maxima* (MAX); *F. piresiana* (PIR); *F. pulchella* (PUL).

3.3. Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos obtidos por CLAE

Os picos majoritários dos cromatogramas foram selecionados para obtenção de espectros de varredura na região de UV, o que possibilitou inferir sobre a natureza química dos compostos correspondentes a cada pico (Figura 2A-F). As duas bandas dos espectros de UV de cada pico majoritário têm absorção máxima nas regiões de 270 e 335 nm que podem ser referentes aos cromóforos benzoíla e cinamoíla, respectivamente. Entretanto, os perfis cromatográficos entre os extratos analisados se diferenciam, não sendo observado um marcador químico em comum entre eles.

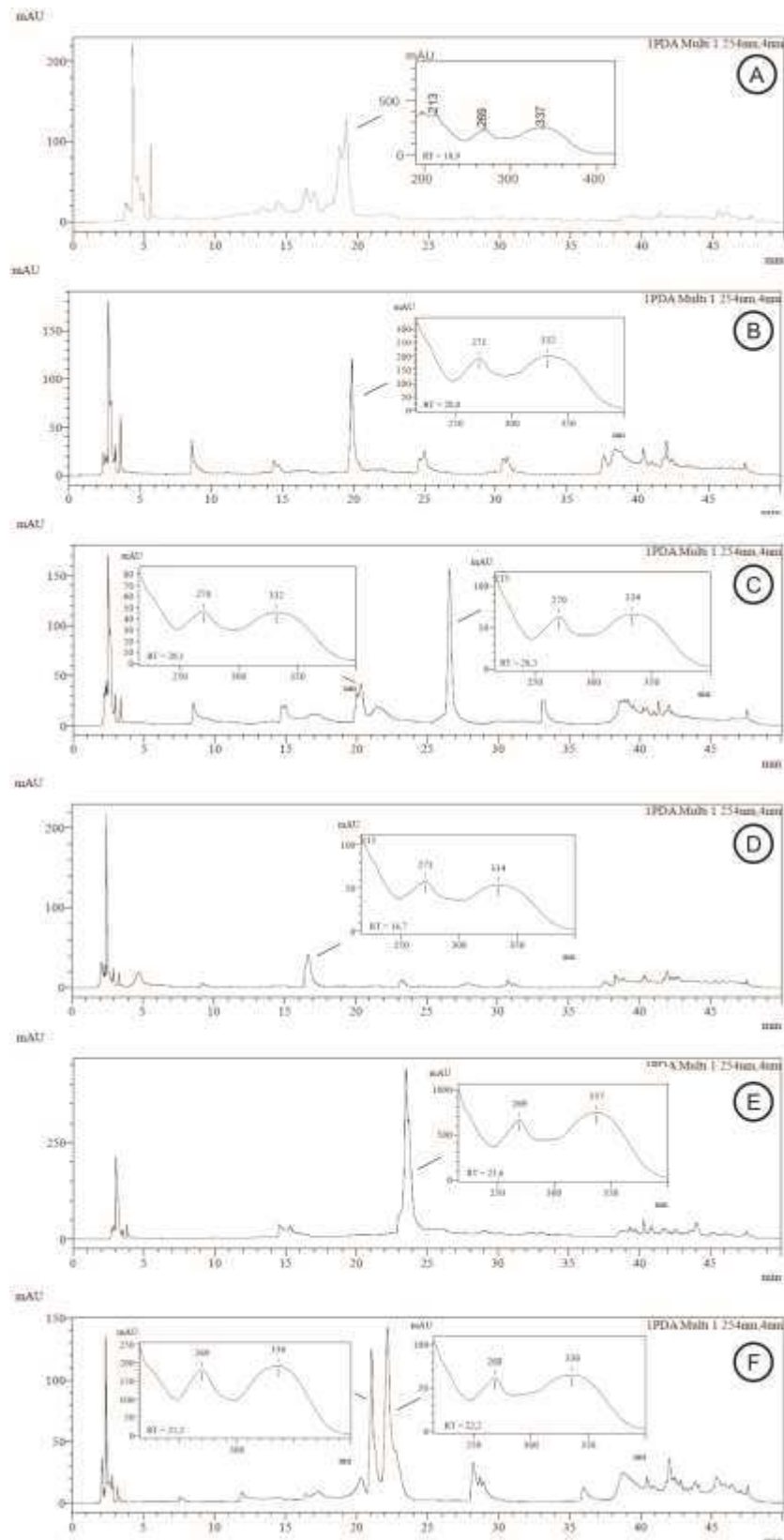


Figura 2. Perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* obtidos por CLAE a 254 nm e respectivos espectros de UV de alguns picos majoritários. A. *Ficus adhatodifolia*. B. *Ficus nevesiae*. C. *Ficus obtusiuscula*. D. *Ficus pulchella*. E. *Ficus piresiana*. F. *Ficus maxima*.

3.4. Quantificação de fenólicos totais

O conteúdo fenólico em miligrama de equivalente a ácido tânico por grama de extrato bruto seco foi menor em *F. pulchella*, *F. adhatodifolia* e *F. nevesiae*, não havendo diferença significativa entre essas três espécies. *F. maxima* e *F. obtusiuscula* apresentaram concentração intermediária de polifenóis nos extratos e *F. piresiana* apresentou a maior concentração de polifenóis. Já em relação ao conteúdo fenólico em miligrama de equivalente a ácido tânico por grama de droga vegetal a espécie com menor teor de fenólico foi *F. pulchella* e a com maior teor de fenólico foi *F. obtusiuscula*. Houve diferença significativa entre a maioria dos extratos, exceto entre *F. adhatodifolia* e *F. nevesiae* e entre *F. maxima* e *F. piresiana* (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de polifenóis totais dos extratos etanólicos brutos de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* determinada pelo método colorimétrico com reagente de Folin-Ciocalteu.

Extrato etanólico (espécies de <i>Ficus</i>)	Rendimento (%)	Conteúdo fenólico (mg EAT/g ext)	Conteúdo fenólico (mg EAT/g dv)
<i>F. pulchella</i>	7,9	34,93±0,33a	2,75±0,02a
<i>F. adhatodifolia</i>	12,8	46,13±4,81a	5,9±0,61b
<i>F. nevesiae</i>	11,3	46,27±5,62a	5,2±0,63b
<i>F. obtusiuscula</i>	13,9	79,24±4,82b	11,01±0,67d
<i>F. maxima</i>	9,2	92,96±5,32b	8,55±0,48c
<i>F. piresiana</i>	6,9	126,22±8,02c	8,7±0,55c

As médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível 5% pelo teste de Tukey. EAT (equivalentes ácido tânico); ext (extrato); dv (droga vegetal).

3.5. Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico

Os extratos etanólicos de folhas das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* impediram a oxidação (descoloração) do β -caroteno pelos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O comportamento dos extratos ao longo do tempo foi similar em todas as amostras analisadas (Figura 3).

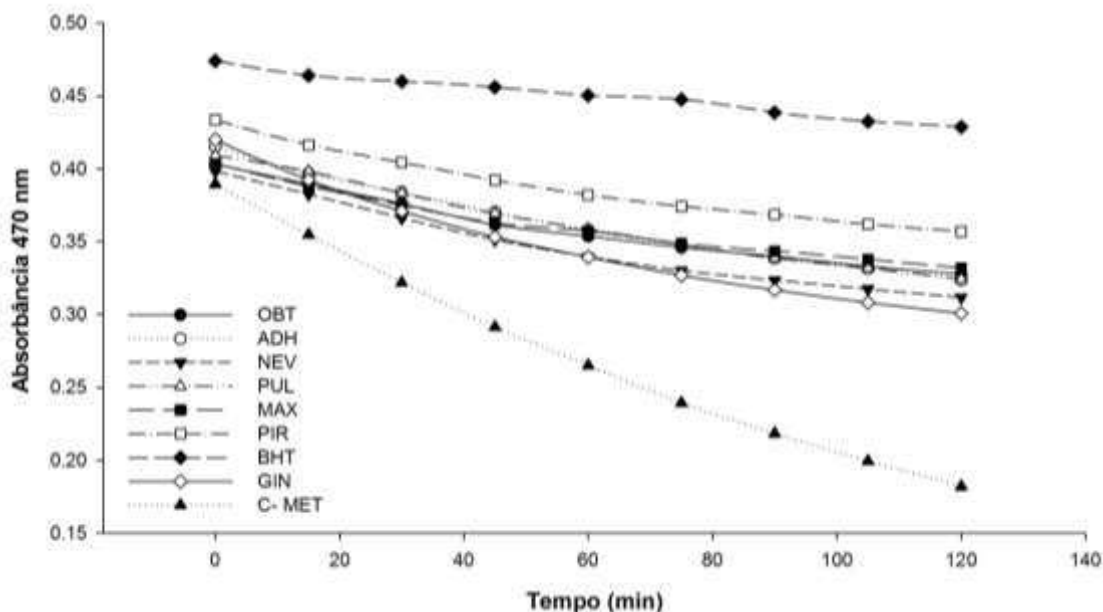


Figura 3. Comportamento, ao longo do tempo, da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e do antioxidante sintético BHT na dose de 160 µg/mL, analisados pelo sistema β-caroteno/ ácido linoleico. *F. obtusiuscula* (OBT); *Ficus adhatodifolia* (ADH); *F. nevesiae* (NEV); *F. pulchella* (PUL); *F. maxima* (MAX); *F. piresiana* (PIR); *Ginkgo biloba* (GIN); controle metanol (C-MET).

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos, expressa em porcentagem de inibição, em ordem decrescente foi: *F. maxima* (65,47%) > *F. obtusiuscula* (63,64%) > *Ficus piresiana* (63,14%) > *F. pulchella* (59,03%) > *F. nevesiae* (58,23%) > *F. adhatodifolia* (55,91%). O extrato padronizado de *Ginkgo biloba* apresentou uma inibição de 42,62% e o BHT 78,05%. Não houve diferença significativa da atividade antioxidante entre as espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* (Figura 4). No entanto, *F. obtusiuscula*, *F. maxima* e *F. piresiana* apresentaram atividade antioxidante maior do que o extrato padronizado de *G. biloba*, sendo esta similar a atividade antioxidante apresentada pelo composto sintético BHT (Figura 4).

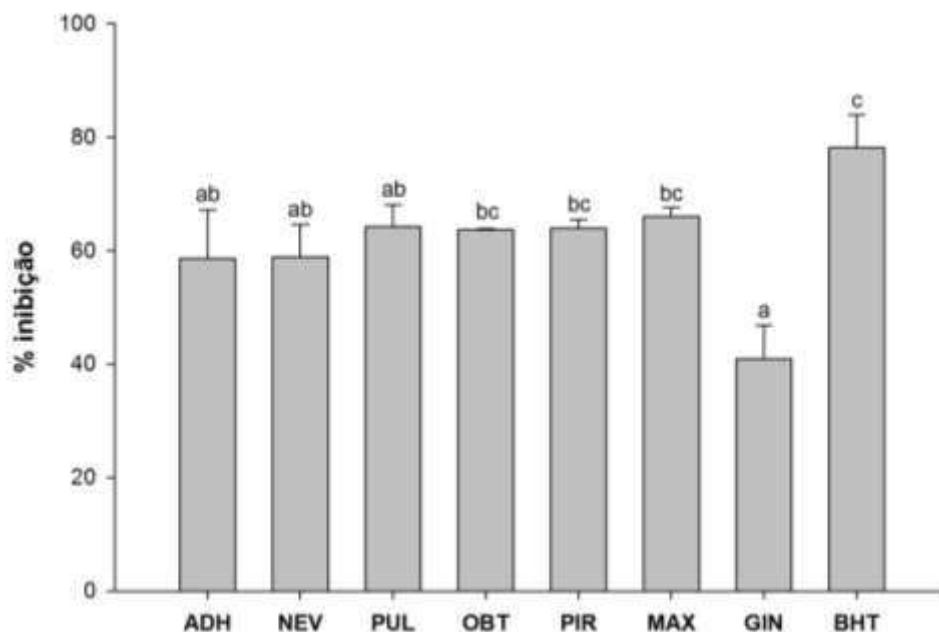


Figura 4. Atividade antioxidante, expressa em porcentagem de inibição, dos extratos etanólicos de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e do antioxidante sintético BHT na dose de 160 $\mu\text{g/mL}$, analisados pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico. Os dados são apresentados com média e desvio padrão. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey. *Ficus adhatodifolia* (ADH), *F. nevesiae* (NEV), *F. pulchella* (PUL), *F. obtusiuscula* (OBT), *F. piresiana* (PIR), *F. maxima* (MAX), *Ginkgo biloba* (GIN).

3.6. Avaliação antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH*

Os extratos etanólicos de folhas das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* atuam na captura do radical livre DPPH* de modo dose-dependente (Figura 5). A atividade antioxidante dos extratos etanólicos, expressa pela IC_{50} , em ordem decrescente é: *F. nevesiae* (147,56 $\mu\text{g/mL}$) > *F. pulchella* (79,33 $\mu\text{g/mL}$) > *F. maxima* (76,06 $\mu\text{g/mL}$) > *F. obtusiuscula* (52,33 $\mu\text{g/mL}$) > *F. adhatodifolia* (28,38 $\mu\text{g/mL}$) > *Ficus piresiana* (18,30 $\mu\text{g/mL}$). O extrato padronizado de *Ginkgo biloba* apresentou IC_{50} de 16,27 $\mu\text{g/mL}$ e o BHT 4,94 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade antioxidante apresentada pelo extrato de *F. piresiana* é semelhante à atividade antioxidante do extrato padronizado de *G. biloba*. Há diferença significativa entre a atividade antioxidante de todas as espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* analisadas (exceto entre *F. piresiana* e *F. adhatodifolia* e entre *F. maxima* e *F.*

pulchella). O composto sintético BHT apresentou a melhor atividade antioxidante por este método (Figura 6).

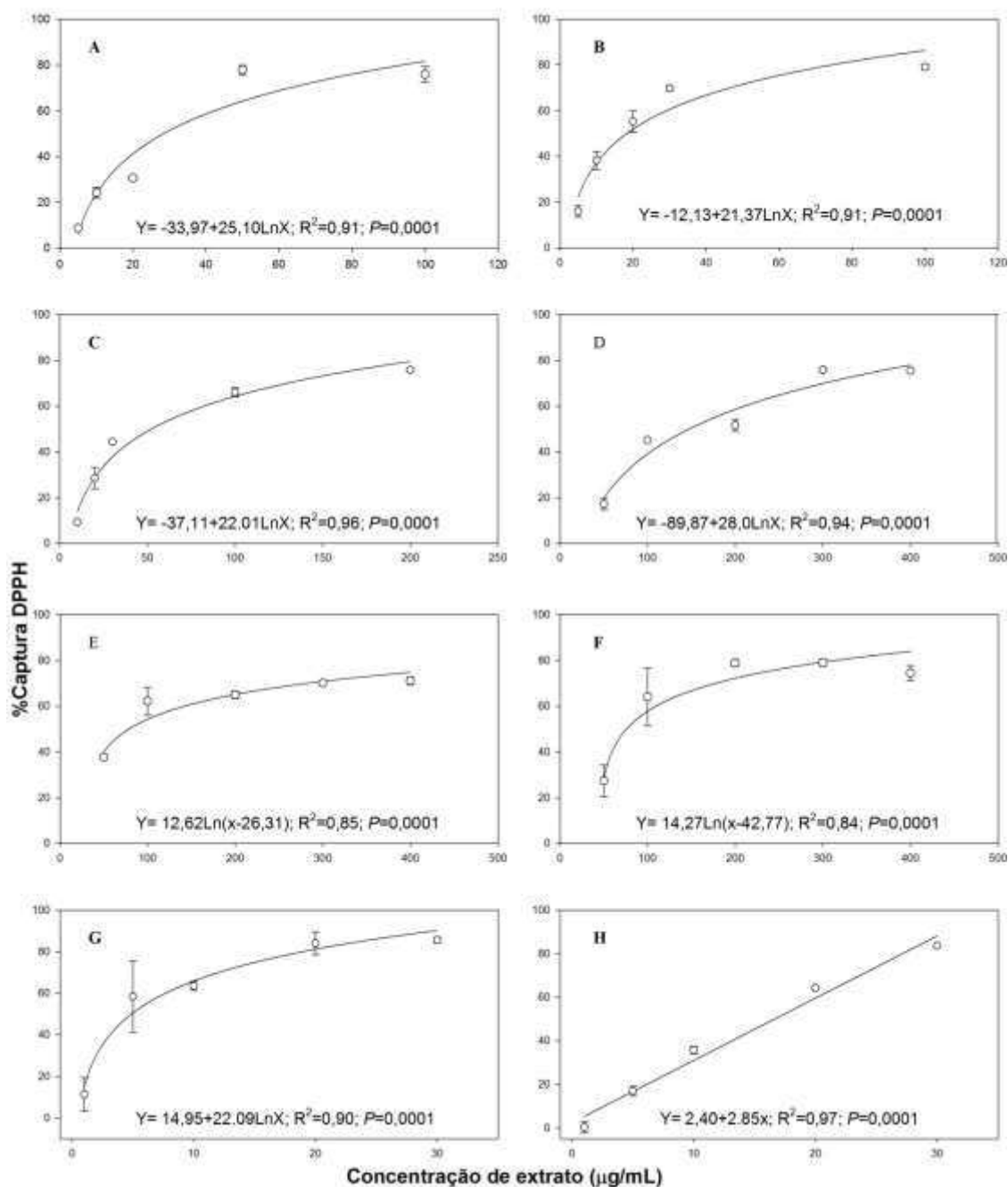


Figura 5. Comparação das curvas obtidas pelo método de captura do radical livre DPPH^{*} para cálculo do valor da IC₅₀ dos extratos etanólicos de folhas de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e do antioxidante sintético BHT. Os dados são apresentados com média e erro padrão. A. *F. adhatodifolia*. B. *F. piresiana*. C. *F. obtusiuscula*. D. *F. nevesiae*. E. *F. pulchella*. F. *F. maxima*. G. BHT. H. *Ginkgo biloba*.

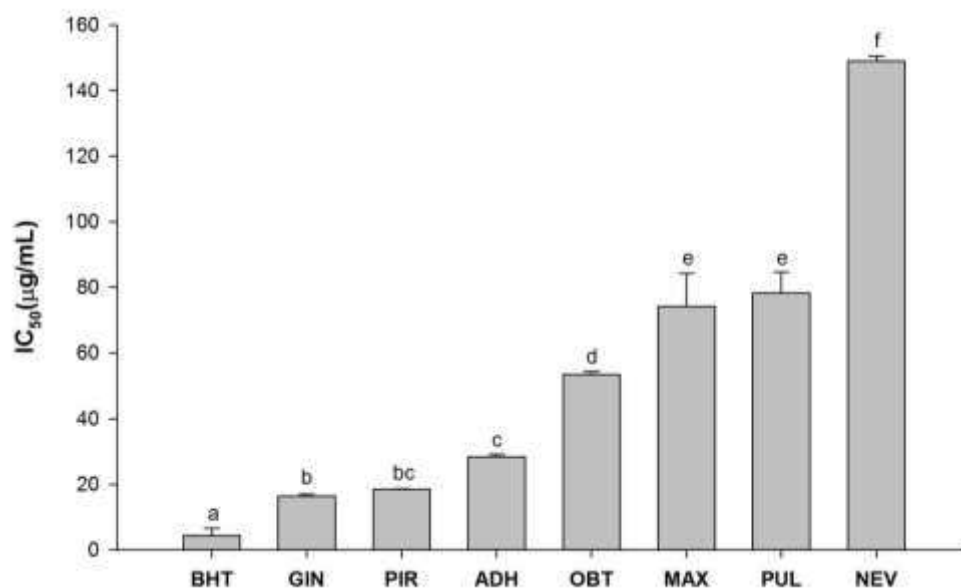


Figura 6. Comparação entre os valores de IC₅₀ dos extratos etanólicos de folhas de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e do BHT. Os dados são apresentados com a média e o desvio padrão. As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey. *Ginkgo biloba* (GIN), *F. piresiana* (PIR), *Ficus adhatodifolia* (ADH), *F. obtusiuscula* (OBT), *F. maxima* (MAX), *F. pulchella* (PUL), *F. nevesiae* (NEV).

3.7. Análises de correlação

O coeficiente de correlação de Pearson entre o teor de polifenóis totais e a capacidade antioxidante dos extratos, avaliada pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico, foi positiva (Figura 7).

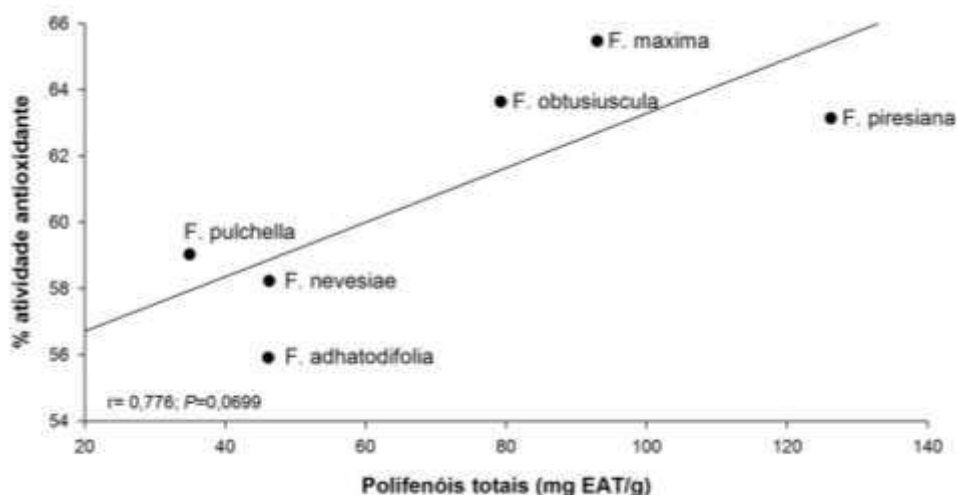


Figura 7. Correlação de Pearson entre a concentração de polifenóis totais e capacidade antioxidante avaliada pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico dos extratos etanólicos de folhas de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*.

O coeficiente de correlação de Pearson entre o teor de polifenóis totais e a IC_{50} foi negativo (Figura 8), pois as espécies com maior conteúdo fenólico apresentaram menor IC_{50} . Entretanto, os menores valores de IC_{50} correspondem a um melhor desempenho de captura do radical $DPPH^{\bullet}$, de modo que, por este método, também há correlação positiva entre a concentração de fenólicos e a capacidade antioxidante dos extratos.

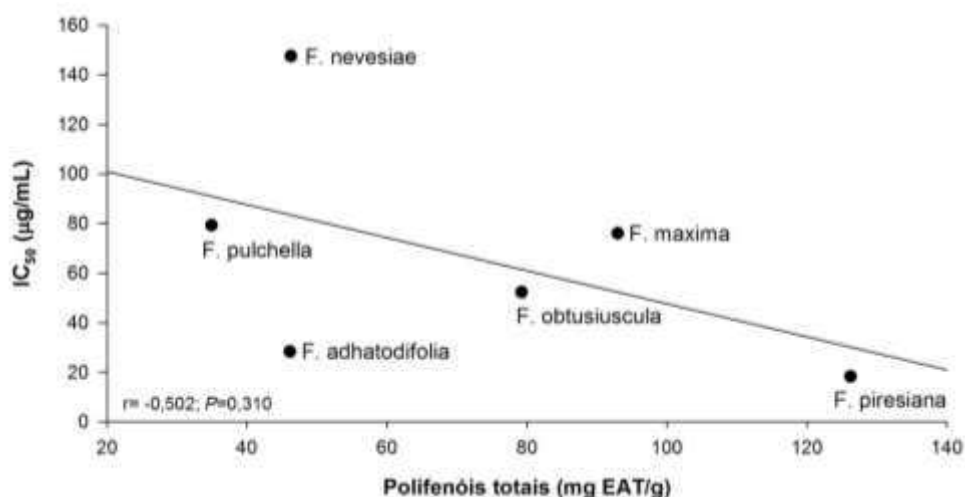


Figura 8. Correlação de Pearson entre a concentração de polifenóis totais e a IC_{50} avaliada pelo método de captura do radical livre $DPPH^{\bullet}$ pelos extratos etanólicos de folhas de seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*.

4. DISCUSSÃO

As espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* possuem compostos fenólicos, especialmente taninos e flavonoides, com atividade antioxidante, que pode estar relacionada aos usos populares das folhas dessas plantas contra inflamações. A casca do caule de *Ficus bengalensis* possui flavonoides e taninos com ação antiinflamatória que atuam justamente sobre o estresse oxidativo (Sirisha *et al.* 2010). Assim, os extratos etanólicos brutos das folhas das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* merecem ser avaliados do ponto de vista farmacológico no combate a processos inflamatórios.

A quantidade de fenólicos totais encontrada em *F. obtusiuscula*, *F. maxima* e *F. piresiana* é similar a de outras espécies do gênero que também apresentam boa atividade antioxidante, como *F. auriculata*, *F. vasculosa*, *F. callosa*, *F. virens* var. *virens*, *F. racemosa*, *F. oligodon* (Shi *et al.* 2011), *F. afzelii*, *F. decora*, *F. lyrata*, *F. nitida*, *F. sycomorus* e *F. virens* (Abdel-Hameed 2009). Em *F. maxima* e *F. piresiana* a quantidade de fenólicos é superior a de espécies reconhecidamente ricas em nesses compostos e que apresentam atividade antioxidante como *Camellia sinensis* (chá verde e chá preto), largamente utilizado para prevenir doenças cardiovasculares, como antidiabético e para redução de gordura (Nor Qhairul Izzreen e Mohd Fadzelly 2013).

A atividade antioxidante de todas as espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, avaliada pelo método do sistema β -caroteno/ ácido linoleico, foi maior do que as frações metanólica e acetônica das folhas de *Camellia sinensis*, da casca do caule de *F. racemosa* e das raízes aéreas de *F. bengalensis* que tiveram inibição entre 34,3% e 38,3%, sendo estes valores considerados bons quando comparados à inibição de 35% do reconhecido antioxidante natural, α -tocopherol (Manian *et al.* 2008). *F. obtusiuscula*, *Ficus maxima* e *F. piresiana* foram as três espécies com melhor atividade antioxidante, com valores de inibição similares aos encontrados em *F. callosa*, *F. auriculata* e *F. virens* var. *virens*, espécies com alto potencial antioxidante (Shi *et al.* 2011).

A atividade antioxidante de *F. piresiana*, *F. adhatodifolia* e *F. obtusiuscula*, avaliada pelo método de captura do radical DPPH[•], foi similar a de *F. alzelli*, *F. decora*, *F. lyrata*, *F. nitida*, *F. sycomorus*, *F. virens* (Abdel-Hameed 2009), *F. racemosa* e *F. bengalensis* (Manian *et al.* 2008), consideradas espécies com alto potencial antioxidante. A capacidade de captura do radical DPPH[•] foi classificada como forte (acima de 70% de captura), moderada (50-70%) e fraca (abaixo de 50%) em frutas comercializadas no Estado de Pernambuco, Brasil (Melo *et al.* 2008). Em comparação

com os dados desses autores, *F. adhatodifolia* e *F. piresiana* apresentam forte capacidade de sequestrar radicais livres (similar a acerola, caju, mamão, laranja pêra e goiaba); *F. obtusiuscula*, *F. maxima* e *F. pulchella* atividade moderada (similar a abacaxi, laranja cravo, manga rosa, melão e pinha) e *F. nevesiae* fraca atividade (similar a manga espada e melancia). *F. adhatodifolia* e *F. piresiana* apresentaram capacidade de sequestrar radicais livres superior a *Camellia sinensis* (Nor Qhairul Izzreen e Mohd Fadzelly 2013).

Pelo método do sistema β -caroteno/ ácido linoleico, os valores de inibição apresentados pelas espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* foram superiores ao extrato padronizado de *Ginkgo biloba*, o que poderia abrir caminho para exploração dessas espécies como antioxidantes naturais, pois o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* é rico em flavonoides (Mensor *et al.* 2001). Pelo método de captura do radical DPPH[•], *F. piresiana* foi à única espécie que apresentou valores de IC₅₀ similares ao extrato padronizado de *Ginkgo biloba*. Nenhuma espécie atingiu valores compatíveis com o desempenho do BHT pelos dois métodos. O BHT é um composto antioxidante sintético usado na indústria para conservação de alimentos (Soares 2002). Entretanto, atualmente os esforços estão sendo direcionados para encontrar produtos naturais com atividade antioxidante que possam substituir os antioxidantes sintéticos ou fazer associações entre eles (Soares 2002), pois os níveis de ingestão diária de antioxidantes sintéticos têm sido reduzidos porque existe a possibilidade de serem tóxicos (Anagnostopoulou *et al.* 2006).

Em casos onde mais de um método é utilizado para avaliação da atividade antioxidante, pode haver discrepância entre os resultados, como ocorreu no presente trabalho. Essa discrepância entre dois métodos também foi observada no extrato de acerola, que apresentou excelente atividade pelo método de sequestro do DPPH e se comportou como pró-oxidante no sistema β -caroteno/ ácido linoleico (Duarte-Almeida *et al.* 2006). No método de sequestro do DPPH as substâncias pró-oxidantes não são detectadas, de modo que as discrepâncias entre os resultados são inerentes metodologia utilizada (Melo *et al.* 2008). Além disso, a composição química heterogênea dos extratos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* também pode ter contribuído para diferenças entres os resultados, pois a estrutura química do componente ativo tem influência sobre a eficácia do antioxidante natural, como também outros fitoquímicos presentes nos extratos vegetais interferem nessa atividade (Melo *et al.* 2008).

Estudos têm estabelecido uma correlação positiva entre a quantidade de fenólicos e a atividade antioxidante (Abdel-Hameed 2009, Cai *et al.* 2004, Shi *et al.* 2011), enquanto outros relatam não haver correlação (Kähkönen *et al.* 1999). A correlação entre o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante apresentada pelas espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* nos dois métodos (sistema β -caroteno/ácido linoleico e DPPH) foi positiva, o que sugere que os compostos fenólicos estão contribuindo significativamente para a atividade antioxidante das substâncias em teste (Cai *et al.* 2004).

A capacidade antioxidante de um extrato deve ser analisada de modo amplo levando-se em conta o teor de fenólicos totais, composição química e o seu desempenho em cada método utilizado para teste. Neste sentido, *F. piresiana* merece destaque como a espécie mais promissora para estudos futuros relacionados ao potencial antioxidante de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* nativas do Brasil, pois possui o maior conteúdo fenólico e potencial antioxidante similar ao extrato padronizado de *Ginkgo biloba* nos dois testes.

5. CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos brutos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* são ricos em compostos fenólicos que apresentam forte ação antioxidante. Portanto, estudos adicionais são necessários para demonstrar o comportamento desses extratos em alvos celulares mais específicos e, ou *in vivo*, como também quais substâncias estariam envolvidas com essa atividade. A investigação da relação entre a atividade antioxidante e a possível ação antiinflamatória desses compostos fenólicos poderiam confirmar os usos populares dessas plantas no combate de inflamações.

6. REFERÊNCIAS

- Abdel-Hameed ES. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. **Food Chemistry 114**: 1271-1277.
- Amorin A, Borba HR, Carauta JPP, Lopes D, Kaplan MAC. 1999. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. **Journal of Ethnopharmacology 64**: 255-258.
- Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimepoulou AN, Boskou D. 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry 94**: 19-25.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences 74**: 2157-2184.
- Cain AJ. 1947. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. **Quarterly Journal of Microscopical Science 88**: 383-92.
- Carauta JPP, Diaz BE. 2002. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro, Editora UFRJ, 212p.
- Charrière-Ladriex Y. 1976. Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta 129**: 167-174.
- David R, Carde JP. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris. Série D 258** : 1338-1340.
- Diaz G, Arruda AC, Arruda MSP, Muller AH. 1997. Methoxyflavones from *Ficus maxima*. **Phytochemistry 45**(8): 1697-1699.
- Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH \cdot . **Ciênc. Tecnol. Aliment. 26**(2): 446-452.
- Duke, JA. 1994. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. USA. p. 181.
- Furr M, Mahlberg PG. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products 44** : 153-159.

- Geronikaki AA, Gavalas AM. 2006. Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening** **9**: 425-442.
- Hansson A, Veliz G, Naquira C, Amren M, Arroyo M, Arevalo G. 1986. Preclinical and clinical studies with latex from *Ficus glabrata* HBK, a traditional intestinal anthelmintic in the Amazonian area. **Journal of Ethnopharmacology** **17**(2): 105-138.
- Hansson A, Zelada JC e Noriega HP. 2005. Reevaluation of risks with the use of *Ficus insipida* latex as a traditional anthelmintic remedy in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology** **98**: 251-257.
- Johansen DA. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **J. Agric. Food Chem.** **47**: 3954-3962.
- Kiem PV, Cuong NX, Nhiem NX, Thu VK, Ban NK, Minh CV, Tai BH, Hai TN, Lee SH, Jang HD, Kim YH. 2011. Antioxidant activity of a new C-glycosylflavone from the leaves of *Ficus microcarpa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** **21**: 633-637.
- Kirk PW. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Stain Technology** **45**: 1-4.
- Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD, Newman RA. 2008. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology** **119**: 195-213.
- Lentz DL, Clark AM, Hufford CD, Meurer-Grimes B, Passeiter CM, Cordero J, Ibrahim O, Okunade AL. 1998. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **J Ethnopharmacol** **63**(3): 253-263.
- Mace ME e Howell CR. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany** **52**: 2423-2426.
- Manian R, Anusuya N, Siddhuraju P, Manian S. 2008. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry** **107**: 1000-1007.

- Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Nascimento RJ. 2008. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** **44**(2): 193-201.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Reserach** **15**:127-30.
- Nor Qhairul Izzreen MN e Mohd Fadzelly AB. 2013. Phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Camellia sinensis* leaves from Sabah Tea Plantation in Sabah, Malaysia. **International Food Research Journal** **20**(1): 307-312.
- Pearse AGE. 1980. **Histochemistry theoretical and applied. Vol. 2. 4th edn.** Churchill Livingstone: Edinburgh, UK.
- Peckolt, G. Brazilian anthelmintic plants. 1942. **Rev. Flora Med.** **9**(7): 333.
- Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.** **20**(7): 933-956.
- Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** **27**(1): 53-60.
- Shi YX, Xu YK, Hu HB, Na Z, Wang WH. 2011. Preliminary assessment of antioxidant activity of young edible leaves of seven *Ficus* species in the ethnic diet in Xishuangbanna, Southwest China. **Food Chemistry** **128**: 889-894.
- Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova** **22**(1):
- Sirisha N, Sreenivasulu M, Sangeeta K, Madhusudhana CC. 2010. **International Journal of PharmTech Research** **2**(4): 2174-2182.
- Soares ES. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.** **15**(1): 71-81.
- Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, Altman A, Kerem Z, Flaishman MA. 2006. Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica* L.). **J. Agric. Food Chem.** **54**: 7717-7723.
- Vidal BC. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. **Annals Histochemical** **15**: 289-296.

Wagner H, Bland S e Zgainski EM. 1984. **'Plant drug analysis'** Springer-Verlag: Berlin.

6. CONCLUSÕES GERAIS

As 11 espécies estudadas representam mais da metade das espécies do subgênero *Pharmacosycea* seção *Pharmacosycea* que, a partir desse trabalho, poderão ser reconhecidas em fase vegetativa por meio da chave elaborada com base nos caracteres anatômicos. O estudo anatômico foliar das espécies e as análises fenéticas conduzidas neste trabalho confirmam a importância da anatomia como subsídio para a taxonomia de *Ficus*.

Os extratos etanólicos brutos das seis espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea* são ricos em compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante. Este deve ser o ponto de partida para outros estudos com um número maior de espécies, inclusive do subgênero *Urostigma*. Estudos adicionais são necessários para demonstrar o comportamento desses extratos em alvos celulares mais específicos e, ou *in vivo*. Também é necessário saber quais substâncias estariam envolvidas com essa atividade. A investigação da relação entre a atividade antioxidante e a possível ação antiinflamatória desses compostos fenólicos poderiam confirmar os usos populares dessas plantas no combate de inflamações.

Apêndice I. Porcentagem de captura do radical livre DPPH pelos extratos das espécies de *Ficus* subgênero *Pharmacosycea*, extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e BHT.

<i>Ficus adhatodifolia</i>						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
100	79.74419	75.2093	72.93023	75.96124	3.468652272	
50	76.25581	77.27907	80.2093	77.91473	2.051965952	
20	31.48499	30.33175	29.82622	30.54766	0.850198944	
10	23.14376	22.66983	26.77725	24.19695	2.247139367	
5	8.878357	8.593997	8.657188	8.709847	0.14931487	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	27.66	29.13	28.35	28.38	0.73545904	
<i>Ficus pulchella</i>						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
400	69.09953	72.54344	71.4218	71.02159	1.75649337	
300	69.69984	69.52607	70.96367	70.06319	0.784658827	
200	62.96998	65.95577	65.92417	64.94997	1.71479395	
100	55.35545	67.1722	64.297	62.27488	6.162433533	
50	38.83096	37.69352	36.57188	37.69879	1.12955107	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	85.19	74.79	78.21	79.33	5.388023756	
<i>Ficus piresiana</i>						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
100	78.23956	80.12704	78.67514	79.01391	0.988291729	
30	70.74419	68.90698	69.55814	69.73643	0.931491396	
20	60.72093	52.53488	52.51163	55.25581	4.732943816	
10	34.72093	42.44186	37.44186	38.20155	3.916125317	
5	16.18605	13.39535	18.2093	15.93023	2.417150726	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	17.91	18.45	18.55	18.30333	0.344286702	
<i>Ficus maxima</i>						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
400	78.09437	73.1216	72.05082	74.42226	3.224894384	
300	80.7441	78.5118	77.7314	78.99577	1.563574678	
200	79.45554	79.89111	77.07804	78.80823	1.514130893	
100	77.42287	62.75862	52.15971	64.11373	12.68597781	
50	30.7078	31.79673	19.47368	27.32607	6.822130054	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	68.82	74.25	85.11	76.06	8.294462008	
<i>Ficus nevesiae</i>						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
400	75.55814	75.2093	75.5814	75.44961	0.20843922	
300	76.55814	76.13953	74.74419	75.81395	0.949794319	
200	52.74419	48.65116	53.2093	51.53488	2.508180235	
100	45.11628	45.30233	44.95349	45.12403	0.174547756	
50	14.48837	17.69767	19.34884	17.17829	2.471507001	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	149	149.6	144.08	147.56	3.028663071	
<i>Ficus obtusiuscula</i>						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
200	74.62791	76.23256	76.5814	75.81395	1.041850083	
100	67.95349	64.02326	66.06977	66.0155	1.9656781	
30	44.77093	44.21801	44.18641	44.39179	0.32873068	
20	33.27014	28.26224	23.94945	28.49394	4.664665398	
10	9.210111	8.878357	9.57346	9.220642	0.347671002	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	49.88	53.53	53.59	52.33333	2.12486078	
<i>Ginkgo biloba</i>						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
30	82.96998	83.47551	84.2654	83.5703	0.65289031	
20	63.96524	64.06003	64.50237	64.17588	0.28669105	
10	34.37599	37.67773	34.9921	35.68194	1.755640657	
5	14.88152	16.49289	19.3207	16.89837	2.247194897	
1	0.458136	2.71722	2.464455	0.236967	2.597907741	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	16.96	15.48	16.37	16.27	0.745050334	
BHT						
Dose (µg/mL)	% inib 1	% inib 2	% inib 3	MÉDIA	DESVP. PAD.	
30	86.69691	85.78947	84.06534	85.51724	1.336744089	
20	89.85481	82.90381	79.03811	83.93224	5.481194131	
10	62.03267	65.89837	62.45009	63.46038	2.121653244	
5	74.84574	59.50998	40.67151	58.34241	17.11700612	
1	14.08348	17.6225	2.068966	11.25832	8.152565102	
IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ 1	IC ₅₀ 2	IC ₅₀ 3	MED. IC ₅₀	DESVP.PAD. IC ₅₀	
	3.78	4.26	6.78	4.94	0.339411255	