

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Zollernia ilicifolia* (BRONGNIART) VOGEL
(FABACEAE): CONTRIBUIÇÃO AO CONTROLE DE QUALIDADE DE
ESPINHEIRA-SANTA (*Maytenus* spp.)**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Farmácia.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Miriam de
Barcellos Falkenberg**

MICHELE DEBIASI ALBERTON

FLORIANÓPOLIS

2001

*Ao Wanderson, meu amigo e companheiro de todas
as horas, pela paciência, amor e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Seria impossível agradecer aqui a todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

Agradeço sobretudo à Prof.^a Miriam, por ter acreditado na minha capacidade desde o início e ter me dado a oportunidade de começar. A todos os professores que, de alguma maneira, também contribuíram para a concretização do trabalho.

Agradeço a UFSC, por ter disponibilizado recursos materiais e laboratórios para a realização do trabalho. A CAPES, pelo financiamento do trabalho e de minha bolsa de pesquisa.

Aos colegas do laboratório de pesquisa, que tornaram muito mais agradável este período da minha vida. Aos funcionários do laboratório, pela sua disponibilidade em ajudar.

Aos meus amigos, que me deram força para continuar nas horas mais difíceis. Aos meus pais, que suportaram a minha ausência para me verem crescer, e aos meus sogros, que procuraram estar sempre presentes.

Ao Wanderson, meu eterno companheiro, obrigado pelo amor, paciência e dedicação demonstrados nestes anos.

Michele

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract.....	viii
Lista de tabelas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	01
1.1. <i>Maytenus ilicifolia</i> Martius ex Reissek.....	05
1.2. <i>Maytenus ilicifolia</i> – aspectos químicos e farmacológicos.....	10
1.3. Alguns aspectos referentes à adulteração de fitoterápicos à base de <i>Maytenus ilicifolia</i>	15
1.4. <i>Zollernia ilicifolia</i> (Brongniart) Vogel.....	18
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e métodos.....	25
3.1. Materiais utilizados.....	26
3.1.1. Material vegetal.....	26
3.1.2. Equipamentos utilizados.....	26
3.1.3. Solventes e reagentes.....	27
3.2. Procedimentos gerais.....	28
3.2.1. Detecção das substâncias marcadoras de <i>Zollernia ilicifolia</i>	28
3.2.1.1. Material vegetal.....	28
3.2.1.2. Preparação dos extratos.....	28
3.2.1.3. Análise cromatográfica e detecção da substância marcadora.....	28
3.2.2. Fracionamento do extrato de <i>Zollernia ilicifolia</i>	29
3.2.2.1. Extratos vegetais.....	29
3.2.2.2. Preparação dos extratos.....	29
3.2.2.3. Procedimentos de isolamento.....	29
3.2.2.3.1. Fracionamento do extrato I.....	29
a) Partição com solventes.....	29
b) Fracionamento da fração IZI –CH ₂ Cl ₂	30
c) Obtenção de ZI2.....	30
d) Obtenção de ZI3.....	32
3.2.2.3.2. Fracionamento do extrato II.....	32

a) Partição com solventes.....	31
b) Fracionamento da fração IIZI – CH ₂ Cl ₂	32
c) Obtenção de ZI2.....	33
d) Purificação de ZI2.....	33
e) Obtenção de ZI3.....	34
3.3. Monitoramento sazonal.....	37
3.3.1. Material vegetal.....	37
3.3.2. Preparação dos extratos.....	37
3.3.3. Análise cromatográfica.....	37
3.3.4. Análise densitométrica dos extratos de <i>Zollernia ilicifolia</i>	38
3.4. Análise cromatográfica de fitoterápicos à base de <i>Maytenus ilicifolia</i>	38
4. Resultados e discussão.....	39
4.1. Detecção das substâncias marcadoras.....	41
4.2. Fracionamento dos extratos de <i>Zollernia ilicifolia</i>	41
4.3. Elucidação estrutural de ZI2.....	45
4.4. Monitoramento sazonal.....	66
4.4.1. Verificação dos marcadores nos extratos de <i>Zollernia ilicifolia</i>	66
4.4.2. Análise densitométrica dos extratos MS de <i>Zollernia ilicifolia</i>	68
4.4.3. Análise dos marcadores nos extratos de <i>Maytenus ilicifolia</i>	72
4.5. Análise de fitoterápicos à base de <i>Maytenus ilicifolia</i>	73
5. Conclusões.....	78
6. Referências bibliográficas.....	80

RESUMO

Maytenus ilicifolia é popularmente conhecida como espinheira-santa e utilizada no tratamento de problemas gástricos. Devido ao formato espinhoso das folhas, é facilmente confundida com outras duas espécies, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*. Os objetivos deste trabalho foram identificar e caracterizar estruturalmente substâncias de *Zollernia ilicifolia* para aplicação no controle cromatográfico de qualidade de produtos à base de espinheira-santa. Extratos diclorometânicos destas 3 espécies foram comparados cromatograficamente com vistas à identificação de fitomarcadores para *Z. ilicifolia*, sendo identificados três potenciais marcadores: ZI1, ZI2 e ZI3. Através de métodos cromatográficos e espectroscópicos, ZI2 foi isolado e identificado como o triterpeno betulina. Amostras destas 3 espécies foram coletadas mensalmente, de março/2000 a março/2001, e seus extratos diclorometânicos foram monitorados para verificar se os marcadores propostos se encontravam de forma constante ao longo do ano. O monitoramento dos extratos de *Z. ilicifolia* demonstrou que as substâncias ZI1 e ZI2 foram encontradas nos extratos de todos os meses. A análise densitométrica dos extratos desta espécie em software *ScionImage*® demonstrou que o material vegetal dos meses de maio/2000 e janeiro/2001 apresentou maiores concentrações de ZI2 (betulina). O monitoramento dos extratos de *M. ilicifolia* demonstrou que os marcadores propostos anteriormente por outros autores, friedelina e friedelanol, também estavam presentes em todos os extratos. A análise cromatográfica de 10 amostras comerciais à base de espinheira-santa com vistas à detecção dos marcadores de *M. ilicifolia*, *Z. ilicifolia* e *S. bonplandii* demonstrou adulterações nas amostras. Em 5 das 10 amostras foi detectada a presença de *M. ilicifolia*; destas, 1 apresentou *Z. ilicifolia* e outras 2, *S. bonplandii*. Das 5 amostras restantes, 3 apresentaram *S. bonplandii*, 1 apresentou *Z. ilicifolia* e outra, tanto *Z. ilicifolia* como *S. bonplandii*. Estes resultados evidenciam a baixa qualidade dos produtos do mercado, bem como a aplicabilidade da betulina como marcador de *Z. ilicifolia* e dos marcadores propostos para *S. bonplandii* no controle de qualidade dos fitoterápicos à base de espinheira-santa.

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia is known as “espinheira-santa” and used to gastric perturbances. There are two other species, *Zollernia ilicifolia* and *Sorocea bonplandii* that are very similar with *Maytenus ilicifolia*, because the form of the leaves. This work identified and characterized substances of *Zollernia ilicifolia*, to apply on quality control of espinheira-santa products. Dichloromethane extracts were compared by CCD to identify chemical markers in *Zollernia ilicifolia*. There are 3 markers: ZI1, ZI2 and ZI3. The substance ZI2 was isolated and elucidated as a triterpene betulin. Samples of this 3 species were monthly collected, since March/2000 to March/2001, and its dichloromethane extracts were analyzed to check the ZI1, ZI2 and ZI3 presence. The substances ZI1 and ZI2 were detected in all month extracts. The chromatograms were analyzed by densitometric software *Scionimage*©. The May/2000 and January/2001 extracts presented ZI2 in high concentrations. The analysis of *Maytenus ilicifolia* extracts confirmed friedelin and friedelanol presence in all month extracts. In chromatographic analysis of 10 espinheira-santa products were detected adulterant species. In 5 of 10 samples were detected *Maytenus ilicifolia* presence; in this 5 ones, 1 sample presented *Z. ilicifolia* and other 2, *S. bonplandii*. In the other 5 remained samples, 3 presented *S. bonplandii*, 1 presented *Z. ilicifolia* and 1 *Z. ilicifolia* and *S. bonplandii*. This results showed the low quality of espinheira-santa products and the applicability of betulin and *Sorocea bonplandii* markers in quality control of this products.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Substâncias bioativas isoladas de espécies brasileiras de <i>Maytenus</i>	9
TABELA 2. Principais compostos isolados de <i>Maytenus ilicifolia</i> e suas atividades farmacológicas.....	14
TABELA 3. Rendimentos dos precipitados das frações IIA13 – 17.....	43
TABELA 4. Valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C de ZI2 em relação à betulina (ppm), ambos em CDCl_3	55
TABELA 5. Valores de deslocamentos químicos no espectro de RMP de ZI2 em relação à betulina (ppm).....	57
TABELA 6. Comparação dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C entre ZI2 e oleanderol (ppm), ambos em CDCl_3 (75 MHz).....	59
TABELA 7. Relação entre % de rendimento em extrato seco e intensidade de ZI2 na análise densitométrica.....	69
TABELA 8. Análise cromatográfica de fitoterápicos à base de espinheira-santa (<i>Maytenus ilicifolia</i>).....	74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aspecto de folhas e frutos de <i>Maytenus ilicifolia</i>	7
FIGURA 2. Ramo de <i>Maytenus ilicifolia</i> , coletado em outubro/ 2000.....	8
FIGURA 3. Diferenciação macroscópica entre <i>Maytenus ilicifolia</i> , <i>Zollernia ilicifolia</i> e <i>Sorocea bonplandii</i>	18
FIGURA 4. Aspecto do ramo de <i>Zollernia ilicifolia</i> com flores.....	18
FIGURA 5. Aspecto geral da copa de <i>Zollernia ilicifolia</i>	19
FIGURA 6. Ramo de <i>Zollernia ilicifolia</i> , coletado em outubro/2000.....	21
FIGURA 7. Equipamento utilizado para cromatografia líquida a vácuo.....	30
FIGURA 8. Esquema dos procedimentos utilizados no fracionamento do extrato I de <i>Zollernia ilicifolia</i>	35
FIGURA 9. Esquema dos procedimentos utilizados no fracionamento do extrato II de <i>Zollernia ilicifolia</i>	36
FIGURA 10. Estrutura do fragmento correspondente ao pico-base em $m/z = 203$ no espectro de massas de triterpenos, segundo OGUNKOYA (1981).....	46
FIGURA 11. Espectro de massas de alta resolução de ZI2.....	47
FIGURA 12. Espectro de RMN de próton de ZI2, em CDCl_3 (300 MHz).....	48
FIGURA 13. Esqueleto básico dos triterpenos da série dos lupanos.....	49

FIGURA 14. Esqueleto básico dos triterpenos da série dos hopanos.....	49
FIGURA 15. Espectro de RMN de ^{13}C de ZI2 em CDCl_3 (75 MHz).....	50
FIGURA 16. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT) de ZI2 em CDCl_3 (75 MHz).....	51
FIGURA 17. Detalhes ampliados do espectro de RMP de ZI2 em CDCl_3 (300 MHz).....	52
FIGURA 18. Detalhes ampliados da região de campo alto do espectro de RMN de próton de ZI2 em CDCl_3 (300 MHz).....	53
FIGURA 19. Detalhes ampliados da região entre 4,8 e 3,0 ppm espectro de RMN de próton de ZI2 em CDCl_3 (300 MHz).....	54
FIGURA 20. Estruturas propostas para Zi 2, com base nos dados de RMN e EM....	56
FIGURA 21. Estrutura química do oleanderol.....	58
FIGURA 22. Distribuição da betulina das angiospermas.....	64
FIGURA 23. Distribuição da betulina nas angiospermas.....	64
FIGURA 24. Análise cromatográfica comparativa entre <i>Sorocea bonplandii</i> e <i>Zollernia ilicifolia</i>	66
FIGURA 25. Análise cromatográfica comparativa entre <i>Maytenus ilicifolia</i> e <i>Zollernia ilicifolia</i>	67
FIGURA 26. Monitoramento sazonal de <i>Zollernia ilicifolia</i>	68
FIGURA 27. Perfil da “concentração aparente” de ZI2 nos extratos diclorometânicos de <i>Zollernia ilicifolia</i> no período de 03/00 a 03/01.....	69

FIGURA 28. Relação entre rendimento de extrato seco e % de Z12 na análise densitométrica.....	70
FIGURA 29. Monitoramento sazonal de <i>Maytenus ilicifolia</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

- OMS – Organização Mundial da Saúde
- MHz – mega Hertz
- EP – éter de petróleo
- AcOEt – acetato de etila
- MeOH – metanol
- Fração I ZI – fração diclorometânica do extrato I de *Zollernia ilicifolia*
- Fração II ZI – fração diclorometânica do extrato II de *Zollernia ilicifolia*
- EM – espectro de massas
- HPTLC – *High performance thin layer chromatography*
- CLV – cromatografia líquida a vácuo
- CCD – cromatografia em camada delgada
- *m/z* – relação massa/ carga
- RMN – ressonância magnética nuclear
- Extratos MS – extratos referentes ao monitoramento sazonal
- ¹³C – carbono treze
- DEPT – *Distortionless enhancement by polarization transfer*
- SVS – Secretaria de Vigilância Sanitária
- CDCl₃ – clorofórmio deuterado
- n.c. – não consta
- SNC – Sistema nervoso central
- CCDAE – Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
- ppm – partes por milhão

Os vegetais sempre estiveram presentes na vida do homem, fornecendo os mais diversos materiais, como alimentos, vestuário, habitação, utilidades domésticas, produção de meios de transporte e recursos terapêuticos para a cura de suas doenças (SCHENKEL *et al.*, 2001).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, ou seja, as plantas e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos. Com a revolução industrial e o desenvolvimento da química orgânica, esses recursos começaram a ser estudados e estabeleceu-se a tendência da utilização das substâncias ativas isoladas. Esse fato resultou na preferência por medicamentos sintéticos para o tratamento das doenças, devido à facilidade de obtenção e baixo custo destes compostos (RATES, 2001). A descoberta das substâncias ativas das plantas contribuiu rapidamente para o desenvolvimento do arsenal terapêutico atual (SCHENKEL *et al.*, 2001).

Mais recentemente vem ocorrendo um aumento do interesse pelas terapias alternativas e pelo uso de produtos naturais, especialmente derivados de plantas. Este interesse crescente deve-se a diversas razões, como por exemplo: a ineficácia de medicamentos convencionais, em alguns casos; efeitos adversos de fármacos sintéticos; descoberta de novas doenças sem tratamento estabelecido; dificuldade de acesso de grande parte da população à terapia convencional; a crença na inocuidade de produtos naturais e de que estes são menos prejudiciais que fármacos sintéticos e por fim, a idéia de que produtos naturais não causam efeitos adversos (RATES, 2001; CAPASSO *et al.*, 2000).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, não apenas quando usadas diretamente como agente terapêutico, mas também porque muitos de seus compostos se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WHO, 2001). Está estimado que cerca de 25 % de todos os medicamentos modernos provêm direta ou indiretamente de plantas superiores. Dos 252 fármacos considerados essenciais pela OMS, 11 % são originários de plantas, e um número significativo de compostos sintéticos derivam de substâncias naturais (RATES, 2001). Em alguns casos, como os antitumorais e

antimicrobianos, cerca de 60 % dos medicamentos comercializados e em estudo derivam de produtos naturais (CALIXTO, 2000).

É impressionante o fato destes produtos encontrados na natureza revelarem uma imensa gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas; apesar do aumento de estudos nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17 % das espécies vegetais existentes foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (NODARI & GUERRA, 2001).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo. Sua flora corresponde a cerca de 20 % de todas as espécies conhecidas no mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Apesar disso, apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Destas, 590 foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (CALIXTO, 2000; NODARI & GUERRA, 2001).

O mercado mundial de fitoterápicos é estimado em US\$ 12,4 bilhões, sendo o consumo da Europa responsável por aproximadamente 50 % deste mercado; os produtos naturais e preparações fitoterápicas são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80 % nos países em desenvolvimento (CRAGG *et al.*, 1997). Em 1999, o mercado farmacêutico brasileiro detinha 9 bilhões de dólares, correspondendo ao décimo maior consumidor do mundo. Cerca de 30 % dos medicamentos comercializados são classificados como fitofarmacêuticos, o que representa 20 – 25 % do mercado (PETROVICK *et al.*, 1999).

A Organização Mundial da Saúde publicou uma série de resoluções sobre a ampliação do projeto “Estratégia de Atenção Primária à Saúde (APS)”, cuja base fundamental é a utilização de recursos terapêuticos desenvolvidos pela própria comunidade. Dentro destes recursos estão incluídos as plantas medicinais. Segundo a OMS, o ideal é que existam políticas nacionais que estimulem a complementação, articulação e integração das práticas médicas oficiais e tradicionais, bem como uma base legal vigente que promova o uso da fitoterapia e estimule a industrialização e

padronização de fitofármacos (PERU, 1994). De acordo com a OMS, devido à pobreza e falta de acesso à medicina convencional, cerca de 65 – 80 % da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende das plantas medicinais como primeira atenção à saúde (CALIXTO, 2000).

A OMS tem publicado guias para definir critérios básicos para avaliação da qualidade, segurança e eficácia de drogas vegetais (WHO, 1998), entretanto, poucos programas têm sido criados para determinar a segurança e eficácia de drogas vegetais, como proposto. Problemas surgem como a falta de identificação das espécies, falta de padronização, problemas nas práticas de fabricação, contaminação, substituição e adulteração de espécies, preparação e dosagem incorreta e muitos outros (CALIXTO, 2000).

No Brasil, em 1994, o Ministério da Saúde criou uma comissão para avaliar a situação dos fitoterápicos no Brasil, o GEPFITO (Grupo de Estudos de Produtos Fitoterápicos). A comissão propôs uma norma diretiva baseada principalmente na legislação alemã e francesa e nos guias da OMS para fitoterápicos. Em 1995, a “Portaria SVS n.º 6”, de 31.01.95, estabeleceu os requisitos legais para o registro de produtos fitoterápicos. Porém, devido à resistência de algumas indústrias farmacêuticas, a lei não teve força de mudança (CALIXTO, 2000). A dificuldade de aplicação da Portaria SVS n.º 6 demonstrou a necessidade de aprimoramento de alguns de seus itens, o que resultou na publicação da “ Resolução RDC n.º 17 ”, em 24.02.2000. As principais mudanças deram-se a respeito da classificação dos medicamentos fitoterápicos em quatro tipos diferentes, de acordo com as informações científicas apresentadas, data de registro e inserção no mercado devido ao conhecimento etnofarmacológico. No entanto, o quadro brasileiro afasta-se dos termos colocados pela OMS, pois as indústrias farmacêuticas que atuam neste mercado geralmente produzem há décadas fitoterápicos com pouca inovação tecnológica, com preços equivalentes aos medicamentos de síntese, ampliação muitas vezes irracional das aplicações terapêuticas e indicações bem diferentes das preconizadas tradicionalmente (MARQUES & PETROVICK, 2001).

Embora as plantas medicinais, preparações fitofarmacêuticas e produtos naturais isolados participem de maneira significativa do arsenal terapêutico, a

indústria de fitofármacos na América Latina não é bem desenvolvida, e em geral seus produtos têm qualidade questionável. As causas para isso encontram-se na falta de tecnologia apropriada, na dificuldade de obtenção de matéria-prima com qualidade desejada, desconhecimento ou inexistência de métodos de controle de qualidade, falta de pesquisa e desenvolvimento em tecnologia farmacêutica, validação e uso terapêutico. Os problemas maiores dizem respeito à padronização do controle de qualidade (SHARAPIN, 1996).

É necessário que se criem processos regulatórios e códigos oficiais, como as farmacopéias, aumentando o número de monografias de espécies, a exemplo da Comissão E, na Alemanha. Poucas plantas medicinais oriundas da América Latina possuem monografias farmacopéicas, a exemplo de *Maytenus ilicifolia*; assim, faltam critérios estabelecidos para determinar a autenticidade, pureza e qualidade de matérias-primas. A farmacopéia brasileira, por exemplo, reduziu drasticamente o número de monografias vegetais ao longo de suas quatro edições. A primeira (1929) continha 300 monografias de plantas medicinais; entretanto a segunda (1959), apenas 96. Já a terceira edição (1977) diminuiu para 26 e a quarta, publicada em 1997, contém apenas 10 monografias (RATES, 2001).

A qualidade de fitoterápicos somente será melhorada após a adoção de medidas a médio e longo prazo, como por exemplo, a formação de pessoal qualificado. Porém, para que novas medidas e normas sejam criadas é necessário o convênio entre governo, universidades e indústrias farmacêuticas. Um obstáculo é a falta de instituições de pesquisa e centros qualificados para a realização de triagens clínicas e estudos químicos, botânicos, agrônômicos, farmacológicos e toxicológicos. Como resultado da falta de pesquisa obtêm-se produtos que não contêm o mínimo de padrões de qualidade, como recomenda a OMS (PETROVICK *et al.*, 1999).

1.1. *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek

O gênero *Maytenus* possui cerca de 100 espécies, sendo que pelo menos 21 destas foram estudadas quimicamente (FURLAN, 1985) e 10 foram coletadas no Brasil (FRANÇA & PEREIRA, 1997) (tabela 1).

Maytenus ilicifolia Martius ex Reissek, da família Celastraceae (figuras 1 e 2) é conhecida popularmente como espinheira-santa, cancerosa (SIMÕES *et al.*, 1986; CARLINI & BRAZ, 1988; SILVA *et al.*, 1991; GUPTA, 1996) espinheira-divina (CARLINI & BRAZ, 1988; SILVA *et al.*, 1991; ALICE *et al.*, 1995) cancerosa, sombra-de-touro (SIMÕES *et al.*, 1986; CARLINI & BRAZ, 1988; ALICE *et al.*, 1995;) espinho-de-Deus, salva-vidas (GUPTA, 1996) coromilho-do-campo (CARLINI & BRAZ, 1988; SILVA *et al.*, 1991), sendo conhecida por cangorosa e cancerosa no Paraguai (GUPTA, 1996), cangorosa e quebrachillo na Argentina e Uruguai e mayten no Chile (SILVA *et al.*, 1991).

Maytenus ilicifolia é uma espécie originária da América do Sul (SIMÕES *et al.*, 1986), podendo ser encontrada na região Sul do Brasil, em áreas de sub-bosque das florestas de Araucária ou às margens de rios (CARVALHO-OKANO, 1992 apud FRANÇA & PEREIRA, 1997), sendo encontrada em lugares com pouca insolação e brejos úmidos (SILVA *et al.*, 1991), ocorrendo também nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, porém pouco abundante (CARVALHO-OKANO, 1992 apud FRANÇA e PEREIRA, 1997). *Maytenus ilicifolia* é encontrada também na Bolívia, Paraguai, Uruguai e Norte da Argentina (ALICE *et al.*, 1995; GUPTA, 1996).

É uma espécie bem definida do ponto de vista botânico, apresentando-se em forma de arbusto de até 5 metros de altura, em geral de pequeno porte, perenifólio, dióico. Ramos glabros, os mais jovens levemente angulosos. Folhas simples, alternadas, curto-pecioladas, coriáceas, glabras, ovalo-oblongas ou elípticas, de 2-15 cm de comprimento e até 7 cm de largura (em regra 1- 5 cm), ápice agudo a mucronado, base obtusa a cuneada, cada bordo com dois a sete (ou mais) dentes agudos; nervuras bem visíveis. Inflorescência tipo fascíolo, flores pequenas, amarelo-esverdeadas, pentâmeras, diclamídeas, unissexuais, actinomorfas, reunidas em fascículos axilares curto-peciolados, com brácteas escariosas, fimbriadas, avermelhadas. Cálice com sépalas suborbiculares, avermelhadas, ciliadas na margem. Corola amarela, dialipétala, pétalas elípticas ou ovadas, maiores que as sépalas.



Figura 1. Aspecto de folhas e frutos de *Maytenus ilicifolia*

Flores masculinas com cinco estames alternos às pétalas, com até 0,2 cm de comprimento, anteras cordiformes; disco presente, cobrindo o gineceu rudimentar. Flores femininas com estames reduzidos, de até 0,1 cm de comprimento, alternos às pétalas, estéreis; disco presente, pentalobado, com gineceu súpero, ovóide, bilocular, lóculos em geral uniovulados; estilete curto. Fruto cápsula bivalva, avermelhada, de até 1,1 cm de comprimento (ALICE *et al.*, 1995).

Registros sobre o uso popular de *Maytenus ilicifolia* existem há vários anos na literatura. Em 1930, SILVA ARAÚJO e LUCAS citavam esta espécie para “o tratamento de males gástricos e intestinais, como antiácida e antiulcerogênica” (CARLINI & BRAZ, 1988). A espinheira-santa é usada como adstringente estomacal, no tratamento de úlceras e fermentações gastrointestinais (HOEHNE, 1939; PEREIRA & CAMPOS, 1960 apud FRANÇA & PEREIRA, 1997). No Sul do Brasil, folhas moídas de *Maytenus ilicifolia* são adicionadas ao chimarrão em 10 a 15 %, para combater a azia e dores estomacais (BERNARDI & WASICKY, 1959 apud FRANÇA & PEREIRA, 1997). Esta espécie é utilizada também como antiasmática, no alívio da ressaca alcoólica (SIMÕES *et al.*, 1986; ALICE *et al.*, 1995; GUPTA, 1996), como diurética, laxativa (SILVA *et al.*, 1991; SANTOS *et al.*, 1988; ALICE *et al.*, 1995) e antipirética e analgésica (ALICE *et al.*, 1995). O córtex da raiz é utilizado como antitumoral (SIMÕES *et al.*, 1986; GUPTA, 1996). Externamente é utilizada como antisséptica e cicatrizante de feridas e úlceras (SIMÕES *et al.*, 1986; GUPTA, 1996). Mulheres paraguaias da área rural e indígena utilizam a infusão ou decocção

por seu efeito contraceptivo, para induzir a menstruação em doses de aproximadamente 9 g/ dia (AHMED, 1981; SIMÕES *et al.*, 1986; GUPTA, 1996). Mulheres do Norte da Argentina utilizam a infusão ou decocção das folhas para induzir aborto (MONTANARI *et al.*, 1998).



Figura 2. Ramo de *Maytenus ilicifolia*, coletado em outubro/ 2000.

Tabela 1. Substâncias bioativas isoladas de espécies brasileiras de *Maytenus*.

Espécies	Substâncias ativas	Atividade biológica
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Maitansina (ansamacrolídeo) Cangoroninas A – J Ilicifolina (triterpenos friedelano) Friedelina e friedelan-3-ol	Antitumoral Citotóxica Citotóxica Antiúlcera gástrica (Vilegas <i>et al.</i> , 1994; Queiroga <i>et al.</i> , 2000)
	4 – o - metilepigalocatequina	Antiúlcera gástrica
	Triterpenos quinóides (aromáticos) Flavonóides	Citotóxica
<i>Maytenus aquifolium</i>	Friedelina e friedelan-3-ol (triterpenos tipo friedelano)	Antiúlcera gástrica (Vilegas <i>et al.</i> , 1994; Queiroga <i>et al.</i> , 2000)
	Maitenina; 22 β -hidroximaitenina (triterpeno quinona-metídeo) Alcalóides sesquiterpênicos (tipo evonimato)	n.c. Inibição do crescimento de leveduras
<i>Maytenus ovata</i>	Maitansina (ansamacrolídeo)	Antitumoral
<i>Maytenus horrida</i>	Triterpenos quinona-metídeos 1 β -3 β -11 α - trihidroxiolean-12-eno Horridina (alcalóide tipo isoeuoniminol)	Antimicrobiana n.c. n.c.
	Eumaitenina; eumaitenol; acetileumaitenol (sesquiterpenos tipo eudesmano)	Mutagênica
<i>Maytenus quianensis</i>	Maiteína (alcalóide sesquiterpênico) triterpenos (tipo friedelano)	n.c.
<i>Maytenus rigida</i>	Alcalóides Catequinas; proantocianidinas	Repelente de insetos n.c.
	Tingenona; 20-OH-tingenona (triterpeno quinona-metídeo) rigidenol (triterpeno tipo lupano)	n.c. n.c.
	Friedelina e friedelan-3-ol	Antiúlcera gástrica gástrica (Vilegas <i>et al.</i> , 1994; Queiroga <i>et al.</i> , 2000)
<i>Maytenus floribunda</i>	4-O-metilepigalocatequina (taninos) e triterpenos	n.c.
	Rigidenol, 11-hidroxi- 3- oxo – 20(29)-lupeno (triterpeno) Maitenina; pristimerina (triterpenos quinona-metídeos) catequinas (taninos)	n.c. n.c. n.c.

n.c. = não conhecida

Fonte: Adaptado de FRANÇA & PEREIRA, 1997.

1.2. *Maytenus ilicifolia* – Aspectos químicos e farmacológicos

Há muito tempo existem relatos sobre o uso popular e indicações atribuídos à espécie *Maytenus ilicifolia*. Alguns estudos foram realizados sobre a atividade farmacológica desta espécie, principalmente no que diz respeito à atividade antitumoral de seus componentes químicos (VARGAS *et al.*, 1991), porém, foi a partir do “Programa Brasileiro de Plantas Medicinais” criado em 1983 pela CEME (Central de Medicamentos), que surgiram os primeiros resultados concretos sobre a atividade farmacológica e toxicidade de *Maytenus ilicifolia*. Naquela ocasião, foram estudados a potencial atividade antiúlcera (a principal citada na medicina popular), toxicidade da espécie, efeitos adversos e realizados também estudos clínicos de fase I.

Estudos sobre o efeito antiúlcera induzida por aspirina, indometacina, reserpina e estresse sob baixa temperatura em camundongos mostraram que o abafado de folhas de *Maytenus ilicifolia* (forma popularmente utilizada) e seu liofilizado tiveram atividade bastante promissora tanto por via oral como via intraperitoneal, comparável ao efeito da cimetidina (50 a 100 mg/Kg), o controle positivo utilizado no experimento (CARLINI & BRAZ, 1988). Da mesma forma, para estes extratos, foram relatadas ações inibitórias sobre a secreção e acidez gástrica (MACAUBAS *et al.*, 1988). O extrato metanólico de *Maytenus ilicifolia* também antagonizou o efeito ulcerativo causado pelo etanol em camundongos (NAKAMURA *et al.*, 1996).

Os estudos sobre a toxicidade de *Maytenus ilicifolia* em camundongos demonstraram que a administração de doses 400 vezes maiores que as utilizadas por humanos (2.720 mg/Kg) são desprovidas de toxicidade, não alterando parâmetros como atividade motora e tempo de sono induzido por barbitúricos, diferentemente da cimetidina e ranitidina, que têm certo grau depressor sobre o SNC. Os abafados e liofilizados de *Maytenus ilicifolia* também não apresentaram efeitos analgésico, anticonvulsivante e não foram capazes de alterar a estereotipia causada pela apomorfina. Adicionalmente, a administração de doses extremamente elevadas (5,4 a 10,8 g/Kg) não provocou efeito letal nem após sete dias de observação (OLIVEIRA & CARLINI, 1988).

O abafado de *M. ilicifolia*, administrado em camundongos em doses até 360 vezes maiores que a utilizada pelo homem, durante dois a três meses, não produziu alterações no peso, comportamento, temperatura e parâmetros bioquímicos e hematológicos. O abafado e o liofilizado de folhas de *Maytenus ilicifolia* também demonstraram ser desprovidos de ação teratogênica e não prejudicaram o ciclo reprodutivo de ratas fêmeas (OLIVEIRA & CARLINI, 1988).

Também foram realizados estudos toxicológicos em humanos, onde sete voluntários sadios ingeriram durante catorze dias o abafado de espinheira-santa, em dosagem correspondente ao dobro da utilizada na medicina popular, não sendo verificados efeitos tóxicos para o ser humano nas condições testadas (CARLINI & FROCHTENGARTEN, 1988). Porém, existem relatos de que o uso prolongado pode causar redução da produção de leite materno em mulheres que amamentam (SANTOS *et al.*, 1992).

No estudo clínico com o abafado e liofilizado de espinheira-santa realizado por GEOCZE e colaboradores (1988), pacientes diagnosticados como portadores de dispepsia alta não-ulcerosa receberam, durante vinte e oito dias, duas cápsulas contendo 200 mg de abafado liofilizado de espinheira-santa (treze pacientes) ou placebo (onze pacientes). O grupo que recebeu o extrato de espinheira-santa apresentou melhora significativa em relação ao grupo placebo, no que diz respeito à sintomatologia dispéptica global e a sintomas de azia e dor em particular.

Estudos realizados com camundongos demonstraram que os extratos aquosos de espinheira-santa além de reduzirem lesões na mucosa gástrica, apresentaram atividade anti-secretora de ácido (PAZ *et al.*, 1992).

Vários esforços têm sido feitos para elucidar o mecanismo de ação de extratos de *M. ilicifolia*. Estudos com extrato aquoso liofilizado de *M. ilicifolia* em rãs (*Rana catesbeiana*) mostraram que a inibição da secreção de ácido por parte da mucosa envolve mecanismos relacionados à histamina. Na concentração de 7 mg%, o extrato bruto aquoso mostrou atividade semelhante à da cimetidina (FERREIRA *et al.*, 1996). Extratos aquosos de espinheira-santa possuem compostos efetivos

também na prevenção da formação de novas lesões gástricas crônicas da mucosa (DALLA TORRE *et al.*, 1998).

Estudos realizados por BOSSOLANI e colaboradores (2000) demonstram que extratos aquosos de *M. ilicifolia* reduzem o volume de secreção gástrica em 39 a 46% em relação ao controle, e indicam que o mecanismo anti-secretor de ácido está relacionado à inibição da bomba de próton H^+/K^+ - ATPase nas células da mucosa gástrica.

Os componentes químicos responsáveis pela ação antiulcerogênica têm sido motivo de grande discussão entre os pesquisadores. CARLINI e BRAZ (1988), quando realizaram seus experimentos, não puderam afirmar qual classe de compostos seria a responsável por esta ação, mas havia grande indicativo que se tratasse de taninos. Existem relatos na literatura afirmando que os taninos condensados possuem ação antiúlcera na mucosa gástrica pelo princípio da tanagem (ESAKI *et al.*, 1985). Alguns estudos propuseram que os triterpenos friedelan-3-ol e friedelina, substâncias majoritárias de *M. ilicifolia*, seriam os reponsáveis pela ação antiúlcera (PEREIRA, 1962; VILEGAS *et al.*, 1994; NAKAMURA *et al.*, 1996; QUEIROGA *et al.*, 1998; COUTO *et al.*, 1999). Outros trabalhos, porém, afirmam que os triterpenos majoritários de *Maytenus ilicifolia*, juntos ou isoladamente, não apresentam qualquer atividade sobre ulceração provocada por indometacina em ratos (QUEIROGA *et al.*, 2000). É possível, assim, que se tratem de diferentes ações provocadas por grupos diferentes de compostos, o que resultaria num efeito sinérgico dos constituintes químicos da espécie.

Estudos *in vitro* demonstram que *M. ilicifolia* é capaz de inibir o processo de lipoperoxidação causado por espécies reativas de ácido tiobarbitúrico em homogenato de cérebro de ratos. A uma concentração de 10 mg extrato/mL meio, *M. ilicifolia* exerce um importante efeito antioxidante que sugere uma ação de defesa a nível celular (MATTEI & CARLINI, 1998).

Em relação ao seu uso popular como contraceptivo, foram testados extratos etanólicos por via intraperitoneal (200 mg/Kg/dia) e via oral (800 mg/Kg/dia), durante trinta dias em ratos machos com relação ao seu efeito sobre a espermatogênese. As

alterações incluíram células imaturas, morte de células germinativas e túbulos seminíferos pouco vacuolizados. Porém, os autores consideram que *M. ilicifolia* não possui atividade suficiente para impedir a espermatogênese (MONTANARI *et al.*, 1998).

O extrato alcoólico de espinheira-santa foi submetido a partição com clorofórmio e água, obtendo-se três extratos que foram testados quanto à sua atividade analgésica e antiinflamatória, utilizando o método da formalina e ácido acético em camundongos; estes extratos apresentaram atividade analgésica e antiinflamatória (NAKAMURA *et al.*, 1997).

Da espécie *Maytenus ilicifolia* foram isoladas diferentes substâncias, com variadas ações farmacológicas (tabela 2). Uma característica das espécies do gênero *Maytenus* são os compostos chamados maitansinóides ou ansamacrolídeos, como a maitensina, maitenprina e maitenbutina, que foram isolados de diversas partes da planta, como folhas, caule e raízes (AHMED *et al.*, 1981). Desta espécie foram isolados triterpenos em grande quantidade e com esqueletos variados. Foram isolados também ácido clorogênico, β -amirina (SIMÕES *et al.*, 1986) e cafeína, porém há controvérsia sobre a existência desta última na planta (BERNARDI & WASISCKY, 1963). Em extratos hexânicos encontraram-se α -tocoferol, os esteróides simiarenol, estigmasterol, campesterol, ergosterol e brassicasterol (VILEGAS *et al.*, 1994). Encontraram-se em *Maytenus ilicifolia* os oligo-elementos iodo, enxofre, fósforo, sódio, cálcio, magnésio e titânio, dulcitol e outros açúcares, cera, mucilagem e uma resina levemente aromática. Em extratos aquosos de talos, ramos, folhas e raízes foram identificados aminoácidos, fenóis, taninos, fitoesteróides insolúveis, leucoantocianidinas e saponinas (MARTINS, 1998).

Tabela 2. Principais compostos isolados de *Maytenus ilicifolia* e suas atividades farmacológicas.

Compostos isolados	Atividade farmacológica
Ansa-macrolídeos: maitansinóides – maitensina, maitenprina e maitenbutina (folhas, caule e raízes) (AHMED <i>et al.</i> , 1981; NETTLETON <i>et al.</i> , 1981; SIMÕES <i>et al.</i> , 1986;)	Antitumoral <i>in vitro</i> para células P-388 e L- 1210, antimitótica (REMILLARD <i>et al.</i> , 1975)
Friedelina e friedelan-3-ol (VILEGAS <i>et al.</i> , 1994)	Antiúlcera gástrica (fração hexânica) (PEREIRA <i>et al.</i> , 1993), porém há controvérsias sobre seu efeito (QUEIROGA, 2000).
Dímeros triterpênicos: cangorosina A, atropocangorosina A, dihidro-atropocangorosina A e cangorosina B (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1990; SHIROTA <i>et al.</i> , 1997).	Citotóxica para células P-388 (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1990).
Triterpenos: cangorinina, ilicifolina, ácido maitenóico, pristimerina, ácido salasperímico, isopristimerina III e isotingenona III (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1991)	Citotóxica para células V- 79, KB e P-388 (fração metanólica) (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1991)
Triterpenos quinóides (aromáticos): 6-oxotingenol, 6-oxopristimerol, 3-metil-6-oxotingenol, 3-metil-22 β -23-diol-6-oxotingenol e 22 β -hidroxitingenona (SHIROTA <i>et al.</i> , 1994)	Citotóxica moderada em células L – 1210, P- 388 e KB (SHIROTA <i>et al.</i> , 1994) e antimicrobiana (SIMÕES <i>et al.</i> , 1986)
Poliésteres sesquiterpênicos oligonicotinados: cangorinas A, B, C, D, E, F, G, H, I, J (raízes) (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1993; ITOKAWA <i>et al.</i> , 1994)	Antitumoral (UJITA <i>et al.</i> , 1992 apud MARTINS, 1998; ITOKAWA <i>et al.</i> , 1994)
Alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1994)	Atividade <i>antifeedant</i> e imunossupressiva (ITOKAWA <i>et al.</i> , 1994)

Taninos condensados (MANDICH <i>et al.</i> , 1984)	Antiúlcera gástrica (CARLINI e BRAZ, 1988), antimutagênica para o teste de AMES (fração taninos) (VARGAS <i>et al.</i> , 1991).
Flavonóides: quercetina-3- O-glicosídeo (NAKAMURA <i>et al.</i> , 1997)	Antiinflamatória (NAKAMURA <i>et al.</i> , 1997).
Flavonóides do grupo das chalconas e auronas (MANDICH <i>et al.</i> , 1984)	
Glicosídeos: Ilicifolinosídeos A, B e C (ZHU <i>et al.</i> , 1998)	
Óleos fixos (sementes): α -mono-acetotriacilgliceróis) (SPITZER e AICHHOLZ, 1996)	

1.3. Alguns aspectos referentes à adulteração de fitoterápicos à base de *Maytenus ilicifolia*

Após a publicação dos excelentes resultados obtidos com *Maytenus ilicifolia* nos trabalhos de CARLINI e colaboradores (1988), esta espécie tornou-se ainda mais utilizada na medicina popular. Naquela ocasião, CARLINI e BRAZ (1988) relataram ter conhecimento de aproximadamente 3 produtos à base de espinheira-santa, fabricados por 3 laboratórios diferentes. Atualmente, existem uma diversidade de preparações à base de *Maytenus ilicifolia*, em várias formas farmacêuticas, incluindo sachês para infusão, tinturas, cápsulas com a planta moída e com extrato seco.

Toda esta demanda tem resultado em uma exploração indiscriminada, baseada apenas no extrativismo, o que tem feito com que esta espécie seja cada vez mais rara em seus ambientes naturais. A ausência de manejo e cultivo podem promover a extinção da espécie, o que tem levado vários pesquisadores a desenvolverem pesquisas visando a domesticação e propagação, polinização

artificial e outras alternativas para que possa ser suprida a demanda do mercado (NEGRELLE e DONI, 1998; RACHWAL *et al.*, 1998; SCHEFFER & ARAUJO, 1998).

Além do risco da extinção da espécie, a falta da demanda traz outros problemas, como por exemplo, a adulteração com outras espécies morfológicamente semelhantes à espinheira-santa. Reissek, em 1861, já relatava a difícil diferenciação entre as espécies de *Maytenus*, o que pode levar a uma confusão na identificação das matérias-primas vegetais (CARLINI & BRAZ, 1988).

Outras espécies do gênero *Maytenus*, como *Maytenus aquifolium* Martius e *Maytenus robusta* Reiss, têm sido estudadas do ponto de vista químico e farmacológico, com vistas à validação de seu uso. Da espécie *Maytenus aquifolium* já foram isolados friedelina, friedelano, friedelanol, simiarenol, lupeol, lupenona, α -tocoferol, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, ergosterol e flavonóides, como a quercetina (VILEGAS *et al.*, 1994). De *Maytenus floribunda* Reiss foram isolados β -sitosterol e seu glicosídeo, poliálcoois, friedelina, friedelanol, friedelano, além dos flavonóides proantocianidina e epigallocatequina (MELÉNDEZ SALAZAR *et al.*, 1999). Estudos foram desenvolvidos com *Maytenus ilicifolia*, em comparação a *Maytenus aquifolium*, demonstrando a variabilidade de substâncias como taninos, fenóis totais e triterpenos (PEREIRA *et al.*, 1998); estudos também foram realizados comparando *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus robusta*, demonstrando que estas possuem perfil cromatográfico semelhante, sendo que *Maytenus robusta* apresentou uma quantidade 3 vezes maior de friedelina; sugeriu-se que esta espécie possa ser intercambiável com *Maytenus ilicifolia* (NIERO *et al.*, 2001).

Além de outras espécies de *Maytenus* serem confundidas com a verdadeira espinheira-santa, existem espécies de outras famílias, que por apresentarem as bordas espinhosas, também são usadas popularmente e mesmo comercializadas como *Maytenus ilicifolia*. Dois exemplos comuns são *Zollernia ilicifolia* (Brongniart) Vogel (Fabaceae) (DI STASI *et al.*, 1999) e *Sorocea bonplandii* (Baillon) Burger, Lanjouw & Boer (Moraceae) (VILEGAS *et al.*, 1994; PAGLIARINI, 1995; FREIRE, 1996) (Figura 3).

Muitos estudos foram realizados com vistas ao controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*. VILEGAS e colaboradores (1994) propuseram a utilização dos triterpenos majoritários friedelina e friedelan-3-ol como marcadores químicos no controle de qualidade de amostras de espinheira-santa. Alguns anos mais tarde, estudos confirmavam através da cromatografia gasosa a validação destes compostos no controle de amostras comerciais (VILEGAS & LANÇAS, 1997). A aplicabilidade de friedelina e friedelan-3-ol como marcadores de *Maytenus ilicifolia* também foi confirmada na análise por CCD de amostras comerciais (FALKENBERG & SOUZA, 1998). Metodologias foram desenvolvidas para a diferenciação de *Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*, como por exemplo através de CCDAE (cromatografia em camada delgada de alta eficiência), onde foram detectados marcadores para *S. bonplandii* (VILEGAS *et al.*, 1998a) e cromatografia gasosa, onde foram caracterizados os perfis cromatográficos de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e *S. bonplandii*, para posterior aplicação como padrões (VILEGAS *et al.*, 1994). A diferenciação entre *Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* também foi realizada através da CCD, pela detecção de 3 marcadores cromatográficos para *S. bonplandii* (ALBERTON *et al.*, 2000a). Estes marcadores foram usados posteriormente como padrões na análise de amostras comerciais à base de espinheira-santa, confirmando a sua utilidade no controle de qualidade destes fitoterápicos (ALBERTON *et al.*, 2000b).

Apesar das semelhanças macroscópicas (figura 3), a anatomia microscópica de *Zollernia ilicifolia* e *Maytenus ilicifolia* é bastante diferente. Estudos desenvolvidos com pó e fragmentos destas espécies mostraram diferenças relevantes, como no formato das paredes periclinais e células-guarda dos estômatos (ALBERTON *et al.*, 1999).

Estudos farmacológicos realizados em camundongos com extratos hidrometanólicos de *Maytenus aquifolium*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* demonstraram atividade analgésica para os três extratos em modelos de contorções abdominais produzidas por ácido acético e imersão da cauda em água aquecida a 50 ° C (Di STASI *et al.*, 1999). Estudos envolvendo estas três espécies demonstraram sua atividade antiulcerogênica em modelos de úlcera gástrica induzida por etanol e indometacina em camundongos (GONZALEZ *et al.*, 2001).

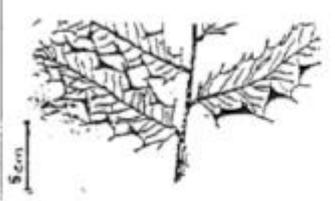
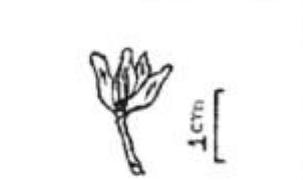
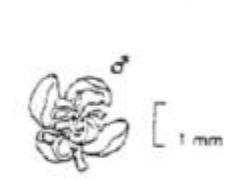
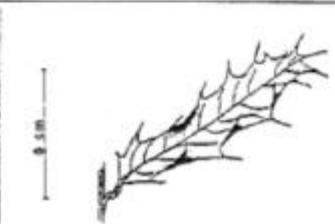
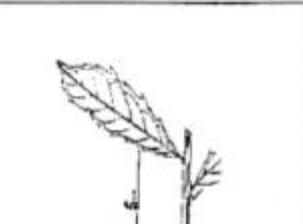
	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.	<i>Zollernia ilicifolia</i> (Brongn.) Vogel	<i>Sorocea bonplandii</i> (Baill.) Burger, Lauj. & Bper
Látex	ausente	ausente	presente
Estipulas	 ausente	 axilar	 terminal
Flores	 hermafroditas	 hermafroditas	 unissexuais
Nervura da folha			

Figura 3. Diferenciação macroscópica entre *Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*. Fonte: FREIRE, 1996.

2. *Zollernia ilicifolia* (Brongniart) Vogel

Zollernia ilicifolia (Brongniart) Vogel (figuras 4, 5 e 6) é uma espécie da família Fabaceae, (Leguminosae).



Figura 4. Aspecto do ramo de *Zollernia ilicifolia* com flores.

Esta é a segunda maior família das dicotiledôneas, porém, economicamente é mais importante que a maior família, Compositae. As leguminosas produzem alimento, madeira, resinas, taninos, corantes, substâncias inseticidas e moluscicidas, além de uma infinidade de fitofármacos. A família tem uma distribuição cosmopolita, sendo abundante em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, em ambos hemisférios e se divide em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Papilinoideae). A subfamília Faboideae divide-se em diversas tribos, como Phaseoleae, Vicieae, Cicereae e Swartzieae (HEGNAUER & GRAYER-BARKMEIJER, 1993), a esta última pertence a espécie *Zollernia ilicifolia* (MANSANO & TOZZI, 1999).



Figura 5. Aspecto geral da copa de *Zollernia ilicifolia*.

A família das leguminosas é particularmente rica em flavonóides e compostos relacionados; cerca de 28 % de todos os flavonóides e 95 % de todas agliconas isoflavonoídicas conhecidas foram relatadas nesta família. A maior característica destes compostos nas leguminosas é a freqüente ausência de hidroxila na posição 5. Muitos flavonóides e isoflavonóides são encontrados em caules, raízes e sementes, e têm a presença de grupos isoprenila. Alguns glicosídeos flavonoídicos de leguminosas têm estruturas incomuns, como por exemplo as chalconas C-glicosídeos e isoflavonas C-glicosídeos, que não foram encontrados em nenhuma

outra família. Os flavonóides e as fitoalexinas (isoflavonóides) presentes nas folhas são comumente utilizados na classificação das leguminosas, como por exemplo as chalconas e flavanonas (SMITH & BANKS, 1986; HEGNAUER & GRAYER-BARKMEIJER, 1993).

Zollernia ilicifolia (Brongniart) Vogel (sin. *Coquebertia ilicifolia* Brongn. e *Zollernia houlettiana* Vog.) é uma árvore de até 5 m de altura, com folhas simples coriáceas, oblongas, oval-oblongadas, ovais ou obovais, obtusas-acuminadas ou agudas, nas margens um tanto onduladas e providas de dentes que terminam em espinho, raro inteiras, de 8 – 14 cm de comprimento e 3 – 5 cm de largura, na base arredondadas ou levemente atenuadas, brilhantes e glabras; estípulas espessas, geralmente oblongo-lineares de 1 – 1,5 cm de comprimento ou também agregados em curta panícula terminal; brácteas pequenas e caducas; inflorescência axial ou terminal em racemos ou fasciculada em racemos, com até 13 cm de comprimento, flores róseas de até 1 cm de comprimento, com pedicelo de até 2 cm de comprimento, 5 pétalas livres, oblongas, duas envolvendo os estames e o gineceu, 10 estames alternando entre si dois tamanhos diferentes, anteras falciformes de 4,3-4,8 mm, ovário súpero, cálice inteiro, aberto de um lado ou irregularmente fendido, de cor esverdeada de comprimento, fruto legume. Habita matas do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Santa Catarina, fornece madeira para carpintaria (PIO-CORRÊA, 1926-1978; FREIRE, 1996; MANSANO & TOZZI, 1999).

Esta espécie é conhecida popularmente como laranjeira-do-mato, moçataíba, mussutaíba, orelha-de-onça (PIO-CORRÊA, 1926-1978) espinheira-divina e espinheira-santa. É usada na medicina popular para o tratamento de distúrbios do estômago e úlcera nervosa, como adulterante da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) e para os rins (FREIRE, 1996).

Zollernia ilicifolia também é pouco estudada farmacologicamente. Ensaios farmacológicos com vistas à determinação de sua atividade antiinflamatória, utilizando extrato hidrometanólico 70% em camundongos, em modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e imersão em água aquecida demonstraram que este extrato é ativo em ambos os modelos utilizados (DI STASI *et al.*, 1999). Estudos realizados com o extrato alcoólico demonstraram que *Zollernia*



Figura 6. Ramo de *Zollernia ilicifolia*, coletado em outubro/2000.

ilicifolia é capaz de alterar a formação de proteínas gastrointestinais de larvas do mosquito transmissor da dengue e febre amarela, *Aedes aegypti*, acarretando retardamento no desenvolvimento das larvas e ação mutagênica (GUSMÃO *et al.*, 1999).

Estudos fitoquímicos preliminares com extratos etanólico, clorofórmico e hexânico demonstraram que *Zollernia ilicifolia* apresenta taninos, flavonóides (flavonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis), triterpenos, saponinas, esteróides, alcalóides, bases quaternárias, cumarinas, xantonas, ácidos fixos e heterosídeos cianogênicos (DI STASI *et al.*, 1999; GONZALES *et al.*, 2001). Porém, ainda não existem relatos na literatura sobre compostos isolados desta espécie, apenas de outra espécie do gênero, *Zollernia paraensis*. Dos caules desta espécie foram isolados flavonóides e isoflavonóides, derivados de flavanonas, isoflavanonas e chalconas; a esta última foram atribuídas propriedades antifúngicas contra *Cladisporium cucumerinum* (FERRARI *et al.*, 1983; FERRARI *et al.*, 1984a). Desta espécie também foram isoladas substâncias aromáticas não encontradas comumente em vegetais, porém obtidas da degradação das ligninas (FERRARI *et al.*, 1984b).

Considerando a importância de estudos sobre *Zollernia ilicifolia* que apontassem marcadores químicos potenciais para a mesma, propusemo-nos no âmbito deste trabalho iniciar a investigação fitoquímica desta espécie.

2.1. Objetivo geral

Contribuir para o controle de qualidade químico de matéria-prima ou de fitoterápicos à base de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa verdadeira), através da detecção e isolamento de marcadores químicos de *Zollernia ilicifolia* (espécie adulterante).

2.2. Objetivos específicos

- Detectar, caracterizar, isolar e identificar os potenciais marcadores químicos de *Zollernia ilicifolia*.
- Realizar um monitoramento sazonal dos extratos das três espécies utilizadas como espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*) para verificar se as substâncias químicas propostas como marcadores químicos podem ser encontradas nestas espécies ao longo do ano;
- Analisar amostras de fitoterápicos aplicando os marcadores propostos para a verificação de sua validade no controle de qualidade de espinheira-santa.

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado durante o trabalho foi coletado nas imediações do campus da UFSC. O material coletado em dezembro de 1999 (*Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*) foi utilizado para a investigação das substâncias marcadoras. Em março de 2000 foi realizada uma coleta de maior quantidade de material para o trabalho de fracionamento de *Zollernia ilicifolia*, e partir desta data foram realizadas coletas mensais das três espécies acima citadas para a realização do monitoramento sazonal. Em dezembro de 2000 foi realizada nova coleta de *Zollernia ilicifolia* para a segunda parte do trabalho de fracionamento. O material vegetal foi coletado dos mesmos exemplares ao longo do trabalho. As amostras foram identificadas pelo Prof. Daniel de Barcellos Falkenberg, Departamento de Botânica, UFSC. As excicatas foram depositadas no herbário FLOR, no Departamento de Botânica, UFSC.

3.1.2. Equipamentos utilizados

O ponto de fusão foi determinado em aparelho Micro Química MQA PF – 301.

Para a concentração dos extratos e das frações foi utilizado o evaporador rotatório a vácuo Quimis, sob temperatura inferior a 40 ° C.

Os espectros de massa foram obtidos no Instituto de Química Orgânica da Universidade de Bonn.

Os espectros de ressonância magnética de carbono 13 foram obtidos no Instituto de Farmácia da Universidade de Bonn, em espectrômetro Bruker 300 MHz, pelo Dr. Werner Knöss. Os espectros de ressonância magnética de próton foram obtidos no Instituto de Química Orgânica da Universidade de Bonn em um espectrômetro Bruker 500 MHz, pelo Dr. Alexandre Taketa.

3.1.3. Solventes e reagentes

Os solventes utilizados foram de grau analítico, de procedência Nuclear, Vetec ou Synth.

O adsorvente utilizado na cromatografia líquida em coluna foi gel de sílica 60, com partículas entre 0,05 a 0,2 mm de diâmetro, de marca Carlo Erba.

Para as cromatografias em camada delgada foram usadas placas, de gel de sílica 60 F 254, de marca Merck, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 μm de diâmetro.

Para a detecção das substâncias nas placas cromatográficas foram utilizados como reagentes/ reveladores:

- Timol-sulfúrico (MERCK, 1971);
- Vanilina-sulfúrica (MERCK, 1971);
- Anisaldeído-sulfúrico (WAGNER e BLADT, 1995).

Os padrões de friedelina e friedelanol foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Moacir Pizzolatti, do Departamento de Química da UFSC. O padrão de ácido betulínico foi cedido pelo Dr. Ralf Mayer, da Universidade de Bonn.

3.2. Procedimentos gerais

3.2.1. Detecção das substâncias marcadoras de *Zollernia ilicifolia*

3.2.1.1. Material vegetal

Amostras de *Zollernia ilicifolia*, *Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* foram coletadas em dezembro/1999, e as folhas foram submetidas a secagem à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas.

3.2.1.2. Preparação dos extratos

Os extratos das três espécies foram obtidos através de maceração em CH_2Cl_2 durante 8 dias, e após foram filtrados e concentrados sob baixa pressão, em evaporador rotatório a vácuo. Foram realizadas partições em solventes em funil de separação com pequenas amostras dos extratos CH_2Cl_2 de *M. ilicifolia*, *Z. ilicifolia* e *S. bonplandii* para verificar os perfis cromatográficos de suas frações.

3.2.1.3. Análise cromatográfica e identificação da substância marcadora

Os extratos brutos originais de *Zollernia ilicifolia*, *Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* e respectivas frações EP e CH_2Cl_2 obtidas na partição com solventes, foram submetidos à análise cromatográfica para a detecção de fitomarcadores para *Zollernia ilicifolia*. Foram utilizados diversos eluentes com graus de polaridade variáveis: hexano/ AcOEt (6 : 4), hexano/ AcOEt (8 : 2), hexano/AcOEt (85: 15), hexano/ AcOEt (9 : 1), hexano/ AcOEt (92: 8) e hexano/ AcOEt (95: 5); como reveladores foram utilizadas soluções de vanilina-sulfúrica, timol-sulfúrico (MERCK, 1971) e anisaldeído-sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1995).

3.2.2. Fracionamento do extrato de *Zollernia ilicifolia*

3.2.2.1. Extratos vegetais

Amostras de *Zollernia ilicifolia* foram coletadas em março/2000 (extrato I) e em dezembro/2000 (extrato II) nas imediações do campus da UFSC. Suas folhas foram submetidas a secagem em temperatura ambiente e após, moídas em moinho de facas.

3.2.2.2. Preparação dos extratos

O extrato I de *Zollernia ilicifolia* foi preparado a partir de 800 g e o extrato II a partir de 1,4 Kg de folhas secas e moídas. O material foi macerado em CH_2Cl_2 durante 6 dias, na proporção de 1g de material vegetal para 10 mL de líquido extrator. Após, os macerados foram filtrados e concentrados sob baixa pressão em evaporador rotatório a vácuo, à temperatura de 40° C (figuras 8 e 9).

3.2.2.3. Procedimentos de isolamento

3.2.2.3.1. Fracionamento do extrato I (figura 8)

a) Partição com solventes

Após a evaporação do macerado em evaporador rotatório, foram obtidos 22,41 g de extrato mole, que foram suspensos em 50 mL de CH_2Cl_2 e 500 mL de metanol aquoso 90 %, e submetidos à partição em funil de separação com éter de petróleo (4 x 250 mL).

O resíduo foi evaporado e suspenso em 50 mL de CH_2Cl_2 e 400 mL de metanol 70 %, submetido novamente à partição com CH_2Cl_2 (3 x 250 mL). Esta fração (codificada IZI - CH_2Cl_2) foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um resíduo de 3,01 g.

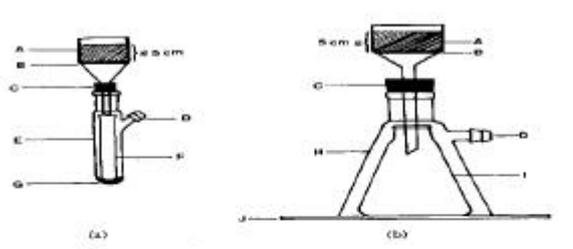
b) Fracionamento da fração IZI - CH₂Cl₂

A fração IZI - CH₂Cl₂ foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando-se EP/ AcOEt (85:15) para a montagem da coluna. A coluna possuía 8 cm de largura x 15 cm de altura, e foram usados 345 g de gel de sílica.

A amostra (3,01 g) foi dissolvida em 10 mL de CH₂Cl₂ e aplicada no topo da coluna. Foram coletadas frações de 250 mL cada. Seguiu-se a eluição com eluentes em proporção crescente de polaridade: EP/ AcOEt 85:15 (frações 1-19), EP/ AcOEt 1:1 (frações 20 – 21), metanol 100 % (frações 22 – 25), metanol/ água 9:1 (fração 26 - 28). Ao total foram coletadas 28 frações, codificadas com a letra IA e o número da fração.

c) Obtenção de ZI2

As frações IA 7 – 10 (300 mg) foram submetidas a uma nova separação cromatográfica, em coluna a vácuo (coluna IB), conforme PELLETIER *et al.*, 1986 e COLL & BOWDEN, 1986 (figura 7). Foi utilizado como suporte para o adsorvente um funil de vidro sinterizado n.º 3. Foram utilizados 15 g de sílica, e como eluente EP/ CHCl₃ 1:3 (frações 1 – 34), EP/ CHCl₃ 1:10 (frações 35 –46), CHCl₃ 100 % (frações 47 – 80), CHCl₃/ AcOEt 1:1 (frações 81 – 84) e metanol 100 % (fração 85). Ao todo foram coletadas 85 frações de 25 mL cada.



- a) Adsorvente para cromatografia
- b) Funil de vidro sinterizado
- c) Junta de borracha
- d) Fonte de vácuo
- e) Tubo de vidro com abertura para vácuo
- f) Tubo coletor
- g) Algodão
- h) Frasco de Kitasato com fundo removível

Figura 7 – equipamento utilizado para cromatografia líquida a vácuo. (Fonte: COLL & BOWDEN, 1986).

As frações IB 60 – 81 (57 mg) foram reunidas e novamente cromatografadas em coluna líquida tradicional (coluna IC) utilizando 25 g de Sephadex® LH 20, de procedência Carlo Erba. A amostra foi dissolvida no eluente, uma mistura de CHCl_3 / metanol (1:1). Foram obtidas no total 20 frações de 15 mL cada. As frações IC 5, 6 e 7 foram reunidas e calculado o seu rendimento (11,9 mg) a amostra foi lavada com 5 mL de éter de petróleo, obtendo-se como resíduo 6,8 mg. Cromatografando-se esta amostra em placas de gel de sílica em EP/AcOEt (85:15), verificou-se que a mesma constituía uma fração enriquecida em ZI2, porém, ainda impura para a análise espectroscópica. Por outro lado, a quantidade disponível dificultava o trabalho de purificação. O processo de fracionamento foi repetido, como descrito em “extrato II”.

d) Obtenção de ZI3

As frações IA 11- 14 e IA 17 foram reunidas, cromatografadas em coluna líquida a vácuo (coluna ID), utilizando como adsorvente 15 g de gel de sílica. As frações reunidas (100 mg) foram suspensas no eluente – CH_2Cl_2 / AcOEt (98: 2) – e aplicadas na coluna. Ao todo foram coletadas 98 frações (ID) de 25 mL cada.

As frações ID 61 – 75 (28,4 mg) foram aplicadas em uma nova coluna líquida tradicional de gel de sílica. Utilizaram-se 20 g de adsorvente em uma coluna de 2 cm de largura x 15 cm de altura e como eluentes EP/ AcOEt 1:1 (frações 1 – 30), AcOEt 100 % (frações 31 –40), AcOEt/ metanol (frações 41 – 48) e metanol 100 % (fração 55). Foram coletadas 55 frações de 10 mL. As frações foram cromatografadas e reunidas de acordo com a semelhança em sua composição. As frações IE 9 – 12 foram reunidas e pesadas, e seu rendimento foi calculado como 3,5 mg. Analisou-se por CCD, observou-se que além de ZI3 estavam presentes ainda outras substâncias, inviabilizando a continuação do trabalho. Esta etapa também foi repetida como descrito em “extrato II”.

3.2.2.3.2. Fracionamento do extrato II (figura 9)

a) Partição com solventes

Após a evaporação do macerado em evaporador rotatório, foram obtidos 62,3034 g de extrato mole, que foram suspensos em 250 mL de CH_2Cl_2 e 750 mL de metanol 90 %, e submetidos a partição em funil de separação com éter de petróleo, (4 x 500 mL).

O resíduo foi evaporado e suspenso em 1 L de metanol 70 %, submetido novamente a partição com CH_2Cl_2 (3 x 500 mL). A fração diclorometânica (IIZI- CH_2Cl_2) foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um resíduo de 11,1g.

b) Fracionamento da fração IIZI – CH_2Cl_2

A fração IIZI - CH_2Cl_2 foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica, utilizando-se éter de petróleo/ acetato de etila (85:15) para a eluição. Foram usados 330 g de gel de sílica em uma coluna de 8 cm de largura x 15 cm de altura (coluna IIA).

A amostra (11,1 g) foi dissolvida em 10 mL de CH_2Cl_2 e aplicada no topo da coluna. Foram coletadas frações de 250 mL cada. Seguiu-se a eluição com eluentes de polaridade crescente: éter de petróleo/ acetato de etila 85:15 (frações 1-29), éter de petróleo/acetato de etila 2:1 (frações 30 – 31), éter de petróleo/acetato de etila 1:2 (frações 32 – 33), acetato de etila 100 % (frações 34 –37), acetato de etila/ metanol 1: 1 (frações 38 – 39), metanol 100 % (frações 40 – 43), metanol/ água 9:1 (fração 44). Ao total foram coletadas 44 frações, codificadas com a letra IIA e o número da fração.

Durante a coleta das frações IIA13 a IIA17, aproximadamente, foi observada a formação de grande quantidade de um precipitado branco, que foi separado e teve seu rendimento calculado. As frações recolhidas e os

precipitados IIA13 - IIA17 foram cromatografados em placas de gel de sílica utilizando como eluente éter de petróleo/acetato de etila (85:15).

c) Obtenção de ZI2

Os precipitados das frações IIA13 e IIA14 foram reunidos e submetidos a fracionamento cromatográfico em coluna (2 x 40 cm), utilizando-se éter de petróleo/acetato de etila (9:1) para a montagem da coluna.

A amostra (91,6 mg) foi dissolvida em 7 mL de CH_2Cl_2 e aplicada na coluna. Foram coletadas frações de 15 mL cada. Foram utilizados os seguintes eluentes em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo/acetato de etila 9:1 (frações 1 – 53), éter de petróleo/acetato de etila 1:1 (frações 53 – 60), acetato de etila 100% (frações 61 – 62) e metanol 100 % (frações 63 – 69). Ao todo foram coletadas 69 frações, que foram codificadas com as letras IIB e o número da fração.

As frações obtidas foram analisadas por CCD em gel de sílica. As frações foram agrupadas em função do grau de pureza e da semelhança de sua composição, sendo reunidas as frações IIB31 e IIB 34 - 39.

d) Purificação de ZI2

As frações IIB31 e IIB34- B39 foram reunidas e concentradas, obtendo-se um total de 24,6 mg. Na análise cromatográfica, em eluente EP/AcOEt (85:15), verificou-se a presença de uma mancha principal em R_f aproximadamente 0,5 e algumas impurezas mais apolares, as quais foram retiradas através de lavagem com 5 mL de éter de petróleo. O resíduo lavado foi concentrado, obtendo-se um sólido branco (11,8 mg) que na análise cromatográfica mostrou tratar-se de um composto puro, denominado ZI2.

e) Obtenção de ZI3

Os precipitados das frações IIA15 a IIA17 (216,4 mg) foram cromatografados em uma terceira coluna líquida tradicional (coluna IIC). Foram utilizados 83 gramas de gel de sílica, e como eluente uma mistura de EP/ AcOEt/ metil-etil-cetona (9:1:1). Foram recolhidas 108 frações de 15 mL cada, e destas reunidas as frações IIC59 – 65. Foi obtida uma amostra enriquecida em ZI3 (13,5 mg). Entretanto, devido ao baixo grau de pureza e pouca quantidade, a continuação do trabalho de isolamento não foi possível.

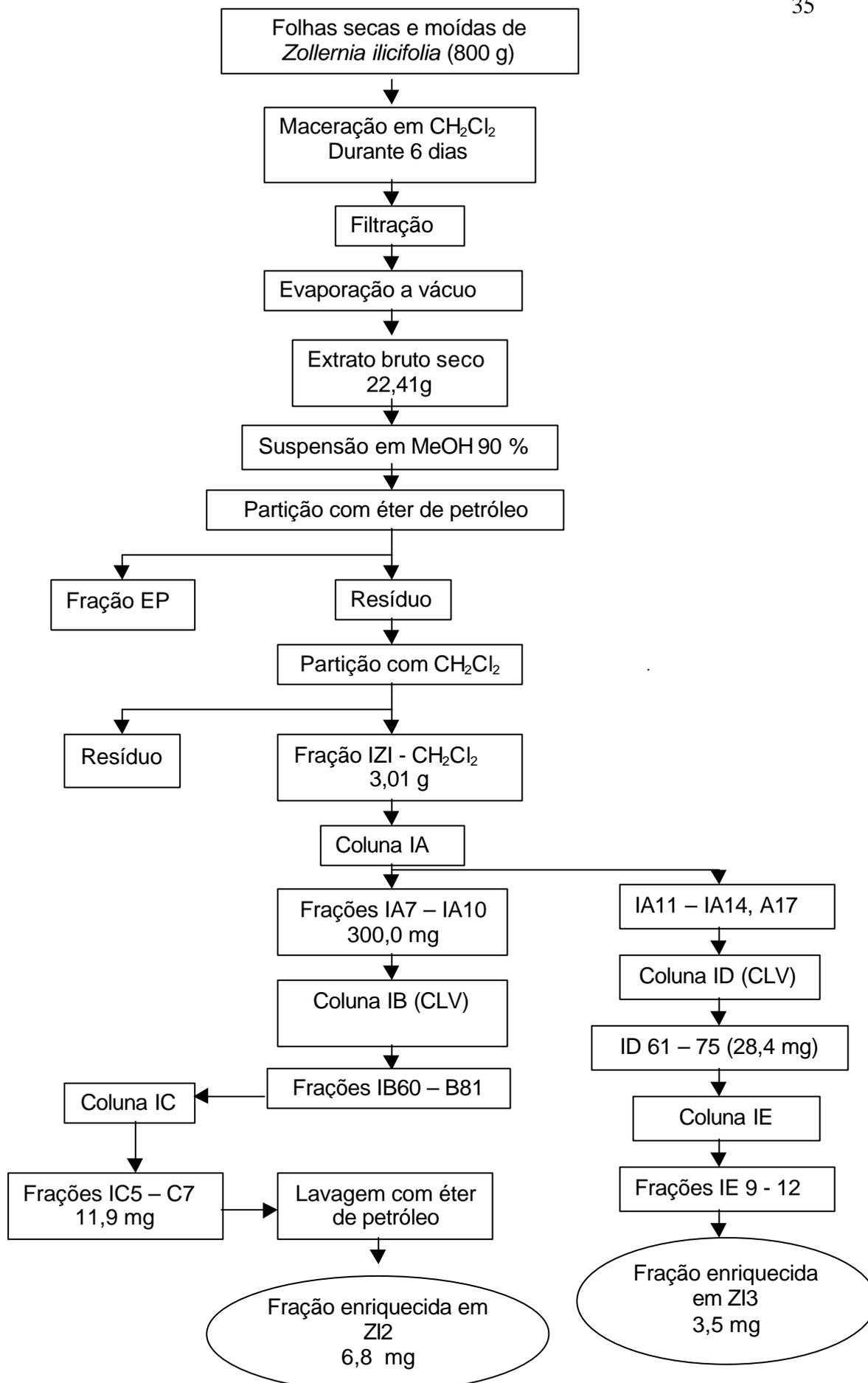


Figura 8. Fluxograma dos procedimentos utilizados no fracionamento do extrato I de *Zollernia ilicifolia*.

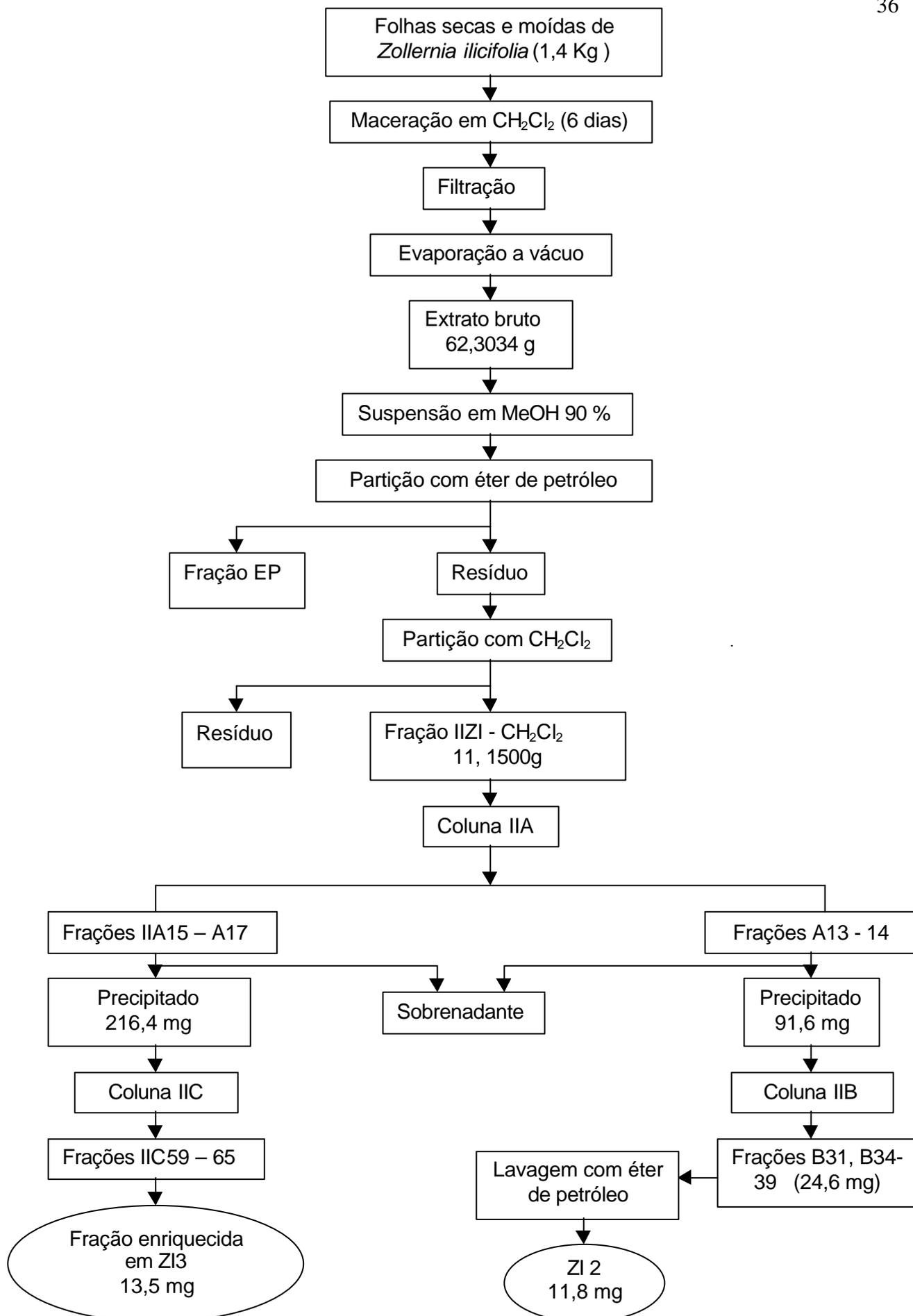


Figura 9. Fluxograma dos procedimentos utilizados no fracionamento do extrato II de *Zollernia ilicifolia*.

3.3. Monitoramento sazonal

3.3.1. Material vegetal

Coletas mensais de espécimes vegetais de *Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*, devidamente identificadas pelo prof. Daniel de Barcellos Falkenberg, (Departamento de Botânica, UFSC) foram realizadas de março de 2000 a março de 2001 nas imediações do campus universitário da UFSC. O material foi submetido a secagem à temperatura ambiente e moído em moinho de facas.

3.3.2. Preparação dos extratos

Os extratos para o monitoramento sazonal (MS) de *Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* foram obtidos através de maceração em CH_2Cl_2 durante 6 dias, na proporção de 1 g de material vegetal para 20 mL de solvente. Após, o macerado foi filtrado e concentrado sob baixa pressão em evaporador rotatório a vácuo, à temperatura de 40° C. Ao total, foram obtidos 13 extratos para cada espécie.

3.3.3. Análise cromatográfica

Os extratos do MS foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada em placas de gel de sílica. Como eluente foi utilizado éter de petróleo/ acetato de etila (85:15) e timol-sulfúrico como revelador (MERCK, 1971). Para o monitoramento de *Zollernia ilicifolia* foi pesquisada a presença do marcador proposto, ZI2. A fim de monitorar as substâncias majoritárias de *Maytenus ilicifolia* foram usados como padrões os triterpenos friedelina e friedelan-3-ol (VILEGAS *et al.*, 1994), como eluente éter de petróleo/diclorometano (3:1) e anisaldeído-sulfúrico como revelador (WAGNER & BLADT, 1995).

3.3.4. Análise densitométrica dos extratos de *Zollernia ilicifolia*

Os extratos do MS foram diluídos de acordo com a quantidade de planta de utilizada para a preparação dos extratos, na proporção de 1 mL de solvente para 1 g de material vegetal. Foram aplicados 10 µL dos extratos em placas de gel de sílica 60 F₂₅₄ HPTLC de procedência Merck, com 10 cm de altura x 20 cm de comprimento. As placas foram eluídas em éter de petróleo/ acetato de etila (85:15) e utilizou-se timol sulfúrico como revelador (MERCK, 1971).

Após reveladas, as placas foram digitalizadas e analisadas em *software Scion Image*[®] (disponível no site www.scrc.dcrn.nih.gov) para análise densitométrica. As manchas correspondentes a ZI2, nos extratos dos diferentes meses, foram quantificadas de acordo com sua intensidade de cor e área correspondentes.

3.4. Análise cromatográfica de fitoterápicos à base de *Maytenus ilicifolia*

Amostras de fitoterápicos à base de espinheira-santa, na forma de chás (5 marcas) e na forma de cápsulas (3 marcas) foram extraídas durante 24 horas por maceração em diclorometano, na proporção droga-solvente 1:20. Amostras de tintura (2 marcas) foram concentradas diretamente em evaporador rotatório.

As amostras foram analisadas em placas de gel de sílica, utilizando éter de petróleo/diclorometano (3:1) e éter de petróleo/ acetato de etila (85:15) como eluentes e timol sulfúrico e anisaldeído sulfúrico como reveladores (MERCK, 1971; WAGNER e BLADT, 1995).

Os extratos foram comparados com extratos diclorometânicos de espécimes identificados de *Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*, juntamente com os triterpenos friedelina e friedelanol (VILEGAS *et al.*, 1994). As amostras foram comparadas verificando-se a presença dos marcadores de *Maytenus ilicifolia* (friedelina e friedelanol), *Zollernia ilicifolia* (ZI2), e de acordo com o perfil cromatográfico determinado anteriormente para *Sorocea bonplandii* (ALBERTON, 2000a).

4.1. Detecção de substâncias marcadoras

Os extratos diclorometânicos (CH_2Cl_2) de *Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* foram submetidos à cromatografia em diversos sistemas cromatográficos, à procura de fitomarcadores para *Zollernia ilicifolia*. Foram utilizados os eluentes hexano/ AcOEt (6 : 4), hexano/ AcOEt (8 : 2), hexano/ AcOEt (9 : 1), hexano/ AcOEt (92: 8) e hexano/ AcOEt (95: 5).

Ao cromatografar os extratos utilizando hexano/ AcOEt (95:5) como eluente e timol-sulfúrico como revelador, verificou-se no cromatograma de *Zollernia ilicifolia*, em R_f aproximadamente 0,25, uma substância que não estava presente nas outras duas espécies vegetais, não apresentava coloração sob luz visível, não apresentava fluorescência e extinção de fluorescência e desenvolvia cor azul pálida após a revelação com timol-sulfúrico. Utilizando como eluente hexano/ AcOEt (92: 8) esta substância, que foi chamada ZI1, localizava-se em R_f 0,33.

Ao cromatografar as frações diclorometânicas dos extratos das três espécies utilizando-se EP/AcoEt (85: 15), verificou-se para *Zollernia ilicifolia* a presença de uma nova substância de cor azul semelhante a ZI1 após revelação com timol-sulfúrico, em R_f 0,45, que foi chamada ZI2, e uma substância cor rosa-pálida, em R_f 0,31, que foi chamada ZI3, ambas sem coloração visível, sem fluorescência e extinção de fluorescência. Neste último sistema cromatográfico, ZI1 aparecia próxima ao fronte do solvente, o que não permitia sua clara visualização. ZI1, ZI2 e ZI3, quando reveladas com vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico apresentavam coloração violácea, não sendo possível a sua diferenciação das demais substâncias com estes reveladores.

Considerando a presença destas 3 substâncias, decidiu-se assim, empregá-las como marcadores de *Zollernia ilicifolia* e proceder o fracionamento de seu extrato para tentar isolá-las e identificá-las.

4.2. Fracionamento dos extratos de *Zollernia ilicifolia*

O fracionamento dos extratos de *Zollernia ilicifolia* realizou-se em duas etapas.

Na primeira etapa (figura 8), a quantidade de material vegetal processada (800 g de folhas secas e moídas) mostrou-se insuficiente, já que levou a uma fração enriquecida em ZI2 (6,8 mg), porém esta continha ainda algumas impurezas que inviabilizavam a obtenção de espectros adequados para a elucidação estrutural. A primeira etapa envolvia diferentes metodologias das citadas no item 3 deste trabalho (*Materiais e métodos*), como por exemplo a coluna líquida a vácuo (CLV), chamada de coluna B (COLL & BOWDEN, 1986; PELLETIER, 1986) (figura 7). Esta coluna foi realizada utilizando as frações IA7 – 10 da primeira etapa (300,0 mg) e EP/CH₂Cl₂ como eluente, porém não foram obtidos bons resultados, devido à perda de material na sílica e separação ineficiente. As frações IB60 – 81 (57, 0 mg) foram reunidas e filtradas em coluna de Sephadex® LH 20 (coluna C), utilizando CHCl₃/ MeOH (1:1) como fase móvel. Sephadex® é o nome comercial de um gel derivado do dextrano, e a separação dos compostos através desta fase estacionária baseia-se na diferença de tamanho das moléculas, ou seja a filtração molecular (HOUGHTON & RAMAN, 1998). A escolha de Sephadex® como fase estacionária deveu-se ao fato de que as impurezas presentes na fração eram semelhantes em polaridade à ZI2. Como o monitoramento das frações cromatográficas foi realizado através de CCD onde a fase estacionária presente é o gel de sílica, que se baseia na adsorção de partículas de acordo com sua polaridade, não havia idéia clara, *a priori*, de como seria o resultado da separação na coluna C. Este acabou não sendo satisfatório, sugerindo que os componentes da fração, de fato, eram semelhantes em tamanho da molécula. Não havia material suficiente para a continuação do trabalho, e em vista disso, o procedimento foi realizado pela segunda vez, utilizando maior quantidade de planta para a extração.

Para a tentativa de isolamento de ZI3 foram reunidas as frações A11 – A14 e A17 – A18 e realizada uma segunda coluna líquida a vácuo (coluna D), a exemplo do fracionamento de ZI2. Como eluente foi utilizada a mistura de EP/ AcOEt (98:2), e coletadas 98 frações de 25 mL cada. Foram reunidas as frações ID 61 a 75, obtendo-se um rendimento de 28,4 mg. Estas frações foram filtradas em coluna líquida tradicional (coluna E), utilizando 20 g de gel de sílica em uma coluna de 2cm de largura x 15 cm de comprimento e uma mistura de éter de petróleo/ acetato de etila (8:2) como eluente. Foram coletadas 55 frações de 10 mL, e destas, reunidas as

frações IE 9 - 12 (cerca de 3,5 mg), que originaram uma fração enriquecida em ZI3, porém, com pequena quantidade de amostra e baixo grau de pureza, o que impossibilitava a obtenção de espectros para sua elucidação estrutural.

Na segunda etapa (extrato II) (figura 9) foram utilizados como material de partida 1,4 Kg de folhas secas e moídas, repetindo-se as etapas até a coluna A. Algumas modificações foram realizadas a partir daí, como a retirada da coluna líquida a vácuo e substituição pela cromatografia líquida em coluna tradicional.

Após a realização e monitoramento cromatográfico da coluna A, verificou-se que a substância ZI1 era ainda relativamente minoritária nas frações onde estava presente, e que estas haviam tido um rendimento extremamente baixo em relação às frações onde ZI2 aparecia. Por esta razão, os esforços concentraram-se no isolamento desta última. Como ZI2 foi detectada, inicialmente, em frações diclorometânicas da partição, foram realizadas cromatografias comparativas entre os extratos brutos de *Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* e verificou-se que este marcador era de fácil detecção também no extrato bruto de *Zollernia ilicifolia*.

Durante a coleta das frações da coluna IIA, foi observada a formação de um precipitado branco nas frações IIA12 – 20. O precipitado foi separado das frações IIA13 a 17, onde aparecia em maior quantidade, foi cromatografado usando como fase móvel o mesmo eluente utilizado na coluna e seu rendimento foi calculado (tabela 3).

Tabela 3. Rendimentos dos precipitados das frações IIA13 – 17

Fração	Peso da fração	Peso do precipitado	Rendimento (%)
A13	200,0 mg	15,8 mg	7,9
A14	193,9 mg	21,3 mg	10,9
A15	190,0 mg	153,9 mg	81,0
A16	250,0 mg	115,7 mg	46,3
A17	176,1 mg	61,7 mg	35,0

Após a análise cromatográfica, verificou-se que o precipitado formado continha a substância de interesse, ZI2, em um grau de pureza mais elevado em relação às frações originais. Para a realização da coluna IIB, foram reunidos os precipitados IIA13 – 15, pois os precipitados IIA16 e IIA17 continham a substância ZI2 em menor proporção.

A reunião de IIB31 e IIB34 – 39 deu origem a uma fração enriquecida em ZI2, que no cromatograma obtido com EP/ AcOet 85:15 aparecia em Rf próximo a 0,50 com algumas impurezas em Rf mais elevado.

A lavagem do resíduo das frações IIB31 e IIB34 - 39 com pequeno volume de éter de petróleo, permitiu a dissolução preferencial das impurezas, obtendo-se no resíduo insolúvel a substância ZI2 cromatograficamente pura.

O sucesso do procedimento é explicado pelo fato de que técnicas como a de lavagem, recomendada para casos onde existe pequena quantidade de material, depende da alta solubilidade, neste caso, dos compostos apolares em solventes de baixa polaridade em relação aos outros componentes da fração (HOUGHTON & RAMAN, 1998). Assim, julgando estas impurezas com polaridade e solubilidade suficientemente diferentes da substância principal, a fração foi lavada com éter de petróleo.

O precipitado IIA continha também a substância ZI3, substância de interesse. Para o isolamento de ZI3 foi realizada uma terceira coluna líquida tradicional (coluna IIC), a partir dos precipitados IIA16 e IIA17, que foram excluídos da coluna IIB pois tinham menor pureza em relação aos precipitados IIA13 – 15. 216,4 mg de amostra foram eluídas em coluna de gel de sílica, utilizando uma mistura de EP/ AcOEt/ metil-etil-cetona (9:1:1) como eluente. Foram recolhidas 108 frações de 15 mL cada, e destas reunidas as frações IIC59 – 65. Porém, novamente, a exemplo da primeira etapa do trabalho, foi obtida uma fração enriquecida em ZI3 (13,5 mg), porém, com baixo grau de pureza e pouca quantidade, o que impossibilitaria a continuação do trabalho com esta fração.

4.3. Elucidação estrutural de Z12

A substância Z12 foi obtida através da lavagem das frações IIB31 e IIB34 – 39 de *Zollernia ilicifolia* com éter de petróleo, na forma de um pó amorfo, branco-amarelado, com ponto de fusão em 228 – 229,1° C. Na análise cromatográfica, este composto não apresentou fluorescência em 366 nm nem extinção da fluorescência em 254 nm. Após a revelação com timol sulfúrico, esta substância apresenta coloração azul-pálida. Devido às suas características de solubilidade (muito solúvel em diclorometano), seu comportamento cromatográfico, e reação com reveladores como anisaldeído-sulfúrico, vanilina-sulfúrica e timol-sulfúrico, haviam suspeitas de que esta substância se tratasse de um terpeno ou esteróide.

O espectro de massas de alta resolução (figura 11) indicou a fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$, com base no pico do íon molecular $m/z = 442,5$. A esta fórmula corresponde o equivalente a 6 insaturações, o que sugeriu a possibilidade de um triterpeno com 5 anéis e uma insaturação. O pico em $m/z = 424,5$ ($M - 18$) evidencia a perda de uma molécula de água, evento que corresponde comumente a álcoois. O pico em $m/z = 411,4$ ($M - 31$) corresponde à perda de um fragmento CH_2OH (SILVERSTEIN *et al.*, 1979), o que sugere a presença de um grupamento alcoólico exocíclico. O pico-base se apresenta em $m/z = 203,2$ ($M - 239,3$), onde, segundo OGUNKOYA (1981), a ocorrência de um pico-base ou pico intenso em $m/z = 203$ corresponde à presença provável de um grupo $-CH_2OH$ no carbono 14 (figura 10). O pico em $m/z = 203$, segundo esta literatura, provém da estrutura mostrada na figura 10. Compostos com esqueletos dos grupos lupano e hopano (figuras 13 e 14) são caracterizados por um pico intenso em $m/z 189$, independente da natureza dos substituintes nos anéis A, B, C e E. Quando, ao invés de um grupamento isopropenil, existe a presença de um grupo isopropil no anel E este pico desloca-se para $m/z 191$. A presença de um pico intenso em $m/z 189$ no espectro de Z12 sugeriu, assim, que a substância apresentasse esqueleto lupano ou hopano com grupo isopropenil no anel E.

O espectro de ressonância magnética de próton (figura 12) confirma a presença de um grupo isoprenila, pela presença de um sinal em 4,58 ppm, com intensidade correspondente a um próton, e outro em 4,68 ppm, também correspondente a um

próton. Os dubletos em 3,80 ppm e 3,33 ppm, correspondentes cada um a um próton, foram atribuídos aos prótons ligados ao carbono do grupo –CH₂OH (figura 17 e 19).

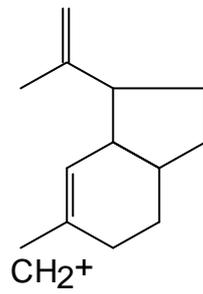


Figura 10. Estrutura do fragmento correspondente ao pico-base em $m/z = 203$ no espectro de massas de triterpenos, segundo OGUNKOYA (1981).

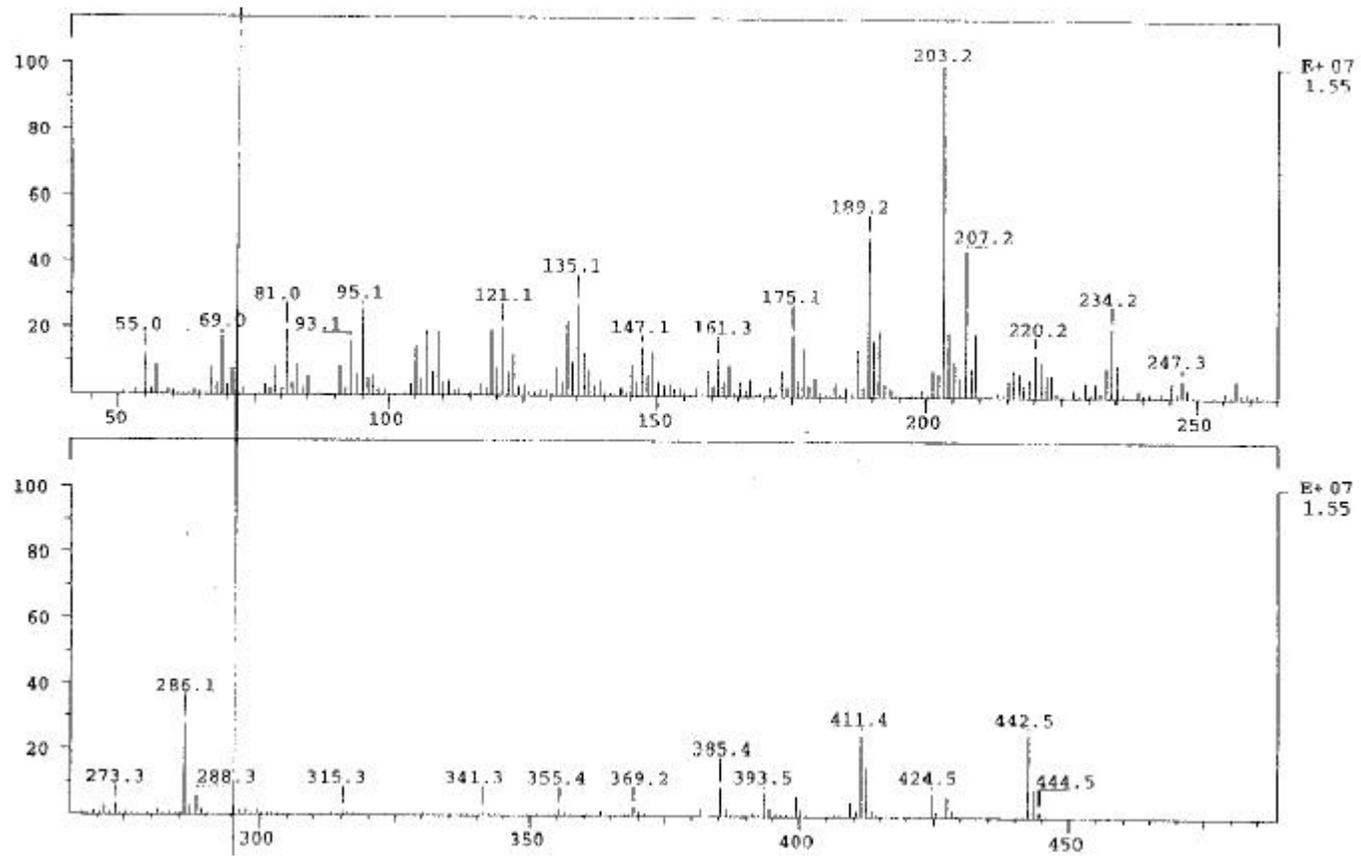


Figura 11. Espectro de massas de alta resolução de Z12.

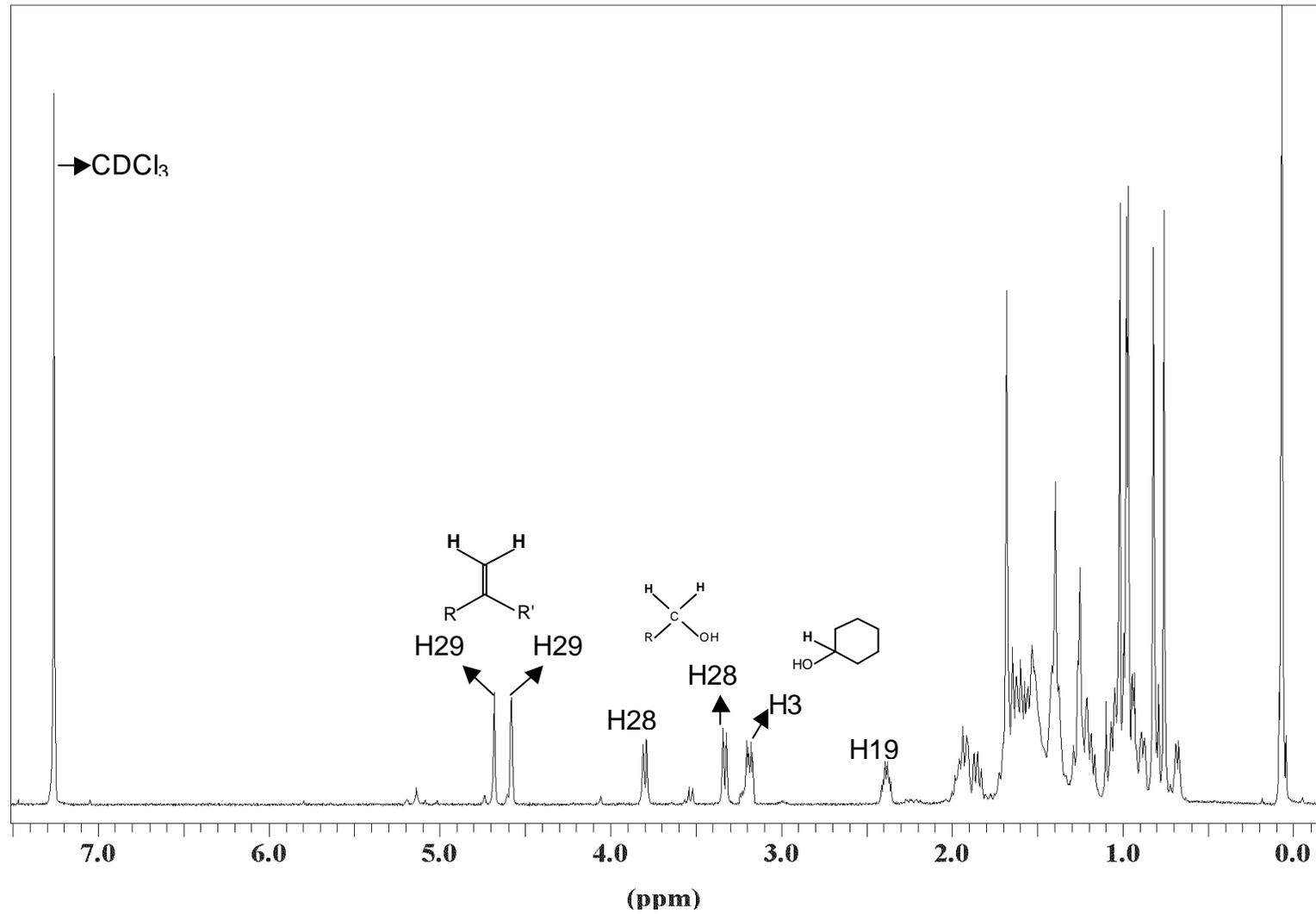


Figura 12. Espectro de RMN de próton de ZI2, em CDCl₃ (300 MHz)

A análise dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^{13}C , e sua comparação com os dados de MAHATO e KUNDU (1994), reforçou a hipótese de que ZI 2 seria um triterpeno da série dos lupanos ou hopanos (figura 13 e 14).

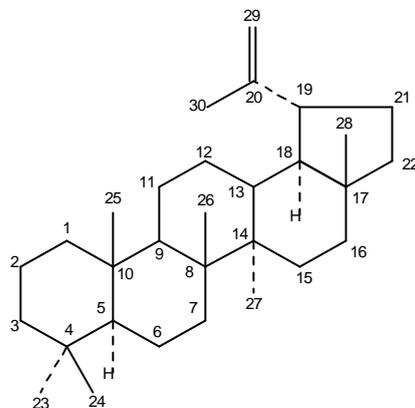


Figura 13. Esqueleto básico dos triterpenos da série dos lupanos.

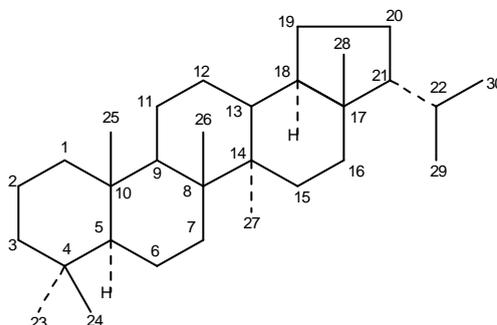


Figura 14. Esqueleto básico dos triterpenos da série dos hopanos.

A comparação mais apurada dos valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C (figura 15) com os valores descritos para vários triterpenos numa revisão da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994) sugeriu que a substância em questão pudesse corresponder à betulina (tabela 4).

Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT) de ZI2 em CDCl_3 (75 MHz).

Figu

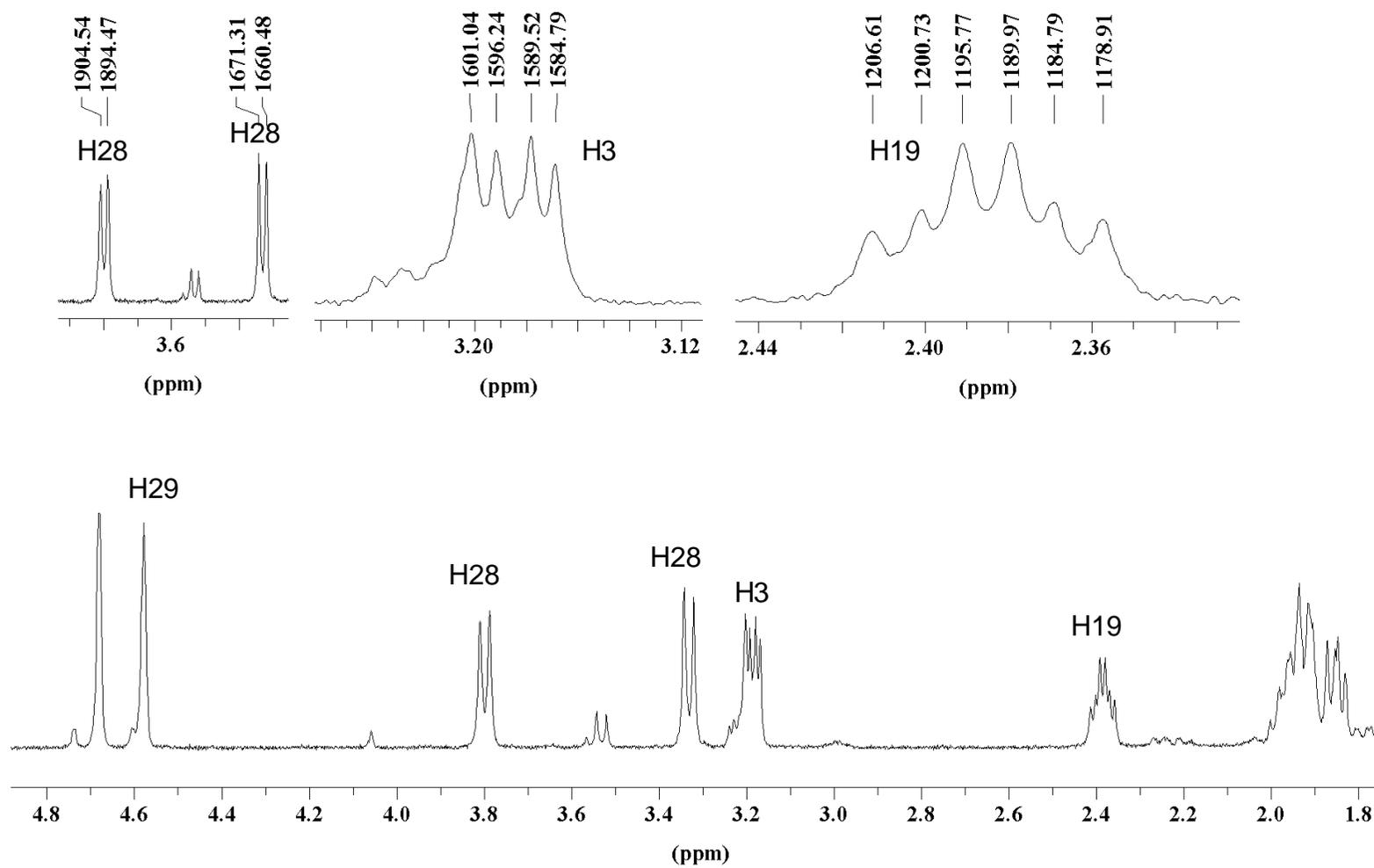


Figura 17. Detalhes ampliados do espectro de RMP de ZI₂ em CDCl₃ (300 MHz).

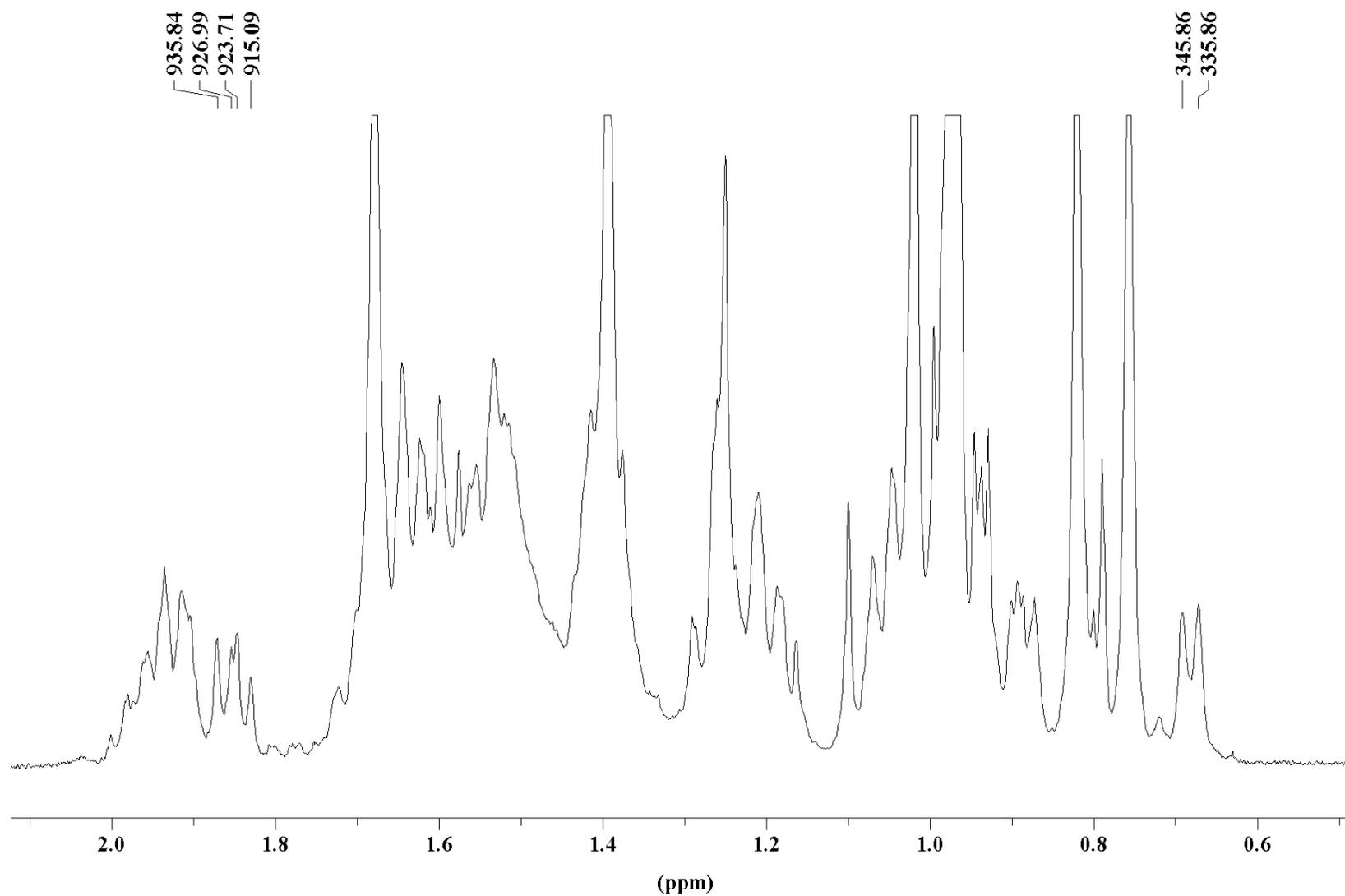


Figura 18. Detalhes ampliados da região de campo alto do espectro de RMN de próton de ZI2 em CDCl₃ (300 MHz).

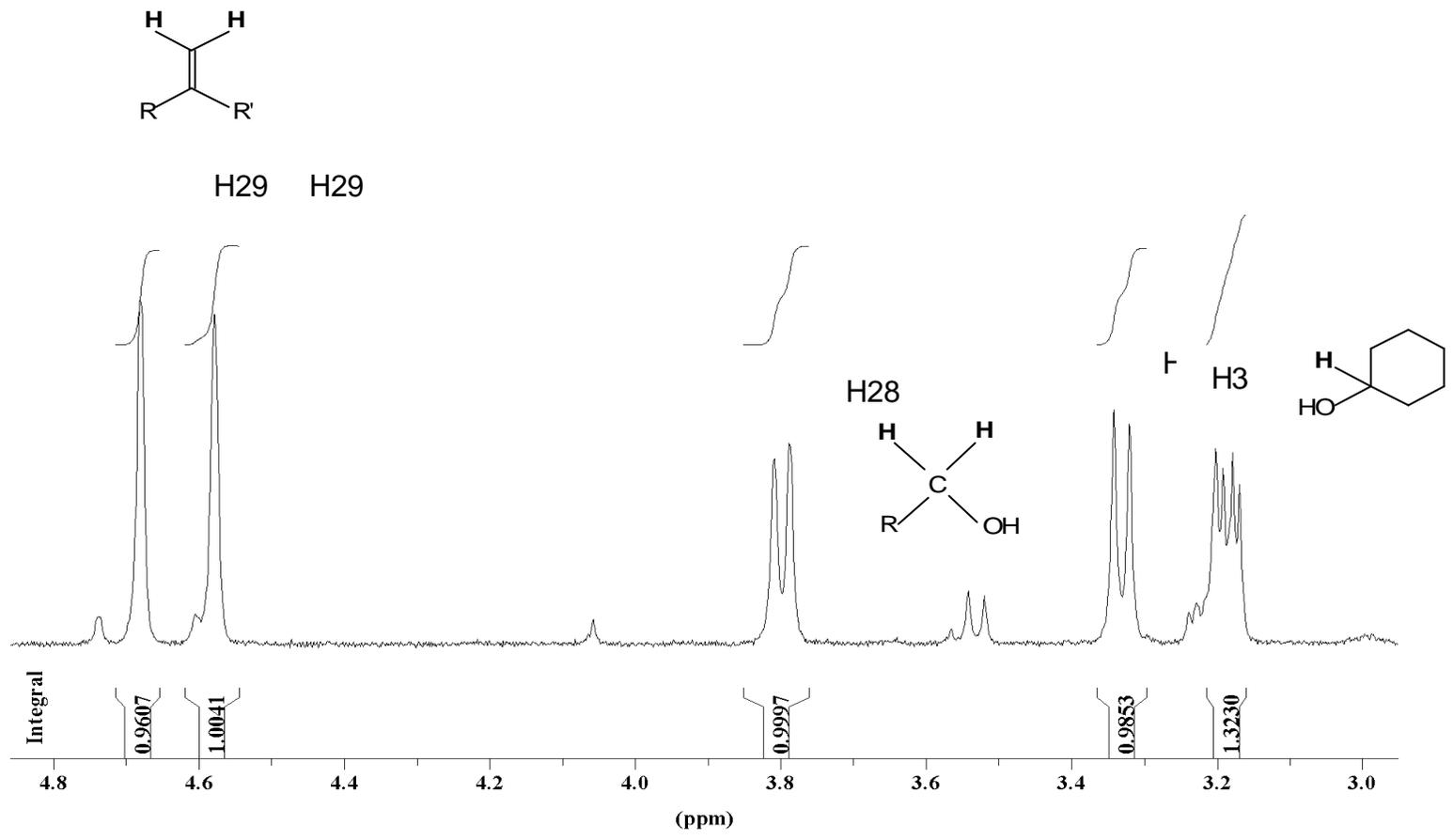


Figura 19. Detalhes ampliados da região entre 4,8 e 3,0 ppm espectro de RMN de próton de Z12 em CDCl₃ (300 MHz).

Tabela 4. Valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C de Z12 em relação à betulina (ppm), ambos em CDCl_3 .

Z12		Betulina (MAHATO e KUNDU, 1994)	
Valores de deslocamento químico (ppm)	Tipo de carbono	Valores de deslocamento químico (ppm)	Tipo de carbono
14,743	CH_3	14,77	CH_3
15,354	CH_3	15,40	CH_3
15,953	CH_3	15,97	CH_3
16,101	CH_3	16,12	CH_3
18,278	CH_2	18,33	CH_2
19,023	CH_3	19,11	CH_3
20,798	CH_2	20,87	CH_2
25,161	CH_2	25,25	CH_2
27,008	CH_2	27,04	CH_2
27,368	CH_2	27,19	CH_2
27,966	CH_3	27,98	CH_3
29,131	CH_2	29,20	CH_2
29,704	CH_2	29,78	CH_2
33,951	CH_2	34,00	CH_2
34,189	CH_2	34,26	CH_2
37,127	CH	37,34	CH
37,270	C	37,17	C
38,664	C	38,86	C
38,847	CH_2	38,76	CH_2
40,881	C	40,94	C
42,686	C	42,76	C
47,765	CH	47,76	C
48,715	CH	48,21	CH
50,354	CH	50,43	CH
55,121	CH	47,83	CH
55,244	C	55,34	CH

60,536	CH ₂	60,21	CH ₂
78,967	CH	78,92	CH
109,695	CH ₂	109,64	CH ₂
150,472	C	150,6	C

A comparação entre os valores dos deslocamentos químicos apontam a coincidência da maioria dos sinais, mas duas inconsistências aparentes, representadas em negrito na tabela 4: a falta em ZI 2 de um pico em 47,8 ppm, aproximadamente, e a presença de um pico adicional na região de 55 ppm em ZI2 em relação à betulina.

A observação mais detalhada dos espectros de RMN de ¹³C de ZI2 possibilitou explicar as inconsistências verificadas (figura 15 e 16). A presença de um pico em 47,765 ppm com uma intensidade bastante superior aos demais sugeriu a possibilidade de sobreposição dos sinais correspondentes a dois átomos de carbono. Já a análise dos picos na região de 55 ppm sugeriu a possibilidade de que o pico em 55,121 ppm, de baixa intensidade em relação aos demais, fosse devido a alguma impureza da amostra.

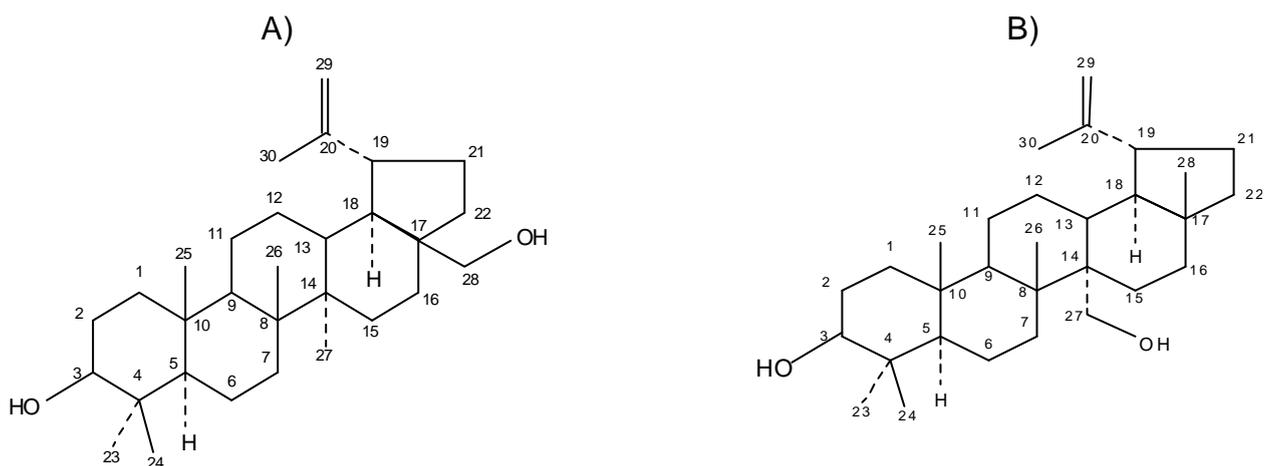


Figura 20. Estruturas propostas para ZI2, com base nos dados de RMN e EM. A) betulina. B) Hipótese estrutural com o grupo -CH₂OH presente em C14, com base nas considerações de OGUNKOYA (1981).

A comparação entre os valores de deslocamentos químicos no espectro de RMP (figuras 12, 17, 18 e 19) de Z12 e os valores descritos na literatura por TINTO e colaboradores (1992) demonstrou grande equivalência entre os valores, confirmando a hipótese de que a substância em questão trata-se realmente da betulina (tabela 5).

Tabela 5. Valores de deslocamentos químicos no espectro de RMP de Z12 em relação à betulina (ppm).

Z12 (CDCl ₃ , 300 MHz)		Betulina (CDCl ₃ , 400 MHz) (TINTO <i>et al.</i> , 1992)	
N.º do hidrogênio	Deslocamento químico (δ ppm)	N.º do hidrogênio	Deslocamento químico (δ ppm)
H1	1,65; 0,89	H1	1,65; 0,89
H2	1,58	H2	1,58
H3	3,18	H3	3,18
H5	0,67	H5	0,67
H6	1,53; 1,38	H6	1,52; 1,38
H7	1,39	H7	1,39
H9	1,27	H9	1,27
H11	1,42; 1,18	H11	1,41; 1,19
H12	1,63; 1,03	H12	1,63; 1,03
H13	1,64	H13	1,64
H15	1,70; 1,04	H15	1,70; 1,04
H16	1,92; 1,21	H16	1,93; 1,20
H18	1,57	H18	1,57
H19	2,37	H19	2,38
H21	1,94; 1,40	H21	1,95; 1,40
H22	1,87; 1,02	H22	1,86; 1,02
H23	0,96	H23	0,96
H24	0,76	H24	0,76
H25	0,82	H25	0,82
H26	1,02	H26	1,02
H27	0,98	H27	0,98

H28	3,80; 3,33	H28	3,77; 3,31
H29	4,67; 4,58	H29	4,68; 4,58
H30	1,69	H30	1,68

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN (tabela 6) de ^{13}C de ZI2 e do oleanderol (figura 21) (SIDDIQUI *et al.*, 1988), um derivado da betulina que contém o grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ na posição 14 foi feita de modo a verificar qual das hipóteses A ou B (figura 20) poderia ser descartada para a elucidação completa da estrutura de ZI2.

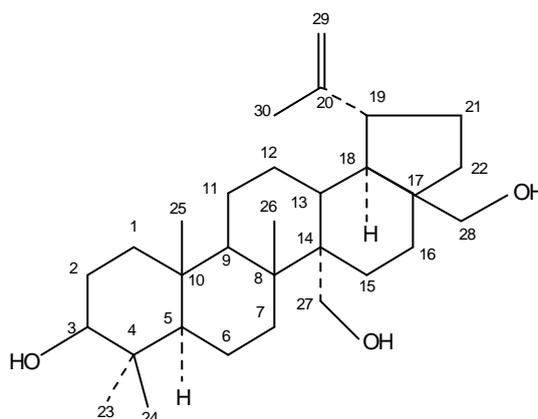


Figura 21. Estrutura química do oleanderol.

Tabela 6. Comparação dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C entre Zi 2 e oleanderol (ppm), ambos em CDCl_3 (75 MHz).

Valores de deslocamento químico de ZI2		Valores de deslocamento químico do oleanderol	
1	38,86	1	38,7
2	27,368	2	27,3
3	78,967	3	79,0
4	38,664	4	38,4
5	55,244	5	55,4
6	18,278	6	18,3
7	34,189	7	34,4
8	40,881	8	41,0
9	50,354	9	50,6

10	37,270	10	37,0
11	20,798	11	23,4
12	25,161	12	125,0
13	37,127	13	140,0
14	42,686	14	50,5
15	27,008	15	27,4
16	29,131	16	29,7
17	47,765	17	48,9
18	48,715	18	49,3
19	47,765	19	46,9
20	150,472	20	151,0
21	29,704	21	30,6
22	33,951	22	32,2
23	27,966	23	28,0
24	15,354	24	15,3
25	16,101	25	16,1
26	15,953	26	16,1
27	14,743	27	69,9
28	60,536	28	60,6
29	109,695	29	109,6
30	19,023	30	19,4

A observação dos valores acima (tabela 6) descarta a possibilidade do carbono 27 conter o grupo – OH. Em comparação ao oleanderol, a estrutura de ZI2 possui uma metila no carbono 27, o que é verificado também através do valor de deslocamento químico deste átomo de carbono estar em campo alto (14,743 ppm). A presença de um átomo de oxigênio no carbono 27 do oleanderol produz um efeito de desblindagem, o que é comprovado pelo valor de deslocamento químico (69,9 ppm). O carbono 28, funcionalizado em ambos compostos, também contribui na demonstração do efeito de desblindagem provocado pelo oxigênio (ZI2 = 60,536 ppm; oleanderol= 60, 6 ppm). Ao comparar os valores de deslocamento químico dos carbonos funcionalizados 27 e 28 no oleanderol, percebe-se que a presença de

oxigênio no carbono 27 produz um efeito maior de desblindagem em relação ao carbono 28 (C27 δ = 69,9 ppm; C28 δ = 60,6 ppm). A presença no espectro de ZI2 de um sinal com deslocamento químico correspondente ao carbono 28 do oleanderol é mais uma evidência de que o grupo – OH em ZI2 estaria no carbono 28, e não no carbono 27, onde se esperaria um valor de deslocamento químico maior.

A coincidência entre os valores de deslocamentos químicos de ZI2 e da betulina e as considerações referentes ao oleanderol excluem a possibilidade do grupo – CH₂OH encontrar-se no carbono 14, de acordo com a estrutura B (figura 20).

Ao cromatografar o extrato diclorometânico, frações éter de petróleo e diclorometano de *Zollernia ilicifolia*, usando EP/AcOEt (9:1) como eluente e timol-sulfúrico como revelador, com o padrão de ácido betulínico, ácido correspondente à betulina, composto isolado da planta em questão, verificou-se uma mancha próxima à betulina, logo acima desta, de coloração rósea a marrom após a revelação (de menor tamanho), confirmando assim sua presença em *Zollernia ilicifolia*. No extrato bruto e frações cromatografadas, o ácido betulínico aparece no cromatograma como uma substância que pouco se distingue de ZI2, ou seja, betulina. Em termos práticos, a detecção da betulina no cromatograma de *Zollernia ilicifolia* parece impossível sem a percepção também do ácido betulínico, o que sugere que a detecção do marcador proposto se trata na verdade da detecção conjunta de betulina, em maior quantidade, e traços de ácido betulínico, que aparece em pequena quantidade em Rf ligeiramente superior ao desta última.

Betulina, ou lup-20(29)-en-3,28-diol foi isolada pela primeira vez em 1788. É uma substância amplamente distribuída no reino vegetal, sendo encontrada tanto em angiospermas quanto em gimnospermas, sendo predominante em árvores e arbustos. Estas substâncias são encontradas também em fungos e líquens. O Dahlgrenograma, diagrama criado por Dahlgren (DAHLGREN, 1995) mostra nas figuras 22 e 23 a distribuição da betulina nas angiospermas. De acordo com HAYEK e colaboradores (1989), a ordem Fagales detém o maior número de espécies que contém betulina, apesar desta ser bem distribuída nas angiospermas. Na ordem Fabales, a qual pertence, *Zollernia ilicifolia*, a betulina é encontrada em todas as famílias.

Na ordem Celastrales, a qual pertence *Maytenus ilicifolia*, é atribuída à betulina a presença em 20 –49 % das famílias. Foi relatada em talos e folhas de *Maytenus octogona*, originária do Peru (GONZÁLEZ *et al.*, 1986) a presença de betulina, lupeol, canofilol, β - sitosterol, ácido ursólico e friedelina. Porém apesar da betulina estar presente nesta espécie, a quantidade extraída (105 mg) é mínima em relação ao seu precursor, lupeol (8 g) e os demais componentes isolados, como o ácido ursólico (10 g).

A betulina é uma substância muito estudada do ponto de vista químico e farmacológico. Na medicina popular, as plantas que contêm betulina são associadas à propriedades antissépticas, antiinflamatórias, nematocida, inseticida, usadas em problemas dermatológicos em geral, contra a malária e no tratamento do reumatismo e gota (HAYEK, *et al.*, 1989).

Estudos biológicos desta substância demonstraram atividades antiviral contra Epstein-Barr vírus (HAYEK, *et al.*, 1989), atividade antiviral contra HIV (SUN *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2001); a partir de sua estrutura foram desenvolvidos análogos semi-sintéticos com atividade anti- HIV aumentada (KASHIWADA *et al.*, 2001). Foi relatada também atividade bacteriostática contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* e *Staphylococcus aureus* (HAYEK, *et al.*, 1989).

A atividade antitumoral da betulina também é bastante estudada. Esta substância é efetiva contra carcinosarcoma (Walker 256) e adenocarcinoma mamário humano *in vitro* (MCF – 7), possui atividade contra células leucêmicas P 388; também possui atividade contra carcinoma epidermoide *in vitro* e contra células tumorais 5WA16. Testes *in vitro* demonstraram que a betulina é um potente inibidor da fosfolipase A – 2 (BERNARD *et al.*, 2001), fato que explica o uso das plantas que contêm betulina como antiinflamatórias. Estudos em ratos mostraram que a betulina tem a propriedade de diminuir a incidência de formação de cálculos renais provenientes da hiperossalúria, diminuindo a lesão tubular e normalizando as funções de excreção (VIDYA & VARALAKSHMI, 2000).

O ácido betulínico tem várias propriedades farmacológicas semelhantes à betulina, como antitumoral em células do melanoma humano (MEL – 2), carcinoma

epidermóide humano (KB) (DARRICK *et al.*, 1998), tendo como mecanismo de ação da indução seletiva da apoptose em células tumorais através do aumento do influxo de íons cálcio para o meio intracelular e liberação de fatores apoptogênicos (CHOU *et al.*, 2000). Também possui atividade antiinflamatória, é um potente inibidor da fosfolipase A-2 (BERNARD *et al.*, 2001), possui propriedades antivirais contra HIV (SUN *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2001) e possui atividade antimalárica (CHOU *et al.*, 2000).

O efeito atribuído ao uso de *Zollernia ilicifolia* como “espinheira-santa” pode explicar-se em alguns aspectos devido à presença de betulina e ácido betulínico. São atribuídas a *M. ilicifolia* propriedades antitumorais, comentadas anteriormente, e como descrito acima, vários estudos comprovam a ação antitumoral da betulina. Quanto ao uso como antiulcerogênica, a melhora dos sintomas poderia estar relacionado com a atividade bacteriostática da betulina, que poderia contribuir no controle do crescimento bacteriano no meio estomacal (*Helicobacter pylori*), um dos fatores desencadeantes do processo ulcerogênico (RANG *et al.*, 1997), e suas propriedades antiinflamatórias, através da inibição da fosfolipase A-2, responsável pela produção de prostaglandinas (RANG *et al.*, 1997).

Vários métodos foram relatados para seu isolamento e detecção, entre eles a cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e cromatografia contracorrente gota-a-gota. É uma substância estável do ponto de vista térmico e seus grupos hidroxila demonstram baixa reatividade (HAYEK *et al.*, 1989).

Figura 22. Distribuição da betulina das angiospermas.

Os pontos indicam número de espécies onde a betulina está presente. B) A ocorrência de betulina está quantitativa qualitativamente concentrada nesta ordem (Fagales). C) Muitos estudos depreendem a betulina no gênero *Diospyros*, onde já foi identificada em 57 espécies. (Fonte: HAYEK *et al.*, 1989).

Figura 23. Distribuição da betulina nas angiospermas

-  Encontrada em todas as famílias.
-  Encontrada em menos de 20 % das famílias
-  Encontrada em mais de 50 % das famílias.
-  Não há relatos sobre a sua ocorrência.
-  Encontrada em 20 – 49 % das famílias.

(Fonte: HAYEK *et al.*, 1989).

4.4. Monitoramento sazonal

4.4.1. Verificação dos marcadores nos extratos de *Zollernia ilicifolia*

Após a caracterização de ZI2 como marcador químico de *Zollernia ilicifolia* (figuras 24 e 25), esta substância foi tomada como referência para o monitoramento sazonal da espécie. Com boas características de visualização cromatográfica no extrato bruto, ela mostrou-se conveniente aos objetivos do trabalho de diferenciação em relação à *Maytenus ilicifolia* e à sua outra espécie adulterante, *Sorocea bonplandii*.

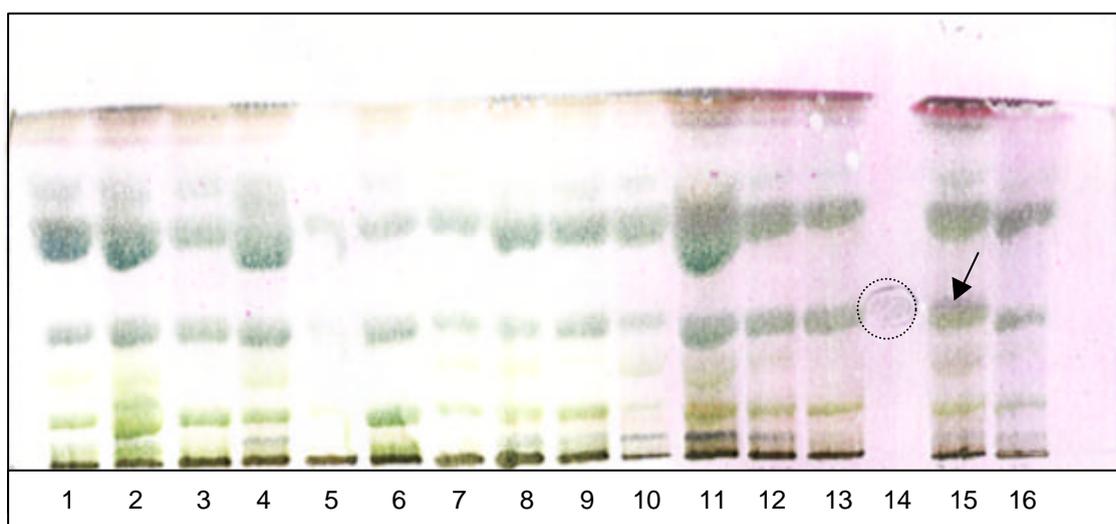


Figura 24. Análise cromatográfica comparativa entre *Sorocea bonplandii* e *Zollernia ilicifolia*. Eluente: EP/AcOEt (9:1). Revelador: Timol sulfúrico.

1. Extrato de *S. bonplandii* MS 03/00. 2. MS 04/00. 3. MS 05/00. 4. MS 06/00. 5. MS 07/00. 6. MS 08/00. 7. 09/00. 8. 10/00. 9. 11/00. 10. 12/00. 11. 01/01. 12. 02/01. 13. 03/01. 14. Betulina. 15. Extrato CH₂Cl₂ de *Z. ilicifolia* –em destaque: betulina. 16. Extrato CH₂Cl₂ de *M. ilicifolia*

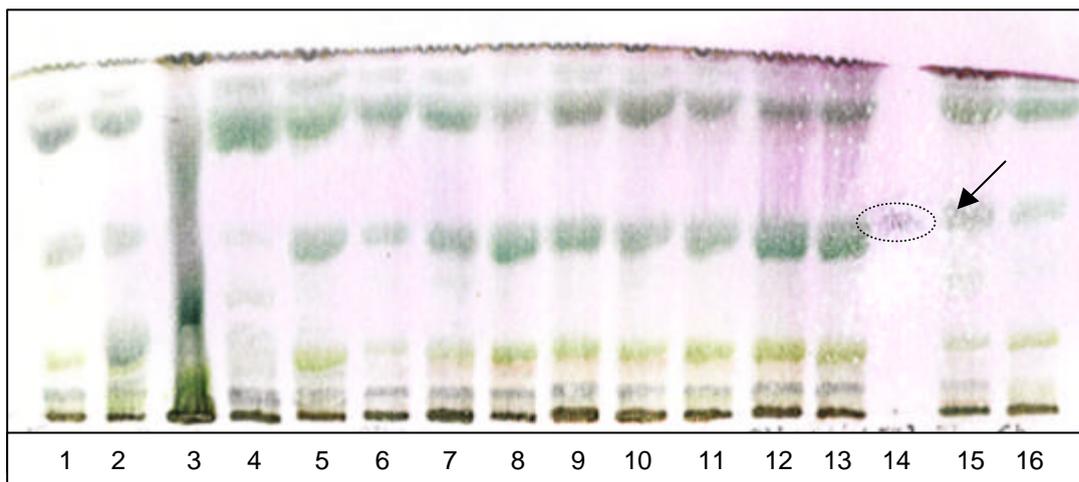


Figura 25. Análise cromatográfica comparativa entre *Maytenus ilicifolia* e *Zollernia ilicifolia*. Eluente: EP/ AcOEt (9:1). Revelador: timol-sulfúrico. 1. Extrato de *M. ilicifolia* MS 03/00. 2. MS 04/00. 3. MS 05/00. 4. MS 06/00. 5. MS 07/00. 6. MS 08/00. 7. 09/00. 8. 10/00. 9. 11/00. 10. 12/00. 11. 01/01. 12. 02/01. 13. 03/01. 14. Betulina (ZI2). 15. Extrato CH₂Cl₂ de *Z. ilicifolia* – em destaque: betulina. 16. Extrato CH₂Cl₂ de *Sorocea bonplandii*

Ao analisar as figuras anteriores, percebe-se que a betulina (ou ZI2), está presente apenas nos extratos de *Zollernia ilicifolia*, não estando, durante os meses de monitoramento, presentes nos extratos de *Sorocea bonplandii* (figura 24) e *Maytenus ilicifolia* (figura 25).

Após a análise cromatográfica dos extratos de MS, verificou-se que ZI2 estava presente em *Zollernia ilicifolia* durante todo o ano, sugerindo a validade da sua utilização como marcador em qualquer época de coleta do material vegetal (figura 26). De acordo com a intensidade de sua coloração nos cromatogramas dos extratos, os extratos 3 (maio/ 2000) e 11 (janeiro/ 2001) foram já na análise visual os meses em que a presença de ZI2 se mostra mais marcante.

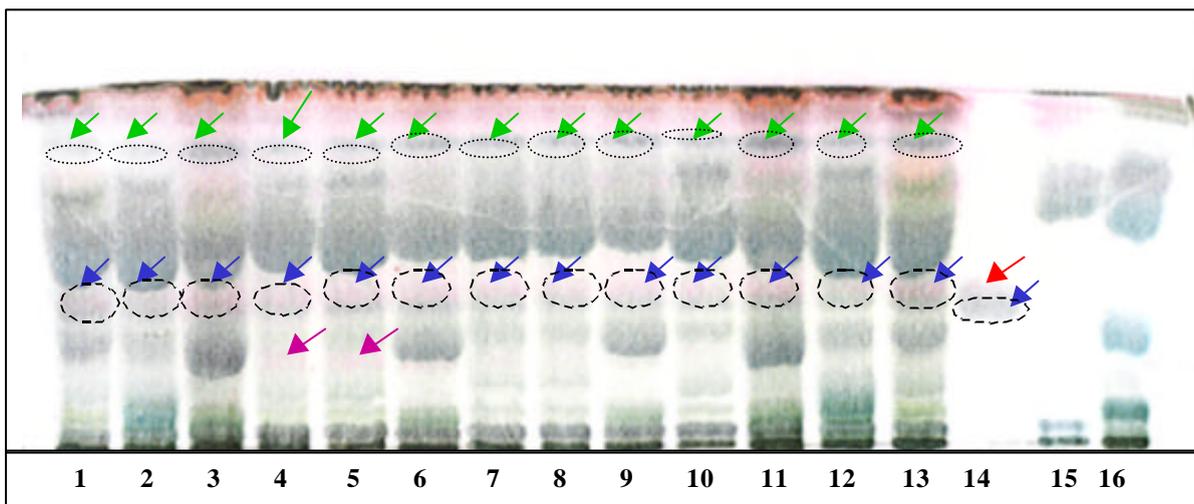


Figura 26. Monitoramento sazonal de *Zollernia ilicifolia*.

Eluente: EP/AcOEt 85/15. Revelador: timol-sulfúrico.

1. Extrato MS 03/00. 2. MS 04/00. 3. MS 05/00. 4. MS 06/00. 5. MS 07/00. 6. MS 08/00. 7. 09/00. 8. 10/00. 9. 11/00. 10. 12/00. 11. 01/01. 12. 02/01. 13. 03/01. 14. ZI 2. 15. Extrato CH_2Cl_2 de *M. ilicifolia*. 16. Extrato CH_2Cl_2 de *S. bonplandii*. Em destaque:  (Rf = 0,4) ZI2 (betulina);  (Rf = 0,83) ZI1;  ZI3;  ácido betulínico.

4.4.2. Análise densitométrica dos extratos MS de *Zollernia ilicifolia*

Após a análise densitométrica em *software* Scion Image[®], teve-se a confirmação de que os extratos que apresentavam maior teor de ZI2, expresso em área e densidade da mancha, foram os dos meses de maio de 2000 e janeiro de 2001, correspondentes aos extratos 3 e 11, respectivamente (figura 27).

Através dos dados obtidos, foi realizada a seguinte análise: o extrato que apresentou maior quantidade de ZI2 (maio/2000), segundo a análise densitométrica foi considerado 100 % em termos desta substância. Aos outros extratos, foi atribuído um valor em porcentagem, proporcional à sua concentração de ZI2 em relação ao extrato de maio de 2000 (100 %).

Tabela 7. Relação entre % de rendimento em extrato seco e intensidade de Z12 na análise densitométrica.

Mês de coleta	Quantidade de material de partida (g)	Rendimento do extrato seco (%)	% de Z12 na análise densitométrica
Março/ 2000	5,2352	3,63	82,62
Abril/ 2000	5,0596	3,81	57,20
Mai/ 2000	5,2980	7,82	100,00
Junho/ 2000	5,0335	3,75	60,90
Julho/ 2000	5,4372	3,44	63,74
Agosto/ 2000	5,1562	4,62	72,95
Setembro/ 2000	5,1109	3,65	75,65
Outubro/ 2000	5,0216	2,79	55,57
Novembro/ 2000	5,1628	4,80	61,16
Dezembro/ 2000	5,0989	3,37	50,78
Janeiro/ 2001	5,1542	7,06	96,67
Fevereiro/ 2001	5,1882	2,86	60,52
Março/ 2001	5,1176	3,38	76,84

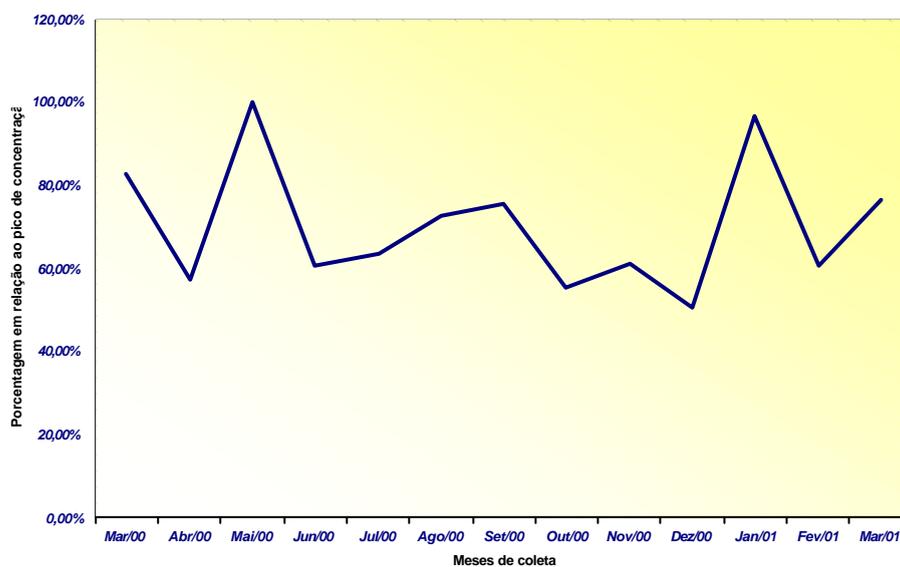


Figura 27. Perfil da “concentração aparente” de Z12 nos extratos diclorometânicos de *Zollernia ilicifolia* no período de 03/00 a 03/01

O gráfico obtido não expressa a concentração exata de ZI2 nos extratos, mas determina, nos extratos das amostras coletadas ao longo do ano 2000/2001, seu rendimento aparente comparado com os outros extratos.

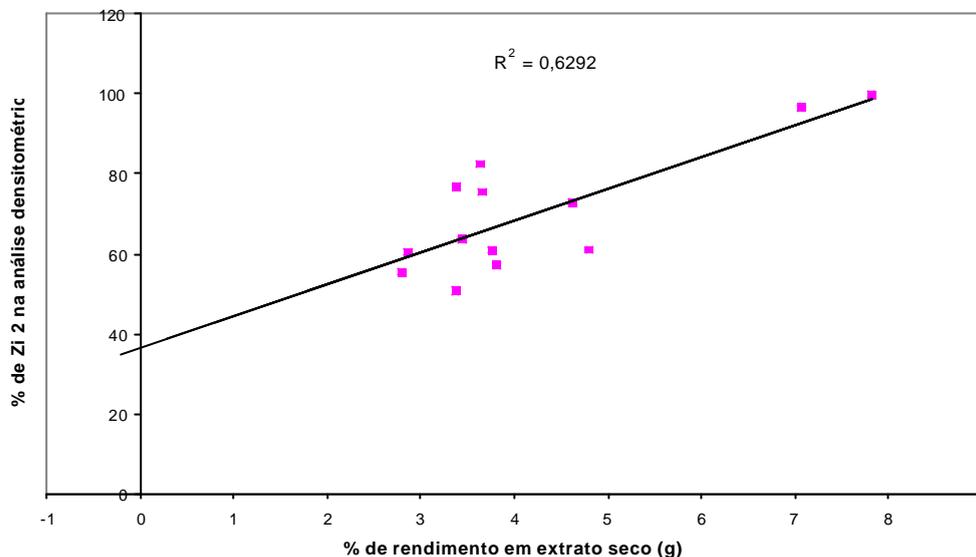


Figura 28. Relação entre rendimento de extrato seco e % de ZI2 na análise densitométrica.

Observando-se a tabela 7, verifica-se que há alguma relação entre os rendimentos dos extratos secos e a intensidade da mancha captada na análise densitométrica. Assim, os meses de maio/2000 e janeiro/2001, que obtiveram maiores rendimentos em extrato seco, também demonstraram as maiores “concentrações aparentes” de ZI2 em relação aos demais extratos.

Porém esta relação não tem um comportamento linear (figura 28), pois é visto que os extratos de alguns meses, como por exemplo, março/2000 e abril/2000, que apresentam diferentes concentrações aparentes de ZI2 não mantêm sua proporção em relação ao rendimento de extrato seco. O gráfico obtido da relação entre produção de extrato seco e concentração aparente de ZI2 na análise densitométrica mostra uma grande dispersão entre os valores, um coeficiente de correlação ($r^2 = 0,6292$) distante do valor ideal, indicando que esta relação não mantém sua linearidade. Diferentes fatores podem estar envolvidos nesta variação de rendimento de extrato e produção da substância. Alguns exemplos podem ser a eficiência da extração, diferenças no metabolismo, condições ambientais, etc. Estes resultados mostram-se ainda

preliminares, sendo necessários estudos complementares, como determinação do teor de umidade, cinzas totais, e outras características que poderiam acarretar variação ao rendimento do extrato seco, em peso.

A importância do estudo da sazonalidade justifica-se pelo fato de que diferentes fatores podem ter influência direta sobre o metabolismo vegetal, dentre eles as necessidades biossintéticas e o ambiente (RHODES, 1994). Uma vez que o ambiente não se mantém estático, em relação a fatores como temperatura, umidade, iluminação, este conjunto de fatores terá influência sobre o perfil de substâncias produzidas pela planta. Muitos metabólitos secundários exercem ainda funções de defesa e proteção (HARBORNE, 1988), promovendo alterações no metabolismo da planta e levando à produção de novas substâncias em situações de estresse (TREASE e EVANS, 1983). Pelo fato de que os vegetais estão sobretudo enraizados no solo, não dispendo capacidade de locomoção e defesa dos animais, sua resposta ao meio ambiente necessita de estratégias por outras vias, como por exemplo, a diversidade química (HARBORNE, 1988).

Estudos anteriores realizados com *Maytenus aquifolium* durante 2 anos e três meses demonstraram que compostos como flavonóides e triterpenos variavam sua concentração ao longo do ano. A concentração dos flavonóides se mostrava maior na primavera, enquanto os triterpenos obtiveram sua maior concentração durante o inverno, demonstrando uma relação inversa entre a presença de flavonóides e triterpenos na mesma espécie vegetal (VILEGAS *et al.*, 1998b).

O presente trabalho de monitoramento sazonal pretendeu determinar apenas a validade da substância escolhida, Z12, como marcador fitoquímico. Para uma avaliação mais aprofundada da variação de sua concentração ao longo do ano seria necessário um estudo mais detalhado, com maior número de amostras, em diversas condições, incluindo espécimes de diferentes locais, diferentes temperaturas, sujeitos às mais diversas condições ambientais.

Embora as causas das diferenças constatadas na amostra estudada não possam ser devidamente esclarecidas, um dado relevante é o fato de que, mesmo em meses em que o rendimento de extrato seco se mostra reduzido à mais da metade (outubro/2000 -fevereiro/2001), a concentração de Z12 ainda se mantém relativamente alta, em níveis superiores a 50% em relação ao extrato que foi chamado “100 %”, ou seja, Z12 mantém-se como uma substância de fácil detecção no extrato bruto ao longo do ano.

4.4.3. Análise dos marcadores nos extratos de *Maytenus ilicifolia*

A análise dos extratos MS de *Maytenus ilicifolia* também demonstrou que os marcadores propostos na literatura estavam presentes em todos os meses de coleta. Os marcadores observados em *Maytenus ilicifolia* (friedelina e friedelanol) já foram validados anteriormente, mostrando sua utilidade no controle de qualidade de fitoterápicos à base de espinheira-santa verdadeira através de diversas metodologias (VILEGAS *et al.*, 1994). Entretanto, na literatura consultada não encontramos dados sobre o monitoramento sazonal destas substâncias, determinando seu perfil de variação nos extratos ao longo do ano.

A análise da intensidade de cores das manchas correspondentes a friedelina e friedelanol sugeriu que estas substâncias variam durante os meses de coleta (figura 29). Na análise visual, os extratos correspondentes a março/2000, janeiro/2001 e março/2001 apresentaram maior intensidade de cor, sugerindo que o pico de produção destas substâncias tende a concentrar-se no verão.

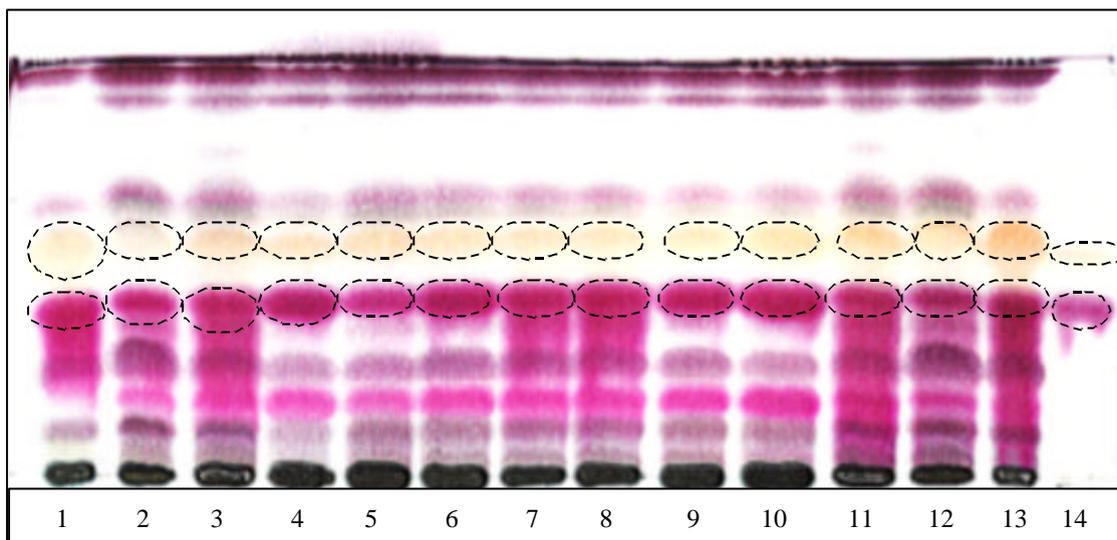


Figura 29. Monitoramento sazonal de *Maytenus ilicifolia*.

Eluente: EP/CH₂Cl₂ (3:1). Revelador: anisaldeído-sulfúrico.

1. Extrato MS 03/00. 2. MS 04/00. 3. MS 05/00. 4. MS 06/00. 5. MS 07/00. 6. MS 08/00. 7. 09/00. 8. 10/00. 9. 11/00. 10. 12/00. 11. 01/01. 12. 02/01. 13. 03/01. 14. Friedelanol e friedelina. Em destaque -----, **amarela**= friedelina, **violeta**= friedelanol.

4.5. Análise de fitoterápicos à base de espinheira-santa (*M. ilicifolia*)

Num estudo preliminar de nosso grupo de trabalho, já haviam sido analisadas sete marcas de fitoterápicos supostamente à base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) através de CCD, utilizando friedelina e friedelanol como marcadores. Foram encontradas quatro amostras onde estas substâncias não foram detectadas, sugerindo que as amostras em questão não conteriam *Maytenus* sp. (FALKENBERG e SOUZA, 1998). No âmbito dessa dissertação, outras dez amostras comerciais foram analisadas quanto à presença de *Maytenus ilicifolia*, *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*, conforme resultados apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Análise cromatográfica de fitoterápicos à base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*).

Marca	Forma farmacêutica	Preparação do extrato	Presença de <i>Maytenus</i> sp.	Presença de <i>Zollernia ilicifolia</i>	Presença de <i>Sorocea bonplandii</i>
1	Chá	Extração por 24 hs com CHCl ₂ (1:20)	Sim	Não	Sim
2	Cápsulas	Idem	Sim	Não	Não
3	Chá	Idem	Sim	Sim	Não
4	Cápsulas	Idem	Não	Não	Sim
5	Cápsulas	Idem	Não	Não	Sim
6	Tintura	Lavagem com 3x de CHCl ₂ (1: 1,5) e tintura original	Não	Sim	Sim
7	Chá	Extração por 24 hs com CHCl ₂ (1:20)	Não	Não	Sim
8	Tintura	Lavagem com 3x de CHCl ₂ (1: 1,5) e tintura original	Não	Sim	Não
9	Chá	Extração por 24 hs com CHCl ₂ (1:20)	Sim	Não	Não
10	Chá	Extração por 24 hs com CHCl ₂ (1:20)	Sim	Não	Sim

Em destaque: duas amostras que apresentaram somente os marcadores de *Maytenus* sp.

Em cinco das dez amostras comerciais analisadas foram detectados friedelina e friedelanol (1, 2, 3, 9 e 10), indicando a presença de *Maytenus* sp.; uma destas apresentou também ZI2 (3), marcador de *Zollernia ilicifolia* e outras duas, os de *Sorocea bonplandii* (1 e 10).

Das cinco amostras que não apresentaram friedelina e friedelanol (4, 5, 6, 7 e 8), três apresentaram apenas os marcadores de *Sorocea bonplandii* (4, 5 e 7), uma apresentou apenas os marcadores de *Zollernia ilicifolia* (8) e outra amostra apresentou tanto os marcadores de *Z. ilicifolia*, quanto os de *S. bonplandii* (6). Assim, de um total de dez amostras analisadas, só duas apresentaram apenas os marcadores de *Maytenus*, excluindo a possibilidade de contaminação com as duas espécies de adulterantes investigadas.

A presença de *Maytenus ilicifolia* foi verificada através da detecção de seus marcadores, friedelina e friedelanol. Nas análises realizadas no decorrer deste trabalho, estas substâncias não foram detectadas em *Zollernia ilicifolia*, confirmando que os marcadores propostos podem ser usados na diferenciação de *Maytenus* sp. e *Zollernia ilicifolia*. Em análises químicas de extratos hexânicos de *Sorocea bonplandii* foi relatada a ausência desses triterpenos possibilitando também sua aplicação no controle de qualidade de *Maytenus* e *Sorocea* (ANDRADE e VILEGAS, 1998). As análises por CCD realizadas com extratos diclorometânicos de *Sorocea bonplandii* demonstraram que estes também não possuíam friedelina e friedelanol em quantidades detectáveis (ALBERTON, 2000a).

A presença de *Sorocea bonplandii* foi detectada através dos marcadores anteriormente descritos (ALBERTON, 2000a) e a presença de *Zollernia ilicifolia*, através da detecção de ZI2, substância proposta neste trabalho como marcadora para esta espécie. Os resultados desta análise com amostras comerciais reforçam o potencial de utilização do marcador proposto para *Zollernia ilicifolia*, ZI2, no controle de qualidade de fitoterápicos à base de espinheira-santa.

Através das análises pode-se perceber que a presença de *Sorocea bonplandii* é mais freqüente (6 amostras) em relação à presença de *Zollernia ilicifolia* (3 amostras). Este fato pode ser devido, ao menos em parte, ao local de produção

destes fitoterápicos, já que a maioria das amostras adquiridas provém da região Sudeste do país.

O Vale do Ribeira, localizado no interior do estado de São Paulo, é um pólo extrativista de plantas medicinais, local de procedência de matéria-prima vegetal inclusive para a indústria. Várias famílias locais utilizam a atividade de exploração de matéria-prima vegetal como fonte de subsistência. Em entrevista com moradores da região, grande parte cita a espécie *Sorocea bonplandii* como sendo espinheira-santa (FRUEHAUF, 2000). Desta forma, não é tão surpreendente que esta espécie esteja presente em 60 % dos fitoterápicos por nós analisados.

Maytenus ilicifolia, encontrada mais freqüentemente na região Sul do país, é facilmente confundida e substituída por espécies morfológicamente semelhantes, pois os coletadores não se baseiam em literatura científica para realizar a coleta. A espécie *Zollernia ilicifolia* também foi citada entre os moradores do Vale do Ribeira como sendo espinheira-santa. Portanto, sua presença em amostras comerciais à base de espinheira-santa também é esperada (FRUEHAUF, 2000).

Com o crescimento do interesse da população pela terapia com plantas medicinais, várias empresas têm se inserido no mercado; entretanto, a farmacovigilância realizada pelas autoridades de saúde é ainda bastante deficiente no Brasil, pois não se dispõe de laboratórios estatais com pessoal e equipamentos necessários para atender a demanda de laboratórios produtores de medicamentos (BRANDÃO *et al.*, 1998). Este fato acaba facilitando a inserção de fitoterápicos de baixa qualidade no mercado.

Os resultados obtidos nesta análise mostram também como a CCD, um método rápido e eficaz, além de possuir custos reduzidos pode ser realmente útil na avaliação da qualidade e pureza tanto de matérias-primas vegetais, como de fitoterápicos (FARIAS, 2001). Esta metodologia tem sido cada vez mais utilizada, a exemplo de vários trabalhos publicados, procurando sempre marcadores para garantir a autenticidade ou detectar prováveis impurezas presentes em fitoterápicos (VILEGAS *et al.*, 1994; VILEGAS e LANÇAS, 1997; BRANDÃO, 1998; FALKENBERG e SOUZA, 1998; ALBERTON, 2000b).

Uma alternativa para a contribuição ao controle de fitoterápicos é a união entre recursos humanos qualificados presentes em institutos e universidades e órgãos da saúde. Muitos trabalhos científicos são desenvolvidos de modo a inspecionar medicamentos comercializados em diversas regiões do país, a exemplo de BATISTIC e colaboradores (1989), que analisaram 96 amostras de chás de 11 espécies diferentes, entre elas *Pimpinella anisum*, *Melissa officinalis*, *Peumus boldus*, *Mentha* sp.; VILEGAS e colaboradores (1997), analisando fitoterápicos à base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) comercializados em São Paulo e Paraná; BRANDÃO e colaboradores (1998), os quais analisaram fitoterápicos à base de camomila (*Matricaria recutita*) em Minas Gerais; FALKENBERG e SOUZA (1998) e ALBERTON e colaboradores (2000b), que analisaram fitoterápicos à base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) comercializados em Florianópolis (SC), e muitos outros.

Entretanto, novos estudos devem ainda ser desenvolvidos, com vistas à elaboração de protocolos de análise e descrição de novos marcadores para as inúmeras espécies medicinais, principalmente as nativas, que carecem de monografias farmacopéicas. A legislação sobre fitoterápicos, relativamente nova no Brasil, deixa ainda muitos pontos a desejar, necessitando de adequações no que diz respeito a questão da produção e controle de qualidade de fitoterápicos (MARQUES e PETROVICK, 2001).

5. CONCLUSÕES

- Através da análise cromatográfica dos extratos de *M. ilicifolia*, *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia*, foram identificados para esta última três potenciais marcadores, ZI1, ZI2 e ZI3.
- Um destes marcadores, ZI2, foi isolado e teve sua estrutura elucidada por métodos espectroscópicos como sendo o triterpeno betulina;
- Pela análise cromatográfica em extratos de *Zollernia ilicifolia* também foi possível identificar a presença de ácido betulínico, que apresenta comportamento cromatográfico semelhante ao da betulina, sendo detectado em conjunto com a mesma;
- No monitoramento sazonal, ZI1 e ZI2 foram identificados nos extratos de *Z. ilicifolia*, mas não foram identificados nos extratos de *Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* analisados;
- Friedelina e friedelanol, marcadores de *Maytenus* sp. propostos por outros autores, também foram detectados ao longo do ano nos extratos MS de *M. ilicifolia*;
- A detecção de ZI2 nas análises de amostras comerciais à base de espinheira-santa contribuiu para a sua validação como marcadora de *Z. ilicifolia* no controle de qualidade de fitoterápicos;
- Os fitoterápicos encontrados no mercado supostamente à base de *M. ilicifolia* encontram-se associados à *S. bonplandii* e/ou *Z. ilicifolia*, evidenciando a falta de cuidados de muitos laboratórios no que diz ao controle de qualidade da matéria-prima vegetal.

- AHMED, M.S.; FONG, H.H.S.; SOEJARTO, D.D.; DOBBERSTEIN, R.H.; WALLER, D.P.; MORENO-AZORERO, R. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography*, v. 213, p. 340 – 344, 1981.
- ALBERTON, M.D.; FALKENBERG, M.B.; FALKENBERG, D.B.; MEDEIROS, J.D. Controle microscópico de qualidade de *Espinheira-santa* (*Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss). In: Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 4, 1999, Ribeirão Preto -SP. *Resumos*. Ribeirão Preto, 1999, p. 101, ref. 8.20.
- ALBERTON, M.D.; FALKENBERG, D.B.; FALKENBERG, M.B.; SOUZA, E.S. Identificação de marcadores cromatográficos de *Zollernia ilicifolia* e *Sorocea bonplandii* para o controle de qualidade de espinheira-santa. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 16, 2000, Recife -PE. *Resumos*. Recife, 2000a, p. 177, ref. FG 045.
- ALBERTON, M.D.; FALKENBERG, D.B.; FALKENBERG, M.B. Análise cromatográfica de fitoterápicos à base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 16, 2000, Recife -PE. *Resumos*. Recife, 2000b, p. 177, ref. FG 046.
- ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. *Plantas da medicina popular: atlas farmacognóstico*. Canoas: ULBRA, 1995. p. 117.
- ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W. Constituintes de *Sorocea bomplandii* Baillon. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 19, n. 1, 129 – 139, 1998.
- BATISTIC, M.A. ; AURICCHIO, M. T.; HOPPEN, V.R.; YAMASHITA, I.Y. Verificação da qualidade de chás medicinais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 49, n. 1, p. 45 – 49, 1989.
- BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHON, J.Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery:

application to phospholipase A₂ inhibitors. *Phytochemistry*, v. 58, p.865 – 874, 2001.

BERNARDI, H.H.; WASISCKY, M. *Algumas pesquisas sobre a 'espinheira-santa' ou 'cancerosa' Maytenus ilicifolia Martius, usada como remédio popular no Rio Grande do Sul*. Santa Maria: UFRGS – Centro de Pesquisas Bioquímicas da Faculdade de Farmácia e de Medicina de Santa Maria, 1959.

BERNARDI, H.H.; WASISCKY, M. A propósito da existência de cafeína no *Maytenus ilicifolia* Martius. *Tribuna Farmacêutica*, n. 2, p. 38 - 39, 1963.

BOSSOLANI, M.P.; TORRES, L.M.B.; GONÇALO, M.C.; LAPRA, A .J.; SOUCCAR, C. Mecanismos envolvidos na atividade antissecretora ácida gástrica de frações semi-purificadas de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa). In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia –SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998, p. 97, ref. 01.225.

BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N.; SOARES, C.D.V. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais: verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. *Cadernos de Saúde Pública*, v.14, n. 3, p. 613 – 616, 1998.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n.2, p. 179- 189, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, n.71, p.58 – 65, 2000.

CARLINI, E.A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido no abafado de *Maytenus* sp (Espinheira-santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E.A. (coord.). *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia "espinheira-santa" e outras)*. Brasília: CEME/AFIP, p. 21 –36, 1998.

- CARLINI, E.A.; FROCHTENGARTEN, M.L. Toxicologia pré-clínica da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E.A. (coord.). *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia "espinheira-santa" e outras)*. Brasília: CEME/AFIP, p. 67 – 74, 1998.
- CARVALHO-OKANO, R.M. *Estudos taxonômicos do gênero Maytenus Mol. Emend. Mol (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico*. Campinas: Instituto de Biologia da UNICAMP, 1992. Dissertação de doutorado.
- CHOU, K.J.; FANG, H.C.; CHUNG, H.M.; CHENG, J.S.; LEE, K.C.; TSENG, L.L.; TANG, K.Y.; JAN, C.R. Effect of betulinic acid on intracellular-free Ca^{2+} levels in Madin Darby canine kidney cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 408, p. 99 – 106, 2000.
- COLL, J.C.; BOWDEN, B.F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, v. 49, n. 5, p. 934 – 936, 1986.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. *Introdução a métodos cromatográficos*. 3ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1988.
- COUTO, L.B.; BARBOSA, R.G.; PEREIRA, A M.S.; DUARTE, I.B.; JANUÁRIO, A .H.; BIONDO, R.; FRANÇA, R.; FRANÇA, S.C. Estudos comparativos da atividade antiulcerogênica de extratos de calos e folhas de *Maytenus* e da mistura friedelan-3-ol/friedelina. In: *Jornada Paulista de Plantas Mediciniais*, 4, 1999, Ribeirão Preto – SP. *Resumos*. Ribeirão Preto, 1999, p. 120, ref. 9.35.
- CRAGG, G.C.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v.60, p. 52-60, 1997.
- DAHLGREN, G. On Dahlgrenograms - a system for the classification of angiosperms and its use in mapping characters. *An. Acad. Bras. Ciências*, v. 65, suppl. 3, p. 383 – 404, 1995.

- DALLA TORRE, E.A.; MESIA, S.; MORI, S.; BOSSOLANI, M.P.; LIMA LANDMAN, M.T.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C. Efeito dos extratos aquosos de *Maytenus ilicifolia* Mart. e *Scoparia dulcis* L. na lesão gástrica crônica. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia – SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998, p. 98, ref. 01.229.
- DARRICK, S.H.L.; PEZZUTO, J.M.; PISHA, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorganic and Medicinal Letters*, v. 8, p. 1707 – 1712, 1998.
- DI STASI, L.C.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; GONZALEZ, F.G. *Estudo farmacológico comparativo de adulterantes da Espinheira-santa: Maytenus aquifolium M., Sorocea bonplandii (Baill.) B.L.B. e Zollernia ilicifolia Vog.* In: Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, 4, 1999, Ribeirão Preto – SP. *Resumos*. Ribeirão Preto, 1999, p. 107, ref. 9.09.
- ESAKI, N.; KATO, M.; TAKIZAWA, N.; MORIMOTO, S.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* ramus, IV. Effects of condensed tannin-related compounds on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. *Planta Medica*, v. 51, n. 1, p. 34 – 38, 1985.
- FALKENBERG, M.B.; SOUZA, E. Controle cromatográfico de fitoterápicos à base de espinheira-santa verdadeira (*Maytenus ilicifolia* Mart). In: Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, 5, 1998, Florianópolis – SC. *Resumos*. Florianópolis, 1998, p. 7, ref. A1 – 2.
- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da Universidade, 2001.
- FERRARI, F.; BOTTA, B.; LIMA, R.A. Flavonoids and isoflavonoids from *Zollernia paraensis*. *Phytochemistry*, v. 22, n. 7, p. 1663 – 1664, 1983.

- FERRARI, F.; BOTTA, B.; LIMA, R.A.; MARINI BETTOLO, G.B. 7'-2'-4'- Trihydroxy-3'- methoxyisoflavone *Zollernia paraensis*. *Phytochemistry*, v. 23, n. 3, p. 708 – 709, 1984a.
- FERRARI, F.; BOTTA, B.; LIMA, R.A.; MARINI BETTOLO, G.B. 2-4-2' Trihydroxy- 4'- methoxybenzyl *Zollernia paraensis*. *Phytochemistry*, v. 23, n. 11, p. 2691 – 2692, 1984b.
- FERREIRA, P.M.; OLIVEIRA, C.N.; ZHAO-HUA, W.; OLIVEIRA, A .B.; VIEIRA, M.A.R. Envolvimento da histamina no mecanismo de ação do extrato bruto das folhas de *M. ilicifolia* (espinheira-santa) sobre a secreção gástrica de ácido. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 14, 1996, Florianópolis. *Resumos*. Florianópolis, 1996, p. 106, ref F- 094.
- FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Espinheira santa: o estudo à viabilização de um fitoterápico brasileiro contra úlcera gástrica. *Racine*, v. VII, n. 40, p. 67 – 69, 1997.
- FREIRE, R.M. *Levantamento das plantas de uso medicinal nas comunidades do Canto dos Araçás e Costa da Lagoa, Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, SC*. Florianópolis: Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFSC, 1996. Trabalho de Conclusão de Curso.
- FRUEHAUF, S.P. *Plantas medicinais de mata atlântica: manejo sustentado e amostragem*. São Paulo: Annablume/FAPESP, 2000.
- FURLAN, M. *Estudo químico de Maytenus evonymoides Reiss*. São Paulo: Instituto de Química do Universidade de São Paulo, 1985. Dissertação de mestrado.
- GEOCZE, S.; VILELA, M.P.; CHAVES, B.D.R.; FERRARI, A.P. Tratamento de pacientes portadores de dispepsia alta ou de úlcera péptica com preparações de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E.A. (coord.) *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia "espinheira-santa" e outras)* Brasília: CEME/AFIP, p. 75 – 87, 1988.

GONZÁLEZ, A.; AMARO, J.A.; GUTIÉRREZ, J. Triterpenoides de *Maytenus octogona*. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 17, n. 1 – 2, p. 56 – 58, 1986.

GONZALEZ, F.G.; PORTELA, T.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 77, p. 41 – 47, 2001.

GUPTA, M.P.(Ed.) *270 Plantas medicinales iberoamericanas*. Panama: CYTED, 1996.

GUSMÃO, D.S.; LEMOS, V.P.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, F.J. A. Plant extracts induce structural modifications and protein synthesis in peritrophic matrix of *Aedes aegypti* larvae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, supl. II, p. 262, 1999.

HARBORNE, J.B. *Introduction to ecological biochemistry*. 3ed. London: Academic Press, 1988.

HAYEK, E.W.H.; JORDIS, U.; MOCHE, W.; SAUTER, F. A bicentennial of betulin. *Phytochemistry*, v. 28, n. 9, p. 2229 – 2242, 1989.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEIJER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. *Phytochemistry*, v. 34, n. 1, p. 3 – 16, 1993.

HOEHNE, F.C. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, 1939.

HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. London: Chapman & Hall, 1998.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *Tetrahedron Letters*, v. 31, n. 47, p. 6881 – 6882, 1990.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, v.30, n. 11, p. 3713 – 3716, 1991.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; ICHITSUKA, K.; MORITA, H.; TAKEYA, K. Oligo-nicotinated sesquiterpenes polyesters from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 56, n. 9, p. 1479 – 1485, 1993.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K. Cangorosins F-J, five additional oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 4, p. 460 – 470, 1994.

KASHIWADA, Y.; CHIYO, J.; IKESHIRO, Y.; NAGAO, T.; OKABE, H.; COSENTINO, L. M.; FOWKE, K.; LEE, K.H. 3,28- Di-*o*- (dimethylsuccinyl) – betulin isomers as anti-HIV agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, p. 183 – 185, 2000.

MACAUBAS, C.I.P.; OLIVEIRA, M.G.M.; FORMIGONI, M.L.O.S.; SILVEIRA F.º, N.G.; CARLINI, E.A. Estudo da ação antiúlcera gástrica do bálsamo (*Sedum* sp.), folha-da-fortuna (*Bryophyllum calycinum*), couve (*Brassica oleracea*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: CARLINI, E.A. (coord.). *Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia “espinheira-santa” e outras)*. Brasília: CEME/AFIP, p.5 – 20, 1988.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517 – 1575, 1994.

MANDICH, L.; BITTENER, M.; SILVA, M.; BARROS, C. Phytochemical screening of medicinal plants studies of flavonoids. *Revista Latino Americana de Química*, v. 15, n. 2, p. 80 – 82, 1984.

- MANSANO, V.F.; TOZZI, A.M.G. The taxonomy of some Swartzieae (Leguminosae subfam. Papilionoideae) from southeastern Brazil. *Brittonia*, v. 51, n. 2, p. 149 – 158, 1999.
- MARQUES, L.C.; PETROVICK, P.R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da Universidade, 2001.
- MARTINS, A .G. *Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss*. Porto Alegre: UFRGS. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1998. Dissertação de Mestrado.
- MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Propriedades antioxidantes (lipoperoxidação) de *Pfaffia paniculata*, *Heteropteris aphrodisiaca* e *Maytenus ilicifolia*. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia – SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998, p. 54, ref. 01.045.
- MELÉNDEZ SALAZAR, G.D.C.; SILVA, G.D.F.; SOUZA, J.R. Chemical constituents from bark wood and leaves of *Maytenus floribunda* (Reiss). *Acta Hort.*, v. 501, p. 205-209, 1999.
- MERCK, E. *Deying reagents for thin layer and paper chromatography*. Germany, 1971.
- MONTANARI, T.; CARVALHO, J.E.; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss on spermatogenesis. *Contraception*, v. 57, p. 335 – 339, 1998.
- NAKAMURA, M.; NAKASUMI, T.; MINAGAWA, Y.; YOSHIZAWA, T. CA 125: 123692j. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 08,133,981 [96,133,981] (Cl. A61K35/78), 28 May 1996, Appl. 94/295,546, 4 Nov 1997.

- NAKAMURA, M.; NAKASUMI, T.; K. CA 127: 70825n. YOSHIZAWA, T.; MINAGAWA, Y.; NAKAGAWA. Pat. Appl. EP 776,667 (Cl. A61K35/78), 4 Jun 1997, JP Appl. 95/336,104, 30 Nov 1996.
- NEGRELLE, R.R.B.; DONI, M.E. Biologia floral e produção de sementes de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* (Mart.) Ex Reiss.). In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia –SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998, p. 102, ref. 02.004.
- NETTLETON JR., D.E.; BALITZ, D.M.; BROWN, M.; MOSELEY, J.E.; MYLLYMAKI, R.W. Large scale isolation of maytansine and other maytansinoids from the seeds of *Maytenus rothiana* using preparative LC. *Journal of Natural Products*, v. 44, n. 3, p. 340 – 347, 1981.
- NIERO, R.; MOSER, R.; BUSATO, A.C.B.; YUNES, R. REIS, A.; CECHINEL FILHO, V. A comparative chemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss and *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae). *Z. Naturforsch*, 56c, p. 158 – 161, 2001.
- NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da Universidade, 2001.
- OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry*, v. 20, p. 121 – 126, 1981.
- OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.A. Efeitos farmacológicos da administração aguda da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). In: CARLINI, E.A. (coord.). *Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia “espinheira-santa” e outras)*. Brasília: CEME/AFIP, p. 37 - 48, 1988.
- PAGLIARINI, W.F.M. *Levantamento de plantas de uso medicinal no distrito do Ribeirão da Ilha*. Florianópolis: Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFSC, 1995. Trabalho de Conclusão de Curso. p. 24.

- PAZ, E.A.; BASSAGODA, M.J.; FERREIRA, F.Y. *Uso racional de las plantas medicinales*. Uruguai: Fior de Siglo, 1992.
- PELLETIER, S.W.; CHOKSHI, H.P.; DESAI, H.K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. *Journal of Natural Products*, v. 49, n. 5, p. 892 – 900, 1986.
- PEREIRA, V.M. Contribuição estudo do princípio ativo e outros constituintes básicos de *Maytenus ilicifolia*. *Revista Brasileira de Química*, v.14, n. 322, p. 416 – 417, 1962.
- PEREIRA, M.V.; CAMPOS, J.D. *Maytenus ilicifolia*. *Arquivos brasileiros de medicina naval*, v. 21, p. 17 – 23, 1960.
- PERU – Ministério das Relaciones Exteriores. *Plantas medicinales amazónicas: realidades y perspectivas*. Lima: Tratado de Cooperación Amazónica, 1994.
- PETROVICK, P.R.; MARQUES, L.C.; PAULA, I.C. de. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999. v.66, p. 51-55. 1999.
- PETROVICK, P.R.; MARQUES, L.C. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da Universidade, 2001.
- PIO-CORRÊA, M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978. p. 222.
- QUEIROGA, C.L.; DIAS, P.C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J.E. *Avaliação da Atividade Antiulcerogênica de friedelina e friedelan-3-ol isolados de folhas de Maytenus ilicifolia (Celastraceae)*. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia – SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998, p. 147, ref. 03.124.

- QUEIROGA, C.L.; SILVA, G.F.; DIAS, P.C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J.E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and frielelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 465 – 468, 2000.
- RACHWAL, M.F.G.; CURCIO, G.R.; RADOMSKI, M.I.; MEDRADO, M.J.S.; WISNIEWSKI, C. Desenvolvimento comparativo de *Maytenus ilicifolia* em cambissolo húmico sob diferentes intensidades luminosas – Colombo – PR. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia –SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998, p. 103, ref. 02.011.
- RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603 – 613, 2001.
- REMILLARD, S.; REBHUN, L.I.; HOWIE, G.A.; KUPCHAN, S.M. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science*, v. 189, p. 1002, 1975.
- RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, v. 24, n.1, p. 1 – 20, 1994.
- SANTOS, C.A.M.; TORRES, K.R.; LEONART, R. *Plantas medicinais*. São Paulo: Ícone, 1992. p. 93.
- SCHEFFER, M.C.; ARAÚJO, A .J. Observações sobre a frutificação de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) na região Sul do Brasil. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia –SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998, p. 106, ref. 02.020.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis/ Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da Universidade, 2001.

- SHARAPIN, N. *Problemas de controle de qualidade na indústria de fitofármacos. In* Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 14, 1996, Florianópolis – SC. *Resumos*. Florianópolis, 1996, p. 25.
- SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuasca*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 12, p. 1675 – 1681, 1994.
- SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Revised structures of cangorosins, triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 2, p. 111 – 115, 1997.
- SIDDIQUI, S.; HAFEEZ, F.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, B.S. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander*. *Journal of Natural Products*, v. 51, n. 2, p. 229 – 233, 1988.
- SILVA ARAÚJO, J.E.; LUCAS, V. Catálogo de extratos fluidos. Nova Edição. Rio de Janeiro: Silva Araújo e Cia. Ltda, 1930.
- SILVA, C.G; RECIO, R.A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; PAIVA, R.L.R. Coleta e avaliação da qualidade fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* M. (espinheira-santa). *Tribuna Farmacêutica*, v. 57/59, n. 1-2-3, p. 46 – 50, 1991.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1979.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1986.
- SMITH, D.A .; BANKS, S.W. Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoids fitoalexins. *Phytochemistry*, v. 25, n. 5, p. 979 – 995, 1986.

- SPITZER, V.; AICHHOLZ, R. Analysis of naturally occurring α -acetotriacylglycerides by gas chromatography – chemical ionization mass spectrometry. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 19, p. 497 – 501, 1996.
- TINTO, W.F.; BLAIR, L.C.; ALLI, A. Lupane triterpenoids of *Salacia cordata*. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 3, p. 395 – 398, 1992.
- TREASE, G.E.; EVANS, W.C. *Pharmacognosy*. 12ed. London: Ballière Tindall, 1983.
- VARGAS, V.M.F.; GUIDOBONO, R.R.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of plant extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, n. 2, p.67 – 70, 1991.
- VIDYA, L.; VARALAKSHMI, P. Control of urinary risk of stones by betulin and lupeol in experimental hyperoxaluria. *Fitoterapia*, v. 71, p. 535 – 543, 2000.
- VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; CERVI, A .C. High resolution gas chromatography analysis of ‘espinheira santa’ (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. *Phytotherapy Research*, v. 8, p. 241 – 244, 1994.
- VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Detecção de adulterações em amostras comerciais de “espinheira-santa” por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC). *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 18, n.2, p. 241 – 248, 1997.
- VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M.; WAUTERS, J.N.; ANGENOT, L. Characterization of Adulteration of “espinheira santa” (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae) hydroalcoholic extracts with *Sorocea bomplandii* (Moraceae) by high performance thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, v. 9, p. 263 – 266, 1998a.
- VILEGAS, J.H.Y.; CAPPELARO, E.A.; TIBERTI, L. A .; VASCONCELOS, E.C.; LANÇAS, F.M.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C. Variabilidade química sazonal de *Maytenus aquifolium*. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 15, 1998, Águas de Lindóia –SP. *Resumos*. Águas de Lindóia, 1998b, p. 202, ref. 08. 038.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis*. 2ed. Berlin: Springer, 1995.

WHO. *Quality control methods for medicinal plant material*. Geneva, 1998.

WHO. *Traditional Medicine*. Disponível em <http://www.who.ch/>. Consulta em 22/08/2001.

UJITA, K.; FUJITA, T.; TAKAIASHI, Y.; TOKUDA, H.; NICHINO, S.; IWASHIMA, A. "39th Annual Meeting of Japanese Society of Pharmacology", *Abstract....*, p. 58, 1992.

ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 2, p. 265 – 268, 1998.