



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SANDRA APARECIDA SAHYUN

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BANCO DE
GERMOPLASMA DE ESPINHEIRA SANTA
(*MAYTENUS AQUIFOLIUM*)**

SANDRA APARECIDA SAHYUN

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BANCO DE
GERMOPLASMA DE ESPINHEIRA SANTA
(*MAYTENUS AQUIFOLIUM*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza
Co-Orientador: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S131c Sahyun, Sandra Aparecida.
Caracterização química de banco de germoplasma de Espinheira santa
(*Maytenus aquifolium*) / Sandra Aparecida Sahyun – Londrina, 2012.
58 f. : il.

Orientador: José Roberto Pinto de Souza
Coorientador: Suzana Lucy Nixdorf.
Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação
em Agronomia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Espinheira Santa - Teses. 2. Maytenus - Teses. 3. Plantas
medicinais - Teses. 4. Flavonóides - Teses. 5. Química vegetal – Teses. 6.
Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses. I. Souza, José Roberto Pinto de. II.
Nixdorf, Suzana Lucy. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 633.88

SANDRA APARECIDA SAHYUN

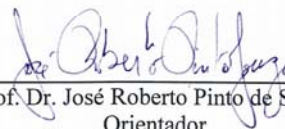
**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BANCO DE
GERMOPLASMA DE ESPINHEIRA SANTA**
(Maytenus aquifolium)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Aprovada em: 24/05/2012 data da defesa

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Carlos Vieira de Almeida	UEL
Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria	UEL
Prof. Dr. Ésio de Pádua Fonseca	UEL
Profa. Dra. Andréa Diniz	UEM



Prof. Dr. José Roberto Pinto de Souza
Orientador
Universidade Estadual de Londrina

DEDICO

Aos meus familiares, amigos e a todos que lerem
essa tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me capacitar e abençoar;

Ao meu orientador José Roberto Pinto de Souza pela constante orientação neste trabalho, pela sua perspicácia, amizade, paciência, respeito, disponibilidade e confiança;

A co-orientadora Suzana Lucy Nixdorf pelo seu carinho, credibilidade, amizade, pela parceria neste trabalho e disponibilidade do grupo DIA;

A banca cujo parecer contribuirá para enriquecer o nosso trabalho;

Aos professores da pós-graduação em Agronomia por investirem na nossa formação profissional;

A Empresa Klabin S/A por ceder os materiais e disponibilizar condições para as coletas o desenvolvimento deste projeto;

A farmacêutica bioquímica Loana Aparecida Pereira da Silva Johansson, gerente de operações, e o técnico agrícola Luiz Vicente Miranda, supervisor da empresa KLABIN S/A - Produtos Florestais Não Madeireiros, pela atenção e profissionalismo;

Aos Srs. Dinho e Pedro da empresa KLABIN S/A - Produtos Florestais Não Madeireiros pelo auxílio nas coletas a campo;

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudo;

A Universidade Estadual de Londrina pela formação proporcionada;

Aos amigos do curso de pós-graduação pela amizade e companherismo;

Aos acadêmicos de química, Matheus Sampaio Goveia e Mariana Busignani, pelo colaboração nas análises no HPLC do Laboratório DIA;

Aos pesquisadores MSc. José dos Santos Neto, Dra. Zuleide Hissano Tazima e Dr. Deoclécio Domingos Garbuglio do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pelo apoio e amizade;

A Dra. Inês Cristina de Batista Fonseca, Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pela colaboração na análise estatística;

Meus agradecimentos a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

A Fé no que não vemos, nos impulsiona a descobrir que podemos conquistar muito mais do que imaginamos um dia fazer.

SAHYUN, Sandra Aparecida. **Caracterização química de banco de germoplasma de espinheira santa (*Maytenus aquifolium*)**. 2012. 58 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2012.

RESUMO

Maytenus aquifolium Mart é uma espécie nativa, com alto potencial genético com grande ocorrência no Estado do Paraná. A conservação da *M. aquifolium* oferece também suporte aos trabalhos de melhoramento genético possibilitando o intercâmbio de germoplasma, e especialmente a preservação da variabilidade genética e química, enquanto a caracterização e quantificação permitem conhecer qualidades e potencialidades do germoplasma. O presente trabalho teve por objetivo investigar e caracterizar fitoquimicamente a espécie pela identificação e avaliação quantitativa dos teores médios dos flavonóides rutina, quercetina e canferol em folhas de *M. aquifolium* coletadas em quatro áreas isoladas de mata do município de Telêmaco Borba, PR, pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A extração dos flavonóides foi realizada por hidrólise ácida e a determinação por CLAE com coluna do tipo C-18. Os perfis cromatográficos dos exemplares de *M. aquifolium* que compõem o Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Monte Alegre localizada no município de Telêmaco Borba, PR, permitiram a visualização de 12 picos de flavonóides, e dentre estes foram identificados e quantificados os flavonóides rutina, quercetina e canferol. A identificação dos flavonóides foi feita por comparação dos tempos de retenção com a passagem dos padrões de rutina, quercetina e canferol pela coluna cromatográfica. Os perfis cromatográficos de *M. aquifolium* permitiram a visualização de 12 picos de flavonóides com a identificação e quantificação dos flavonóides rutina, quercetina e canferol. Os maiores teores médios de rutina ($287,96 \pm 1,24 \text{ mg g}^{-1}$) foi obtido nas áreas de Lagoa, quercetina ($3,78 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$) na área de Divisa entre Mortandade e Trinita e, canferol ($0,847 \pm 0,001 \text{ mg g}^{-1}$) na área de Trinita. As plantas adultas de *M. aquifolium* apresentaram os maiores teores de rutina e quercetina, enquanto as jovens, os maiores de canferol.

Palavras-chave: Cromatografia. Germoplasma. Espinheira santa. Flavonóides.

SAHYUN, Sandra Aparecida. **Chemical characterization of germoplasm bank of espinheira santa** (*Maytenus aquifolium*). 2012. 58 p. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2012.

ABSTRACT

Maytenus aquifolium Mart is a native species with high genetic potential and with high occurrence in the state of Parana. The conservation of Espinheira santa offers support to breeding projects enabling the exchange of germplasm, and especially the preservation of genetic and chemistry variability, while the characterization and quantification allow to know the qualities, quantitative level and potential of the germplasm. The aim of the present work was to investigate and characterize Phytochemical the species for identification and quantitative evaluation of the average levels of the flavonoids rutin, quercetin and kaempferol in leaves of *M. aquifolium* collected from four different parts of forest in the Telêmaco Borba, PR, area were studied by the method of high performance liquid chromatography (HPLC). The extraction of flavonoids was performed by acid hydrolysis and determination by HPLC with column-type C-18. The profiles chromatographics of *M. aquifolium*, that made up the Active Germplasm Bank of Farm Monte Alegre in the municipality of Telemaco Borba, PR, allowed the visualization of 12 peaks of flavonoids and among these were identified and quantified flavonoids rutin, quercetin and kaempferol. The flavonoids were identified from espinheira santa by comparing of the retention times with those of standards, rutin, quercetin and kaempferol identified by column chromatography. The profiles cromatrográfcics of *M. aquifolium* allowed the visualization of flavonoids 12 peaks with the identification and quantification of flavonoids rutin, quercetin and kaempferol. The highest average levels of rutin ($287.96 \pm 1.24 \text{ mg g}^{-1}$) were detected in Lagoa area, The highest average levels of quercetin ($3.78 \pm 0.07 \text{ mg g}^{-1}$) were detected area between Mortandade/ Trinita. The highest average levels of kaempferol ($0.847 \pm 0.001 \text{ mg g}^{-1}$) were detected in the area of Trinita. The highest levels of rutin and quercetin were found in adult plants of *M. aquifolium*. The highest levels of the kaempferol were found in the young plants

Key-words: Germoplasm. HPLC. Flavonoids. Espinheira santa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 ASPECTOS GERAIS DE <i>MAYTENUS SP</i>	12
2.2 ASPECTOS GERAIS DE <i>MAYTENUS AQUIFOLIUM</i>	14
2.3 PROPRIEDADES MEDICINAIS DE <i>MAYTENUS AQUIFOLIUM</i>	16
2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>MAYTENUS AQUIFOLIUM</i>	17
2.5 METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	19
2.6 FATORES QUE INTERFEREM NAS CONCENTRAÇÕES DE PRINCÍPIO ATIVO	20
2.7 FLAVONÓIDES.....	22
2.8 VARIABILIDADE QUÍMICA EM <i>M. AQUIFOLIUM</i>	26
2.9 IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE QUÍMICA	27
3 VARIABILIDADE QUÍMICA DE RUTINA, QUERCETINA E CANFEROL EM <i>MAYTENUS AQUIFOLIUM</i> EM QUATRO AREAS DE TELÊMACO BORBA, PARANÁ	31
3.1 RESUMO E ABSTRACT	31
3.2 INTRODUÇÃO	32
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.5 CONCLUSÕES	41
4 CONCLUSÕES GERAIS	42
5 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Maytenus aquifolium Mart. é uma espécie pertencente a seção Oxyphyla da família Celastraceae e nativa da América do Sul (CARVALHO-OKANO, 1992). Ocorre predominante na Região Sul do Brasil (MARIOT; BARBIERE, 2007). A sua distribuição ocorre geralmente nos sub-bosques das matas entre as altitudes de 100 a 1000 m nas regiões sul e sudeste (PERECIN, 2000). Estudos etnobotânicos têm revelado, que além da ação biológica comprovada de *M. aquifolium*, esta espécie apresenta indicação popular para outras finalidades, como, por exemplo, depurativo do sangue, tratamento de diabetes, problemas no sistema urinário, problemas intestinais, antiespasmódico, contraceptivo, antiulcerogênico, cicatrizante, diurético e analgésico (MARIOT, 2005; MOSSI et al., 2009).

A depredação das florestas nativas em busca da espinheira santa tem causado erosão genética desta espécie e a destruição de seus habitats, bem como colocação da espécie em risco de extinção no Rio Grande do Sul (CONSEMA, 2002). A forte ação antrópica a que a *M. aquifolium* é submetida tem colocado esta espécie na lista das espécies medicinais nativas brasileiras consideradas como prioritárias para conservação (CONSEMA, 2002).

Os bancos de germoplasmas de plantas, uma das formas mais eficazes e eficientes de conservação, disponibilizam os recursos naturais para uso sustentável e são considerados acervos de material vivo, constituindo coleções de sementes, pólen, tecidos ou indivíduos nativos, que visam à conservação da diversidade genética das espécies vegetais, especialmente as de importância sócio-econômica.

Os extratos de folhas de *M. aquifolium* apresentam diversos compostos orgânicos, principalmente fenóis, flavonóides, taninos e triterpenos (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; PEREIRA et al., 1993; GONZALEZ et al., 2001).

A presença de flavonóides como rutina, quercetina e canferol em *M. aquifolium* (YARIWAKE et al., 2005; CHABARIBERI et al., 2009; DIAGONE et al., 2012) sugere a possibilidade desses compostos como marcadores químicos já que, segundo Zuanazzi (2000), os flavonóides possuem características que reforçam essa escolha, como: abundância relativa em quase todo reino vegetal; especificidade em algumas espécies; relativa facilidade de identificação; estabilidade e menor influência do meio ambiente.

Esses compostos são provenientes do metabolismo secundário das plantas que possuem além do valor medicinal, função ecológica importante para a sobrevivência da espécie, como caráter adaptativo. Como a produção, presença e concentração destes

compostos são reguladas geneticamente, pode-se inferir que diferenças de variabilidade genética entre populações, podem resultar em diferentes níveis de regulação e expressão dos genes, responsáveis por tais produtos do metabolismo secundário (MAIRESSE, 2005).

Novas tecnologias da biologia molecular têm sido utilizadas para detectar o polimorfismo do genoma das diferentes espécies. Dentre as técnicas moleculares para análise do DNA, o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que utiliza iniciadores (primers) aleatórios para amplificar regiões no genoma, e assim mostrar o polimorfismo entre indivíduos é importante na caracterização das espécies.

Outra forma é o desenvolvimento de técnicas analíticas que possam identificar e quantificar o princípio ativo com atividade medicinal nas espécies em estudo. Dentre os vários métodos cromatográficos, o mais usado e indicado para estudos fitoquímicos para a espinheira santa é a técnica de separação, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (YARIWAKE et al., 2005; DIAGONE et al., 2012).

A conservação e a utilização racional do potencial oferecido pela natureza é um desafio científico-tecnológico atual. A implantação de bancos de germoplasma de espinheira santa deve ser encarada como uma responsabilidade principalmente do Paraná, onde se encontra a grande parte da variabilidade genética. Se a espécie possuir árvores portadoras de genes raros ou combinações genéticas especiais como, por exemplo, resistência a doenças atuais ou futuras, é muito provável que as mesmas sejam encontradas nas populações com maior variabilidade genética.

Independentemente dos objetivos da coleção, é sempre importante que se possa ter o máximo da variabilidade genética original com baixo número de plantas. É recomendado a organização das coleções de germoplasma de forma a ter de 70 a 80% da variabilidade do reservatório genético da população original, concentrada em cerca de 10 a 15% do total de plantas ou acessos, com baixos níveis de duplicação de genótipos. Essas coleções são conhecidas como “core collections” ou coleções nucleares (MORALES, 1995).

A realização de estudos que abordem aspectos da biologia de populações. É de extrema relevância, como estrutura, dinâmica e biologia reprodutiva e estudos fitoquímicos para o gênero *Maytenus* (HAMILTON, 2004). Diante da importância da espinheira santa, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade dos flavonóides rutina, quercetina e canferol em quatro populações isoladas de *M. aquifolium* da Fazenda Monte Alegre localizada no município de Telêmaco Borba, PR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A exploração de muitas espécies medicinais nativas tem sido realizada de forma extrativista e muitas vezes predatória, o que influencia na estrutura genética e na distribuição espacial da variabilidade genética de espécies e populações. A grande maioria dessas espécies não têm suas propriedades farmacológicas estudadas embora sejam amplamente usadas em tratamentos de várias doenças pela medicina popular (PERECIN; KAGEYMA, 2002).

É preocupante o ritmo de extinção de plantas mesmo antes de 2003 quando a extinção já atingia níveis entre 50 a 100 vezes maior do que as taxas médias observadas no passado (GUERRA; NODARI, 2003). Estima-se que mil espécies são extintas por ano no planeta (três por dia), se a destruição continuar neste ritmo atual, até o ano de 2015, entre 4% e 8% de todas as espécies vivas presentes nas florestas tropicais pode desaparecer; algumas, sem nem mesmo, terem sido descritas, catalogadas ou estudadas (HUGHES et al., 1997). O Brasil foi responsável por 28% das perdas de florestas tropicais e por 14% dos demais tipos de floresta (SANDES; BLASI, 2000).

As inúmeras espécies vegetais tropicais e subtropicais são verdadeiras reservas de genes adaptados a diversos ambientes, genes de interesse para a agricultura, para a indústria de fitoterápicos e importantes para o melhoramento dos produtos já existentes e para a síntese de novas moléculas, podendo gerar benefícios incalculáveis (MAZZA; BAGGIO, 2002).

A “Estratégia Global da Biodiversidade” prevê a utilização sustentável dos recursos naturais, propondo políticas de apoio à gestão e conservação dos mesmos, em relação às plantas medicinais, o documento cita as sérias ameaças de extinção ou perda da variedade genética no ambiente silvestre, enfocando a importância das mesmas na manutenção das práticas tradicionais de medicina das comunidades locais. Também propõe o seu cultivo, não apenas para aliviar a pressão sobre as espécies silvestres e garantir o seu suprimento, mas como possível fonte de renda adicional para agricultores (WRI/UICN/PNUMA, 1992).

Dados da Associação Brasileira de Fitoterapia (ABFIT) revelam que o mercado de fitoterápicos cresce cerca de 10% ao ano, e em 2011 representou 8% da venda nacional de medicamentos, ante 15% do mercado internacional. Em 2008, o mercado era de US\$ 550 milhões no País, estimou-se que os medicamentos fitoterápicos movimentaram US\$ 93,5 bi em 2015 (QUEIROZ, 2012). A categoria de fitoterápicos tem muito a desenvolver, visto que esse mercado compõe menos de 3% do mercado total de medicamentos, e o Brasil

tem a segunda maior biodiversidade do mundo, com 22% de todas as plantas. O País abriga não somente a maior diversidade biológica do planeta, como esta apresenta alta variabilidade genética com detenção de mais de 30% dos remanescentes de florestas tropicais existentes sobre a superfície terrestre (MEDEIROS et al., 2004).

A grande maioria das plantas medicinais é coletada em habitat natural, e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade, não são suficientes para atender a uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem multiusos, sendo necessário o cultivo sistematizado para garantir produção regular e em larga escala (BRITO, 2007).

A eficácia e segurança de muitas plantas medicinais já foram comprovadas cientificamente. Entretanto, há problemas de vários níveis que limitam seu uso (BERTONI, 2003). Entre eles está a dificuldade na identificação botânica de espécies medicinais, pois muitas plantas possuem semelhanças morfológicas, que só podem ser distinguidas por especialista, como por exemplo, ocorre com o gênero *Maytenus*, onde se tem as espécies *M. aquifolium*, *M. ilicifolia* e *M. muelleri*, três espécies vegetais que são conhecidas como espinheira santa e são passíveis de extinção, sendo considerada prioritária para ações e estudos de manejo sustentável por vários especialistas no assunto (BERTONI, 2003; CONSEMA 2002; VIEIRA, 1999; VIEIRA et al., 2002).

A enorme variabilidade genética detectada em algumas espécies medicinais podem expressar alterações quantitativas e qualitativas nos metabólitos secundários, o que dificulta a obtenção de droga padronizada (BERTONI, 2003).

Outro obstáculo citado por Betoni (2003) é a forte pressão antrópica a que as espécies vegetais estão submetidas bem como sua exposição à erosão genética e redução drástica de populações endêmicas, o que dificulta sua utilização em larga escala.

2.1 ASPECTOS GERAIS DE *MAYTENUS* SP

O gênero *Maytenus* é formado por espécies arbustivas ou arbóreas encontradas em matas e campos (BARROSO, 1991; JOLY, 1993). A família Celastraceae, ordem Celastrales, engloba 98 gêneros (MOSSI et al., 2010) e cerca de 1300 espécies, que podem ser encontradas principalmente nas regiões tropicais (STEVENS, 2001).

A ocorrência do gênero *Maytenus* é ampla, suas espécies distribuem-se de norte a sul do Brasil, ocupando a maioria dos tipos de vegetações como a Floresta Amazônica, Floresta Atlântica (incluindo todas as suas formações), Caatinga, Restinga, Campo Rupestre e

Cerrado (CARVALHO-OKANO; LEITÃO-FILHO, 2004). Na América pode ser encontrado na região norte até o México, e na região sul até a Terra do Fogo; Iêmen, Malásia e Tailândia; região noroeste da África, Ilhas Canárias, nordeste da Etiópia e sul da América do Sul. Esse gênero adapta-se a uma grande variedade de climas, desde o tropical ao subpolar (CARVALHO-OKANO, 1992).

Por concentrar-se na América do Sul, esse gênero é considerado pantropical, tendo o Brasil aproximadamente 40% das espécies existentes, sendo que as populações de espinheira santa são encontradas em regiões com altitudes de até 1200 metros e clima subtropical ou temperado (CARVALHO-OKANO; LEITÃO-FILHO, 2004). Contudo a maior riqueza de espécies *Maytenus* sp é observada na Região Sudeste, a qual possui 27 espécies, seguida das Regiões Nordeste e Sul com 12 cada e, Centro-Oeste com três espécies, ressaltando que dos 27 táxons distribuídos no Sudeste, 10 deles ocorrem também no Sul e 5 no Nordeste (CARVALHO-OKANO; LEITÃO-FILHO, 2004). O Brasil pode ser considerado um dos centros de diversidade específica (CARVALHO-OKANO, 1992).

Algumas espécies do gênero *Maytenus* de clima do tipo Cfa são elementos raros nas Florestas Estacional Semidecidual e Ombrófila Densa com a Floresta Ombrófila Mista no Paraná. Estudos têm identificado populações distribuídas sobre diferentes litologias e classes de solo; também se observa que a espécie é tolerante a diferentes regimes de saturação hídrica do solo, entretanto, tem-se constatado que quanto mais próximo o lençol freático da superfície, mais rara a sua ocorrência (MAZZA et al., 2003; RADOMSKI et al., 2004b). No Brasil, *M. ilicifolia* apresenta uma distribuição predominantemente subtropical, ocorrendo em regiões onde o tipo climático predominante é o Cfb, com temperatura média do mês mais quente de 22°C, temperatura média do mês mais frio superior a 10°C e precipitação média anual de 1500 mm (CARVALHO-OKANO, 1992; LEITE, 1994).

Na floresta ombrófila mista, de modo semelhante a outras formações, além da excessiva fragmentação devido à ocupação e utilização das terras, houve também intensa retirada de espécies arbóreas (MAZZA, 2006). Segundo a autora, na atualidade, várias espécies de valor medicinal, alimentício e industrial, continuam sendo extraídas e algumas delas encontram-se com risco de extinção. Sendo assim as unidades de conservação para essas espécies assumem um papel fundamental na conservação dos ecossistemas, porém, no Brasil, a composição e a magnitude da biodiversidade nas áreas protegidas são pouco conhecidas (HAMILTON, 2004).

Espinheira santa é o nome popular comum para várias espécies como, por exemplo, *Maytenus aquifolium* Martius ou *Maytenus aquifolia* Martius, *Maytenus robusta* (LEHMKUHL; TCACENCO, 2007), *Maytenus truncata* Reiss (SILVA et al., 2005),

Maytenus ilicifolia, *Maytenus muelleri* Schwacke (LIMA et al., 2011). Entre essas, a espinheira-santa (*M. ilicifolia*) tem sua obtenção para fins comerciais a partir do extrativismo ou de plantas cultivadas, das quais são coletados os ramos e as folhas do terço superior em podas anuais (CIRIO et al., 2003). Essa espécie *M. ilicifolia* está ameaçada de extinção no Brasil, por ser explorada em regime basicamente extrativista (BATALHA et al., 2002). Seu nome popular deve-se ao fato de suas folhas possuírem bordas com espinhos e por possuir propriedades medicinais (MAGALHÃES, 2002). As folhas secas são inodoras e com sabor suave, levemente adstringente (BRASIL, 2011). Embora, no Paraná, os plantios de *M. ilicifolia* venham aumentando nos últimos anos, atualmente, a espécie se encontra nas listas da flora ameaçada de extinção no estado, ela é enquadrada na categoria "rara" (PARANÁ, 1995), sendo considerada prioritária a tomada de ações de conservação e manejo sustentável (VIEIRA et al., 2002).

2.2 ASPECTOS GERAIS DE *MAYTENUS AQUIFOLIUM*

"Espinheira santa", "espinho-de-deus", "salva-vidas", "sombra-de-touro", "erva-cancerosa", "espinheira-divina", "cancerosa" são nomeações populares para *M. aquifolium* Martius (CARVALHO-OHANO, 1992). Esta espécie também é identificada como *Maytenus aquifolia* Martius, e assim como a *Maytenus ilicifolia* é muito utilizada pela medicina popular como fitoterápico. Devido a grande semelhança entre elas, muitas vezes são confundidas, apresentando inclusive os mesmos nomes vulgares dependendo da região em que é encontrada, estas espécies são facilmente identificadas principalmente pela forma dos ramos, angulosos e carenados no caso de *M. ilicifolia*, e cilíndricos e achatados para *M. aquifolium* (CARVALHO; OKANO, 1992; PERECIN, 2000).

É um arbusto ou árvore medindo de 1,5-12,0 m de altura, apresenta ramos novos glabros, cilíndrico-achatados; folhas cartáceas, glabras; pecíolo com 0,5-1,0 cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 6,0-19,0 cm de comprimento e 2,0-6,0 cm de largura; nervura primária proeminente em ambas as faces; nervuras secundárias subsalientes; forma elíptica ou mais comumente oblongo-elíptica; base aguda ou obtusa; ápice agudo a obtuso com mucron; margem com muitos espinhos, serrada. A Inflorescência é em fascículos multifloros, apresentando pedicelos florais com 0,4-0,7 cm de comprimento. As sépalas são ovais de 0,4 cm de comprimento e 0,3 cm de largura. Os estames apresentam filetes achatados na base. O estigma é sésil ou com estilete distinto; ovário saliente ou imerso

totalmente no disco carnoso. O fruto é uma cápsula bivalvar, orbicular; o pericarpo maduro apresenta coloração castanho-avermelhada (CARVALHO-OKANO, 1992).

O florescimento da espinheira-santa *M. ilicifolia* ocorre entre os meses de setembro a dezembro e a frutificação de outubro a fevereiro (CARVALHO-OKANO, 1992). A frutificação desta alógama ocorre durante um período relativamente longo, iniciando no Estado do Rio Grande do Sul, seguido por Santa Catarina, e por último, o Paraná (SCHEFFER; ARAÚJO, 1998; PERECIN, 2000).

Na América do Sul, esta planta medicinal está presente principalmente em toda região sudeste e sul do Brasil, e espalhando-se também por países como Chile, Uruguai, Paraguai e Bolívia (CORDEIRO et al., 1999; PERECIN, 2000).

De acordo com Carvalho-Okano e Leitão- Filho (2004), o Brasil apresenta 80 espécies do gênero *Maytenus* caracterizados quimicamente pela presença de triterpenos, alcalóides, taninos e flavonoides. São 15 espécies de *Maytenus* encontrados apenas na Amazônia. Das espécies distribuídas no Brasil extra-amazônico, 9 binômios e diversas variedades foram sinonimizados como é o caso de *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* (GONZÁLEZ et al., 1996; JORGE et al., 2004).

Maytenus aquifolium Martius é uma espécie que ocorre naturalmente em Floresta Ombrófila Mista no Estado do Paraná, podendo ser encontrada também em Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semi Decidual; Mata Ciliar e Floresta Estacional Decidual (KOZERA et al., 2006).

A crescente utilização da espinheira santa provoca a coleta indiscriminada e o aumento da ameaça de desaparecimento de exemplares nativos de *M. aquifolium* (CONSEMA, 2002). Tal demanda tem incentivado os estudos sobre o cultivo de *M. aquifolium*, visando o seu aproveitamento econômico, inclusive como matéria-prima para a indústria de medicamentos fitoterápicos (YARIWAKE et al., 2005).

M. aquifolium pertence ao grupo das climáticas (finais de sucessão), espécies que têm crescimento lento, germinam e se desenvolvem com pouca exigência de luz, geralmente tem sementes grandes e não apresentam dormência, ocorrem no sub-bosque ou no dossel da floresta, e normalmente representam pequeno número de espécies, com médias e altas densidades de indivíduos no caso de espécies de sub-bosque, e altas dominâncias para as espécies de dossel e emergentes (RODRIGUES, 1991; ODUM, 1994; KAGAYAMA et al., 2003).

As espécies vegetais climáticas como a *M. aquifolium* são muito sensíveis a perturbações antrópicas, uma vez que este grupo ecológico surge sob o sombreamento do

dossel, sendo, ainda, as primeiras a sofrerem perigo de extinção porque possuem crescimento lento e dependem da fauna dispersora (KAGAYAMA et al., 2003; ZIMBACK et al., 2004).

2.3 PROPRIEDADES MEDICINAIS DE *M. AQUIFOLIUM*

Os produtos originários de plantas medicinais ocupam espaço cada vez maior nos tratamentos terapêuticos, pois as contraindicações e os efeitos colaterais resultantes do uso de medicamentos sintéticos podem ser evitados com a utilização de fitoterápicos, obtendo-se a mesma eficácia de drogas sintéticas (CORRÊA JUNIOR et al., 1991).

As espécies da família Celastraceae apresentam importância terapêutica, que corresponde a uma grande variedade de atividades farmacológicas como antiulcerogênica, inseticida, imunossupressora, cicatrizante, antirreumática, antibacteriana e tratamento de câncer de pele (CARLINI et al., 1988; SANTOS et al., 1987; FONSECA et al., 2007).

A quarta edição da Farmacopeia Brasileira (2002) registra a espécie *Maytenus ilicifolia* com comprovada atividade contra úlceras gástricas e gastrites para animais de laboratório (SOUZA-FORMIGONE et al., 1991) e seres humanos (CARLINI, 1988).

Entre as espécies medicinais de valor terapêutico está a *M. aquifolium*, cujas folhas são utilizadas em programas brasileiros de saúde como alternativas para gastrite e úlceras gástricas (CARLINI, 1988). Os componentes ativos da espinheira santa responsáveis por estas atividades são os flavonóides, taninos e triterpenos (SOUZA-FORMIGONI et al. 1991; GONZALEZ et al., 2001). Esta planta é considerada prioritária para estudos farmacológicos pela Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (CEME) (PERECIN, 2000; DI STASI, 2004).

As pesquisas com as espécies de espinheira-santa foram iniciadas na década de 60, estimuladas pela sua eficácia no tratamento de úlceras e até mesmo de câncer. Estudos iniciais revelaram que a espinheira santa contém compostos bioativos com potente ação anti-tumoral e anti-leucêmica em baixa dosagem (MARIOT; BARBIERI, 2007).

Flavonóides do tipo canferol, metabólito secundário identificado em *M. aquifolium* na sua forma de canferol-3-neohesperidosídeo que foi pesquisado em várias espécies por sua atividade hipoglicemiante (JULIANI, 1929, 1931, 1941; DA SILVA et al., 2000; PEPATO et al., 2004, 2006; SILVA et al., 2002; PIZZOLATTI et al., 2003; DE SOUSA et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2006). O canferol é eficaz para diminuir a glicemia de ratos diabéticos após tratamento agudo pela via oral. O Canferol-3-neohesperidosídeo é um

composto semelhante a canferitrina que demonstrou efeito hipoglicemiante em animais diabéticos pelas vias oral e intraperitoneal (CAZAROLLI et al., 2006).

A atividade antiulcerogênica de extratos aquosos de *M. aquifolia* foi confirmada em testes laboratoriais com ratos (OLIVEIRA et al., 1991; SOUZA-FORMIGONI et al., 2001). Frações do extrato, ricas em friedelin e friedelan-3-ol, apresentaram atividades superiores quando comparadas a cimetidina, antiácido sintético usado comercialmente (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; CARLINI et al., 1988).

2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA EM *MAYTENUS AQUIFOLIUM*

As inúmeras espécies vegetais endêmicas dos biomas tropicais e subtropicais contêm genes adaptados a diversos ambientes, genes de interesse para a agricultura, para a indústria de fitoterápicos e importantes para o melhoramento dos produtos já existentes e para a síntese de novas moléculas, podendo gerar benefícios incalculáveis (MAZZA; BAGGIO, 2002). No Brasil, os biomas contemplam uma alta diversidade biológica, incluindo centenas de espécies úteis ou potencialmente úteis, representando um estoque genético rico e variado, que vem contribuindo para o avanço da agricultura, da indústria e da produção de fármacos (ALVES, 2008).

O princípio da conservação dos recursos genéticos é a manutenção da sua viabilidade e integridade da variabilidade genética. Fundamentalmente, existem duas estratégias complementares de conservação de recursos genéticos: a *in situ* e a *ex situ* (ALVES, 2008). Com a crescente perda de recursos genéticos e a degradação dos ecossistemas naturais em todo o mundo, ampliou-se a atuação das coletas de germoplasma passando a incluir recursos genéticos de espécies silvestres, de importância potencial, particularmente, das plantas medicinais (WALTER, et al., 2005).

M. aquifolium e *M. ilicifolia* são espécies muito semelhantes devido a sua proximidade filogenética. Tais similaridades podem ser identificadas por alguns caracteres morfológicos (MARIOT et al., 2008). As características que diferenciam as duas espécies de espinheira-santa são a presença de ramos jovens tetra ou multicarenados e angulosos para *M. ilicifolia*, enquanto que para *M. aquifolium*, os ramos são arredondados ou achatados e lisos. Além disso, a disposição das folhas nos ramos em *M. ilicifolia* é de forma helicoidal e em *M. aquifolium* é paralela (CARVALHO-OKANO, 1992; CARVALHO-OKANO; LEITÃO FILHO, 2004).

Perecin (2000) estudou populações nativas de *M. aquifolium* e de *M. ilicifolia* nos estados de São Paulo e Santa Catarina, e concluiu que a espécie *M. ilicifolia* compartilha a presença de muitos alelos com as populações de *M. aquifolium* indicando proximidade filogenética e possível fluxo gênico entre as duas espécies. Este fluxo pode estar acontecendo no momento ou pode ter ocorrido num passado próximo, demonstrando que estas espécies não estão ou não estiveram completamente isoladas (PERECIN; KAGEYAMA, 2002; PERECIN, 2000).

A variabilidade genética em *M. aquifolium* foi descrita por Perecin (2000) que caracterizou geneticamente 246 indivíduos de *M. aquifolium* com o uso de marcadores isoenzimáticos para cinco populações de indivíduos adultos distribuídos na região do Estado de São Paulo, sub-bosque da Floresta Atlântica. As frequências alélicas diferiram significativamente entre as cinco populações de *M. aquifolium* consideradas, e observou a presença de alelos raros e exclusivos.

Perecin & Kageyama (2002) verificaram altos índices de variabilidade genética de cinco populações nativas de *M. aquifolium* no Estado de São Paulo que são compatíveis com as encontradas na literatura para plantas de fecundação cruzada. A presença de alelos raros nas populações dessa espinheira santa e alta variabilidade genética dentro dessas populações em relação à diversidade foram encontradas entre as populações estudadas.

A biologia reprodutiva e a distribuição da variação genética entre 8 populações compostas por progênies de 44 matrizes de espinheira-santa dos Estados do Sul do Brasil foram analisadas com marcadores isoenzimáticos e avaliações silviculturais. Scheffer (2001) concluiu que a maior parte da variação genética concentra-se dentro das populações, fato já evidenciado em outros trabalhos com essa mesma espécie (BITTENCOURT, 2000; PERECIN; KAGEYAMA, 2002; STEENBOCK, 2003; SAHYUN et al., 2010).

Entre as ferramentas utilizadas para avaliar a estimativa da divergência genética destaca-se a utilização de marcadores moleculares (VIEIRA et al., 2007). Foram observados níveis moderados de variabilidade genética total ($H_t=0,224$), níveis altos de diversidade genética (72,3% dos locos polimórficos) e alta diferenciação genética qualitativa (índice de divergência genética de $F_{st}= 0,21765$) para as três populações de *M. aquifolium* paranaenses detectada por marcadores do tipo RAPD (SAHYUN et al., 2010).

A diversidade genética da espécie *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* têm sido conduzidos abordando a variabilidade inter e intrapopulações, bem como os protocolos de mapeamento genético e formação de bancos de germoplasma (PEREIRA et al., 1994;

BITTENCOURT, 2000; SCHEFFER, 2001; PERECIN; KAGEYAMA, 2002; STEENBOCK, 2003, SAHYUN, 2007).

A quantificação do grau de dissimilaridade entre gêneros, espécies, subespécies, populações e genótipos-elite utilizados é de fundamental importância em genética de populações e no melhoramento de plantas (REIF et al., 2005).

A diversidade genética é uma medida de biodiversidade baseada na variação genética dentro de cada espécie, tanto entre populações geograficamente separadas como entre os indivíduos de uma dada população (PRIMACK, 2006). A carência de informações com relação à caracterização de germoplasma tem levado a perda de material vegetal e, por consequência, perda da diversidade genética (MARIOT, 2005),

2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Muito embora a origem de muitas substâncias vegetais ainda não tenha sido completamente esclarecida, a noção de que existe um metabolismo primário que começa com a fotossíntese e forma as proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos. O metabolismo secundário segue diferentes vias que dão origem a substâncias diversas: os isoprenóides, oriundos da via do mevalonato; os alcalóides, gerados pela via do chiquimato e os poliacetatos pela via do piruvato (LOBO, 1976). Substâncias como estas são especialmente responsáveis pela biotividade de algumas plantas. Harbone (1992) enumerou milhares destas, envolvidas em alguma relação de interação com outros organismos, seja com agente tóxico ou estimulante, tais como terpenóides, compostos fenólicos e outros.

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (WINK, 1990). Cada um desses processos, por sua vez, é governado por genes, cuja regulação é dependente de três fatores principais: hereditariedade, ontogenia (estágio de desenvolvimento) e ambiente (ROBERTS et al., 1996). As influências ambientais externas resultam muitas vezes na formação de diversos constituintes químicos em diferentes proporções ou em reduzido rendimento dos princípios ativos (LEMBERKOVICS et al., 1996). Portanto a variação na constituição química dos metabólitos secundários de plantas é influenciada, principalmente, por hereditariedade (composição genética), ontogenia (estágio de desenvolvimento da planta) e influência do ambiente.

Os fatores bióticos e abióticos podem interferir consideravelmente no perfil químico dos acessos avaliados (ALVES et al., 2010).

Com relação à localização da produção de metabólitos secundários nas plantas de espinheira santa, Corsino et al. (2000) estudaram a biossíntese de triterpenóides em *M. aquifolium*, e identificaram que as folhas produzem 3 β -friedelanol e friedelina (friedelano) e as raízes acumulam maitenina e pristimerina (quinonametídicos). Os triterpenos derivados de friedelano, uma vez que são biossintetizados nas folhas e translocados para as raízes, e posteriormente são transformados em triterpenóides quinonametídicos.

O estudo das folhas de *Maytenus aquifolium* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) demonstrou também a presença de diversos triterpenos (CORDEIRO et al., 1999). A friedelina e o friedelan-3-ol foram os triterpenos majoritários identificados. Os flavonóides encontrados em *Maytenus aquifolium* foram os flavonóis—canferol, quercetina e a rutina (DIAGONE et al., 2012).

Os metabólitos secundários desempenham papel importante na vida do homem, pois estão associados a diversos usos em diferentes culturas, constituindo componente de interesse em plantas medicinais, aromáticas, corantes, condimentos, estimulantes, e mais recentemente em alimentos funcionais (VIEIRA; AGOSTINI-COSTA, 2007).

2.6 FATORES QUE INTERFEREM NAS CONCENTRAÇÕES DE PRINCÍPIO ATIVO

Do Norte ao Sul do país, diferentes biomas abrigam as espécies vegetais de ocorrência natural que se adaptam as condições de clima, solo e umidade existentes no local. Condições sazonais, luminosidade, temperatura e clima podem alterar a composição química dos mesmos (CORRÊA JUNIOR, 1998; CORRÊA JÚNIOR et al., 1991).

Fatores bióticos e abióticos desempenham forte influência sobre a produção de substâncias bioativas frequentemente denominadas de compostos primários e secundários nas plantas. De acordo com Coley et al., 1985; Coley, 1987; Jing e Coley, 1990; Bram & Quinn, 2000, as variações do ambiente podem levar as plantas a expressar de forma diferenciada a produção de substâncias bioativas na forma e quantidade.

Os metabólitos secundários representam interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto a sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001). As proporções relativas desses metabólitos secundários nas plantas ocorrem de diferentes níveis (sazonais e diárias; inter e intraespecífica), e apesar da existência do controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação

de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH et al., 1987; HARTMANN, 1996).

Algumas vezes, as variações de conteúdo total de metabólitos secundários podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou do surgimento de novos órgãos que levam a menor concentração dos metabólitos devido a diluição ou a maior quantidade de biomassa (SPRING; BIENERT, 1987; HENDRIKS et al., 1997).

A influência do clima sobre a produção de metabólitos secundários de espinheira-santa (*M. aquifolium* e *M. ilicifolia*) foi identificada em alguns trabalhos. As informações referentes a interação genótipo x ambiente com relação a estes compostos metabólicos são importantes para o melhoramento genético da espinheira-santa (MARIOT; BARBIERE, 2007).

A luminosidade é o principal fator do ambiente que influencia a produção de polifenóis totais, polifenóis não tanantes e taninos de *M. ilicifolia* (RADOMSKI, 1998). Radomski et al. (2004) detectaram concentrações diferenciadas de taninos e polifenóis totais em plantas de espinheira santa coletadas em ambientes diferentes.

As plantas de *M. ilicifolia* desenvolvidas a pleno sol eram menores e com menor número de espinhos nas margens e maior concentração de taninos nas folhas (BERNARDI & WASICKI, 1959). E as plantas de espinheira-santa desenvolvidas em ambiente com alta luminosidade apresentavam folhas mais amareladas, mais espessas e com espinhos mais pronunciados, menor área foliar e maior peso específico das folhas, formas típicas de adaptação de plantas sombreadas expostas a luz solar direta. O peso específico de folhas apresentou altas correlações para concentração de polifenóis totais (0,87), polifenóis não tanantes (0,82) e taninos (0,83) (BERNARDI; WASICKI, 1959).

Mossi (2003) observou grande variabilidade fitoquímica dentro das populações para concentração dos metabólitos secundários limoneno, geranilacetato, ácido palmítico, fitol, esqualeno, vitamina E, stigmasterol, friedelan-3-ol e friedelin, friedelan-3-one para as populações de *M. ilicifolia* coletadas nos Estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Uma análise de agrupamentos (UPGMA), Mossi (2003) não identificou relação entre os grupos formados e as características ambientais dos locais de coleta, o que pode indicar maior influência das variáveis locais, como microclima, insolação, condições nutricionais do solo, idade da planta entre outros, sobre a concentração dos compostos analisados.

Os estágios fenológicos da planta são requisitos importantes no estudo de princípios ativos de uma espécie, o que facilita a transposição de informação sobre a espécie,

tendo em vista que a duração do ciclo reprodutivo de cada vegetal é função também da interação dos componentes do ambiente como temperatura, água, luz, etc... (ANDALORO et al., 1983).

A ocorrência de populações de espinheira-santa nas planícies aluviais do Paraná está condicionada ao regime hídrico dos solos [Gleissolos melânicos e háplicos, Neossolos flúvicos (gleicos e típicos)]. O estabelecimento e a permanência da espécie em comunidades vegetais estão intimamente ligados ao ambiente edáfico e de luminosidade, o seu comportamento é de espécie secundária, em fase inicial ou intermediária de sucessão, exigindo grande quantidade de luz para o seu estabelecimento, desenvolvimento e reprodução (RADOMSKI; PERECIN; STEENBOCK, 2004).

No caso do cultivo de *M. aquifolium*, a aplicação de fertilizantes interfere na biomassa total e não altera a produção de triterpenos e fenóis totais (PEREIRA et al., 1995).

2.7 FLAVONÓIDES

Os primeiros estudos fitoquímicos de *Maytenus* spp. destacaram a presença de taninos, alcalóides, flavonóides, terpenos ou isoprenóides entre outros (LIMA et al., 1969).

Os flavonóides têm como precursores a fenilalanina e a acetil-CoA. São originados de reações de derivados do ácido chiquímico e derivados do acetato. Os flavonóides são divididos nas classes flavonas e flavonóis (MANACH et al., 2004).

Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares. O termo flavonóide é usado para descrever ampla coleção de compostos naturais que apresentam uma estrutura carbônica do tipo $C_6C_3C_6$ ou mais especificamente a estrutura fenilbenzopirona. Dependendo da posição de ligação do anel aromático na estrutura benzopirona, este grupo de produtos naturais pode ser dividido em três classes: flavonóides, isoflavonóides e neoflavonóides (BEHLING et al., 2004).

Os flavonóides são encontrados em todos os órgãos das plantas (ZUANAZZI, 2001). São compostos de baixo peso molecular com uma estrutura base de 15 carbonos, esqueleto defenilpropano, composta por dois anéis fenólicos ligados por um anel pirano (BEHLING et al, 2004). Existem flavonóides que são encontrados em um órgão e em outros não, ou quando existe o mesmo composto em mais de um órgão, este pode apresentar diferentes concentrações. Estes compostos estão localizados nos vacúolos, cloroplastos e cromoplastos (CARDOSO et al., 2001).

Os flavonóides por serem compostos fenólicos agem como potentes antioxidantes e formam quelatos com os metais (ROCHA, 2006). Eles agem contra vírus, bactérias, fungos, reprodução e desenvolvimento animal. Podem, também, interferir na germinação de sementes e reprodução de mudas (OLIVEIRA et al., 1999). Fatores abióticos naturais como irradiação solar, luz ultra violeta, seca, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção desses compostos (GLYPHIS; PUTTICK, 1988). Além de constituírem pigmentos coloridos nas plantas, e de estarem envolvidos na respiração, fotossíntese e na transferência de energia, os flavonóides exercem ainda várias funções de extrema importância nas plantas como atração de polinizadores, barreira química de defesa contra micro-organismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros, inibição de enzimas, controle hormonal e reguladores de crescimento e ação antioxidante (LARSON, 1988, KAMEI et al., 1996, HARBONE et al., 2000).

Flavonóides inibem o crescimento ou matam muitas cepas bacterianas, inibem importantes enzimas como transcriptase reversa e proteases, bem como destroem alguns protozoários patogênicos. Todas essas atividades são exercidas com baixa toxicidade em células animais (HAVSTEEN, 2002).

Foram isolados de Celastraceae derivados agarofurânicos, catequinas, proantocianidinas, glicosídeos, flavonóides glicosilados, alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e a ocorrência de flavonóides, flavonoides glicosilados (CORSINO et al., 2003; FONSECA et al., 2007). Com os estudos fitoquímicos, alguns flavonóides foram identificados em espécies do gênero *Maytenus*, a quercetina e a catequina, que apresentaram atividade antiulcerogênica e/ou inibidora da secreção ácida in vivo ou in vitro (BAGGIO et al., 2007).

Estes metabólitos compõem um grupo economicamente importante, sendo utilizados nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Estas substâncias têm origem na via dos fenilpropanóides e apresentam mais de 9000 estruturas identificadas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). O núcleo fundamental é constituído por dois anéis fenólicos, o anel A é proveniente da rota do acetato (Malonil-CoA), e o anel B juntamente com a cadeia propiônica forma o anel heterocíclico C oriundo da rota do chiquimato (p-Cumaril-CoA), que podem estar ligados a carboidratos (heterosídeos), não associados (agliconas) ou ainda polimerizados (antocianinas) (MARTENS; MITHÖFER, 2005).

São conhecidas dez classes de flavonóides que possuem o mesmo núcleo básico (MARKHAM, 1982; MARCANO; MASAHISA, 1991), e entre essas classes são encontradas as flavonas e os flavonóis. As estruturas básicas de algumas classes de flavonóides contém um grupamento hidroxil em C₃ no anel C classificados como 3-

hidroxiflavonóides (flavonóis, antocianidinas, leucoantocianidinas e catequinas) e aqueles que não têm grupamento em 3-desoxiflavonóides (flavanonas e flavonas). Nos isoflavonóides, o anel B é ligado ao anel C pela posição C₃ (ERLUND, 2004).

Segundo Hertog et al. (1992), a determinação quantitativa dos flavonoides é complicada, devido à presença de açúcares ligados à molécula principal e a outras moléculas em diferentes posições. Normalmente, os flavonóides heterosídicos têm a porção glicona ligada à posição 3 no anel C (ROBARDS et al., 2003).

Flavonóides, tais como quercetina e canferol, são compostos fenólicos que podem ser sintetizados pelas plantas em resposta ao ataque de patógenos (DIXON; PAIVA, 1995), e o nível de compostos fenólicos nos vegetais depende do estágio de maturidade, variedade, armazenamento, fatores genéticos, entre outros (NICOLAS et al., 1994), e podem apresentar com diferentes níveis na mesma planta (PIETTA, 2000).

A rutina é um flavonol diglicosilado (derivado de quercetina), cuja estrutura química é próxima dos flavonóides glicosilados presentes na espécie *M. aquifolium* (CHABARIBERI et al., 2009). Os açúcares ramnose e galactose são encontrados como constituintes dos flavonóides glicosilados das espécies de *Maytenus*, e a rutina por ser um flavonóide polar derivado da quercetina com duas unidades de açúcares (quercetina-3-Oglucoramosídeo) na posição 3 (COELHO, 2004).

A quercetina, o principal flavonóide presente em vegetais e frutas, exerce potencial efeito anticarcinogênico (SALUCCI, 2002). Este flavonóide é abundante na maçã, na cebola e no chá verde e apresenta resultados promissores em estudos experimentais frente a atividade neuroprotetora. Arredondo et al. (2010) demonstraram a internalização neuronal da quercetina e posterior atividade protetora na toxicidade mediada pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), um importante mediador na formação de radicais livres.

Flavonóides, quercetina e catequina, identificados em *M. ilicifolia* e *Maytenus* sp, foram determinados como antiulcerogênico e/ou inibidores da secreção de ácido gástrico in vivo ou in vitro (BAGGIO et al., 2007).

Técnicas cromatográficas instrumentais, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE), demonstram ser importantes ferramentas para a identificação de material vegetal de espécies de *Passiflora* com o uso de flavonóides como marcadores (PEREIRA et al., 2004). A CLAE também demonstrou ser uma opção eficiente para a análise quantitativa de flavonóides de *Maytenus* sp (DIAGONE, 2003; YARIWAKE et al., 2005).

Documentos oficiais como as Farmacopéias Francesa, Européia e Brasileira adotam a espectrometria UV-Visível como método de escolha para a análise quantitativa de flavonóides em material vegetal. Para o trabalho de rotina, as técnicas espectrométricas apresentam importantes vantagens em comparação com a CLAE, tais como o menor custo e a simplicidade operacional (CHABARIBERI et al., 2009). A maioria dos procedimentos descritos na literatura para a análise de extratos de *M. aquifolium* é baseado em HPLC-RP (cromatografia líquida alto desempenho-fase reversa) devido as características estruturais dos compostos polifenólicos (MOLNÁR-PERL; FÜZFAI, 2005; XU et al., 2010).

A variabilidade química sazonal em *M. aquifolium* foi estudada em exemplares cultivados em Ribeirão Preto, SP, através da análise das substâncias presentes nas folhas, ao longo das quatro estações do ano durante dois anos. O teor de flavonóides totais quantificados variou de 1,349 a 3,859 mg flavonóides/g folhas secas. A amostra de *M. aquifolium* Primavera 92 apresentou maior teor de flavonóides quantificados entre as estações analisadas. A quantificação dos flavonóides totais foi feita com quercetina e canferol como padrões, devido a inexistência de padrões comerciais de flavonóides para *M. aquifolium* (YARIWAKE et al., 2005). Com essa pesquisa, os autores encontraram tanto para quercetina como para canferol valores abaixo de 2 μmol de flavonóides g^{-1} folhas secas. Os valores de 0,3 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 0,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ foram os limites de detecção para os valores calculados, respectivamente, de quercetina e canferol (YARIWAKE et al., 2005).

No final da década de 90, estudos fitoquímicos com infusão de *M. aquifolium* permitiram isolar e elucidar a estrutura de dois flavonóides, a quercetina 3-*O*- α -L-rhamnopyranosil (1-6)-*O*-[β -D-glucopiranosil(1-3)-*O*- α -L-rhamnopyranosil (1-2) -*O*- β -D-galactopiranosídeo] e o canferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl(1-6)-*O*-[β -D-glucopiranosil(1-3)-*O*- α -L-rhamnopyranosil(1-2)-*O*- β -D-galactopyranosídeo] por HPLC-NMR (Cromatografia líquida de alta eficiência-ressonância magnética nuclear). (SANNOMIYA et al., 1998; VILEGAS et al., 1999).

Sannomiya et al. (1998) verificaram que a infusão de *M. aquifolium* apresentava flavonóides tetraglicosilados: canferol- 3-*O*-{ α -L-rhamnopyranosil (1-6)-[β -D-glicopiranosil(1-3)- α -L-rhamnopyranosil(1-2)]- β -D-galactopiranosídeo} e quercetina-3-*O*-{ α -L-rhamnopyranosil(1-6)-[β -D-glicopiranosil (1-3)- α -L- rhamnopyranosil(1-2)]- β -Dgalactopiranosídeo}. Verificaram efeito antiúlceras de uma fração aquosa em que os flavonóides tetraglicosilado estavam presentes. A partir dos resultados obtidos, sugere-se uma correlação entre este flavonóide e atividade das folhas de *Maytenus*, visto que esta substância é considerada como constituinte majoritário do chá da espécie.

Leite et al. (2001) verificaram a presença de derivados do canferol com duas e três unidades de açúcares (canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 6)-[β -D-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo, canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosídeo) e quercetina triglicosilada (quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)-[β -D-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo) em *M. aquifolium*.

Outro exemplo é a identificação de flavonóides glicosilados de *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) com o uso de HPLC-NMR e HPLC-MS-MS (ANDRADE et al., 2002).

A análise de *M. aquifolium* por cromatografia de camada fina (TLC) utilizando β -caroteno como reagente de pulverização revelou a presença de compostos antioxidantes no extrato das folhas e casca da raiz de *M. aquifolium*, e o seu isolamento e identificação como catequinas e flavonóides glicosilados (canferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil (1 \rightarrow 6)-O-[β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 3)-O- α -L-rhamnopyranosil (1 \rightarrow 2)]-O- β -D-glucopiranosil e quercetina 3-O- α -L-rhamnopyranosil (1 \rightarrow 6)-O-[β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 3)-O- α -L-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-glucopiranosil) (CORSINO et al., 2003).

Devido às características estruturais dos compostos polifenólicos, a maioria dos procedimentos descritos na literatura para a análise de extratos de *M. aquifolium* é baseado em HPLC- RP (cromatografia líquida alto desempenho fase reversa) (SOUZA et al., 2009). A cromatografia líquida de alta resolução com um detector ultravioleta de arranjo de fotodiodo (HPLC UV / PAD) acoplado também é utilizado para detecção, esta é uma técnica escolhida para a análise de flavonóides e outros compostos fenólicos em produtos naturais, devido a sua robustez, versatilidade, sensibilidade, no entanto, mais recentemente, as técnicas de eletroforese capilar (CE) e eletroforese de zona capilar (CZE), foram introduzidas como uma ferramenta analítica em estudos de muitos metabólitos secundários de plantas, principalmente, devido ao desenvolvimento rápido do método, menor custo operacional, menor consumo de solvente e maior eficiência de separação (XU et al., 2010).

2.8 VARIABILIDADE QUÍMICA EM *M. AQUIFOLIUM*

A caracterização fitoquímica pode contribuir de forma significativa na promoção de atividades sustentáveis através da preservação e cultivo de espécies medicinais, além de apresentar uma relação custo e benefício viável para a população que não dispõe de medicina institucionalizada. Contribuindo dessa forma com o desenvolvimento socioeconômico e a valorização da flora nativa. A utilização de plantas medicinais traz

vantagens ambientais já que são produtos biodegradáveis, e seu suprimento é autossustentável devido à diversidade da flora medicinal (HAMMOND et al., 1997).

A espécie *M. aquifolium* apresenta as maiores concentrações de triterpenos quando comparada a *M. ilicifolia*, constituintes importantes na defesa contra microrganismos. Por outro lado, *M. ilicifolia* possui níveis de compostos fenólicos que são três vezes maiores que os presentes em *M. aquifolium* (PEREIRA et al., 2005).

As plantas medicinais frequentemente apresentam diferenças químicas sazonais, afetando a produção de princípios ativos nas diferentes épocas do ano. As folhas de *M. aquifolium* foram analisadas em quatro estações do ano onde constataram grande variação no teor de fenóis totais (21,96 a 45,92 mg ácido tânico g⁻¹ folhas secas), no teor de triterpenos (55,88 a 93,20 mg triterpenos totais g⁻¹ de folhas secas) e no teor de flavonóide total (1,349 a 3,859 mg flavonóides g⁻¹ folhas secas (YARIWAKE et al., 2005). No período da primavera de 1992 ao inverno de 1994, os valores de teores de canferol foram reduzidos de $2,51 \pm 0,07$ a $0,84 \pm 0,04$ mg g⁻¹ (YARIWAKE et al., 2005). Segundo Harborne & Williams (2000), o canferol e a quercetina são os flavonóis mais frequentemente encontrados na forma conjugada a carboidratos, representando uma estratégia de adaptação a sobrevivência das plantas relacionada a proteção contra a radiação UV-B.

Mossi (2003) observou grande variabilidade fitoquímica dentro das populações de *M. ilicifolia* coletadas nos Estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul para concentração dos metabólitos secundários limoneno, geranilacetato, ácido palmítico, fitol, esqualeno, vitamina E, stigmasterol, friedelan-3-ol e friedelan-3-one.

A legislação brasileira também indica a importância dos estudos analíticos para adequar os parâmetros de qualidade dos medicamentos fitoterápicos (PETROVICK et al., 1999).

Para propor critérios de padronização de medicamentos fitoterápicos é imprescindível conhecer a variabilidade química da espécie vegetal utilizada como matéria prima.

2.9 IDENTIFICAÇÃO DA VARIABILIDADE QUÍMICA

Nas espécies com propriedades medicinais, a avaliação dos metabólitos secundários, se faz indispensável para o amplo conhecimento da diversidade não apenas genética, mas também a química. A falta ou insuficiência de informação sobre os acessos

mantidos em bancos ou coleções de germoplasmas é apontada por vários especialistas como uma das causas do pouco uso destes materiais. Os bancos e coleções que conseguem manter os seus genótipos caracterizados despertam muito interesse entre os pesquisadores que estudam o recurso genético vegetal conservado (ALVES, 2008).

O conhecimento e identificação da diversidade química contribuem para o estudo da variabilidade populacional e sazonal de compostos secundários em espécies exóticas e nativas. Populações quimicamente distintas, dentro de uma mesma espécie e sem distinção morfológica, com ênfase nos metabólitos secundários majoritários, foram definidas como raças químicas ou quimiótipos (HAY; SVOBODA, 1993). Segundo Vieira (2002), a existência e o reconhecimento de quimiótipos são fundamentais, também, na coleta de espécies nativas para estudos agrônômicos visando a avaliação de constituintes químicos e a produção.

A caracterização química pode ser utilizada para separar os acessos conservados com relação a presença e concentração de substâncias específicas, ou conhecer a variabilidade intrínseca ou entre acessos de mesma espécie (VALLS, 2007).

As técnicas mais utilizadas para avaliar a variabilidade química das espécies vegetais são a cromatografia em fase gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria. Existem diversos equipamentos e métodos de análises para cada grupo de metabólitos (COLLINS et al., 2009).

A variabilidade química pode ser indentificada, caracterizada e quantificada através de metodos cromatográficos. A cromatografia é um método físico químico de separação dos componentes da mistura com a distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS et al., 2009).

São vários os critérios usados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, o mais comum relaciona a técnica empregada para a separação e os diferentes tipos de fases utilizadas. Considerando o estado físico da fase móvel, tem-se a cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás, a cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido e a cromatografia supercrítica, onde a fase móvel é um vapor pressurizado com temperatura acima da temperatura crítica (COLLINS, 1995).

A cromatografia líquida em coluna divide-se em cromatografia clássica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC). A CLAE utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É tipo de cromatografia que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída com alta pressão. Ela tem a capacidade de realizar as separações e a identificação de grande quantidade de compostos presente nas amostras em poucos minutos com eficiência e sensibilidade (COLLINS, 1995).

O teor dos constituintes presentes nas plantas também varia consideravelmente em função de fatores externos como: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, método de coleta, secagem e transporte, parte da planta usada, entre outros. Cada um desses fatores pode afetar diretamente a qualidade da matéria-prima vegetal e, conseqüentemente, o produto final e a eficácia clínica dos medicamentos fitoterápicos (CALIXTO, 2001).

A CLAE é um método analítico específico, exato e reprodutível que favorece a análise dos extratos vegetais. Reconhecida como a técnica mais adequada para a determinação quantitativa de marcadores químicos em preparações vegetais, a CLAE pode ser utilizada como um parâmetro de comparação e de validação de outra metodologia analítica, pois permite identificar e quantificar substâncias mesmo na presença de interferentes da matriz vegetal (PAVEI, 2004). A CLAE permite separar um largo espectro de UV de flavonóides de uma droga vegetal alcançando desde os compostos polares até os apolares (HEIGL; FRANZ, 2003).

Na cromatografia líquida bidimensional (LC-LC) do tipo “heart-cut”, pequenas frações do efluente da primeira coluna são transferidas para uma segunda coluna, onde a seletividade diferenciada desta segunda coluna fornece aumento da resolução dos picos cromatográficos da zona de “heart-cut”, entretanto, apenas algumas regiões da primeira dimensão são transferidas para a segunda, sendo, portanto uma técnica não abrangente (DE GEUS et al., 1996; SCOTT, 2008). A cromatografia líquida bidimensional com espectrometria de massa, electrospray por ionização, foi empregada para analisar flavonóides glicosilados presentes em folhas de *M. ilicifolia* (SOUZA et al., 2009).

Técnicas cromatográficas instrumentais, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE) são importantes ferramentas para a identificação de material vegetal com o uso de flavonóides como marcadores (PEREIRA et al., 2004). A CLAE demonstrou, também, ser opção eficiente para a análise quantitativa de flavonóides de *Maytenus* (DIAGONE, 2003; YARIWAKE et

al., 2005). As Farmacopéias Francesa, Européia e Brasileira ainda adotam a espectrometria UV-Visível como método de escolha para a análise quantitativa de flavonóides em material vegetal. Para o trabalho de rotina, as técnicas espectrométricas apresentam importantes vantagens em comparação com a CLAE tais como o menor custo e a simplicidade operacional.

3 ARTIGO

VARIABILIDADE QUÍMICA DE RUTINA, QUERCETINA E CANFEROL EM *MAYTENUS AQUIFOLIUM* EM QUATRO ÁREAS DE TELÊMACO BORBA, PARANÁ.

3.1 RESUMO E ABSTRACT

RESUMO: *Maytenus aquifolium* Mart é uma espécie nativa, com alto potencial genético e de grande ocorrência no Estado do Paraná. A conservação de *M. aquifolium* possibilita a preservação da variabilidade genética e química, enquanto a caracterização e quantificação dos princípios ativos permitem conhecer as qualidades e as potencialidades do germoplasma. O objetivo do trabalho foi identificar e avaliar quantitativamente os teores médios dos flavonóides rutina, quercetina e canferol de folhas de plantas adultas e jovens de *M. aquifolium* coletadas em quatro áreas isoladas de mata do município de Telêmaco Borba, PR. A extração dos flavonóides foi realizada por hidrólise ácida e a determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna do tipo C-18. A identificação dos flavonóides foi feita por comparação dos tempos de retenção com a passagem dos padrões de rutina, quercetina e canferol pela coluna cromatográfica. Os perfis cromatográficos de *M. aquifolium* permitiram a visualização de 12 picos de flavonóides com a identificação e quantificação dos flavonóides rutina, quercetina e canferol. Os maiores teores médios de rutina ($287,96 \pm 1,24 \text{ mg g}^{-1}$) foi obtido nas áreas de Lagoa, quercetina ($3,78 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$) na área de Divisa entre Mortandade e Trinita e, canferol ($0,847 \pm 0,001 \text{ mg g}^{-1}$) na área de Trinita. As plantas adultas de *M. aquifolium* apresentaram os maiores teores de rutina e quercetina, enquanto as jovens, os maiores de canferol.

Palavras-chave: Cromatografia. Germoplasma. Espinheira santa. Flavonóides

VARIABILITY OF CHEMISTRY RUTIN, QUERCETIN AND KAEMPFEROL *MAYTENUS AQUIFOLIUM* IN FOUR AREAS OF TELEMACO BORBA, PARANÁ, BRAZIL.

ABSTRACT: *Maytenus aquifolium* Mart is a native species with high genetic potential and wide occurrence in the state of Paraná. The conservation of *M. aquifolium* enables the preservation of genetic variability and chemistry, while the characterization and quantification of active principles allow to know the qualities and potential of the germplasm. The objective was to identify and evaluate quantitatively the average levels of the flavonoids rutin, quercetin and kaempferol in young and adult plants of *M. aquifolium* collected in four isolated areas of forest (Lagoa - altitude 880 m, latitude $24^{\circ}27'21''$ S and longitude $50^{\circ}30'16''$ W; Border Mortandade Trinita - altitude 812 m, latitude $24^{\circ}15'23''$ S and longitude $50^{\circ}31'10''$ W; Mortandade - altitude 827 m, latitude $24^{\circ}14'58''$ S and longitude $50^{\circ}32'48''$ W and Trinita - altitude 797 m, latitude $24^{\circ}17'45''$ S and longitude $50^{\circ}31'58''$ W), in the Telêmaco Borba, PR, Brazil. The extraction of flavonoids was carried out by acid hydrolysis and determination by

high performance liquid chromatography (HPLC) with C-type column 18. The identification of flavonoids was made by comparison of retention times of standards of rutin, quercetin and kaempferol by column chromatography. The profiles cromatográficos allowed the visualization of flavonoids 12 peaks with the identification and quantification of flavonoids rutin, quercetin and kaempferol. The highest average levels of rutin ($287.96 \pm 1.24 \text{ mg g}^{-1}$) was obtained in the Lagoa, quercetin ($3.78 \pm 0.07 \text{ mg g}^{-1}$) in the area border Mortandade/Trinita and kaempferol ($0.847 \pm 0.001 \text{ mg g}^{-1}$) in the area of Trinita. Adult plants of *M. aquifolium* had the highest concentration of rutin and quercetin, while the young plant had the largest levels of kaempferol.

Keywords: *Germoplasm*. HPLC. Flavonoids. Espinheira santa.

3.2 INTRODUÇÃO

Maytenus aquifolium é uma espécie medicinal nativa do Brasil com maior ocorrência nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (MARIOT; BARBIERE, 2007). É uma espécie alógama e climática (PERECIN; KAGEYAMA, 2002) que apresenta atividade antiúlcera (GONZALEZ et al., 2001).

A coleta indiscriminada de *M. aquifolium* tem causado a erosão genética da espécie e a destruição de seus habitats, bem como a colocação da espécie em risco de extinção (COMSEMA, 2002 a). Essa forte ação antrópica a que *M. aquifolium* é submetida tem a colocado na lista das espécies medicinais nativas brasileiras consideradas como prioritárias para conservação (COMSEMA, 2002 b).

Os flavonóides estão presentes no gênero *Maytenus* (DIAGONE, 2003; CHABARIBERI et al., 2009; YARIWAKE et al., 2005). Esses são compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas, que possuem além do valor medicinal (RAMELET, 2001), a função ecológica de promover a sobrevivência e adaptação da espécie.

O canferol e a quercetina são os flavonóis mais frequentemente encontrados na forma conjugada a carboidratos, representando uma estratégia de adaptação e sobrevivência das plantas relacionada à proteção contra a radiação UV-B (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). O canferol e a quercetina de *Maytenus aquifolium* foram estudados por Yariwake et al. (2005), e a rutina por Chabariberi et al. (2009).

A biossíntese e a concentração dos metabólitos secundários são reguladas geneticamente. As diferenças de variabilidade genética entre populações podem resultar em diferentes níveis de regulação e expressão dos genes, que são responsáveis pela formação de metabolismo secundário. A produção e concentração dos metabólitos secundários também são influenciadas por fatores ambientais e fisiológicos (ZARONI et al., 2004).

Análises cromatográficas de infusões de folhas de *M. aquifolium* foram realizadas sistematicamente a fim de propor procedimentos analíticos para a padronização de preparações cromatográficas com a utilização de triterpenóides e flavonóides como marcadores (VILEGAS et al., 1994, 1995 e 1998, LEITE et al., 2001, LEITE et al., 2010). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) demonstrou ser opção eficiente para a análise quantitativa de flavonóides de *Maytenus* (YARIWAKE et al., 2005).

Há poucos estudos sobre a variabilidade química e a quantificação de flavonóides como rutina, canferol e quercetina de *M. aquifolium* (YARIWAKE et al., 2005, CHABARIBERI et al., 2009). Estas informações são muito importantes para o uso da planta para a preparação de uma simples infusão ou para o desenvolvimento de novos produtos pela indústria de medicamentos fitoterápicos ou alopáticos. A variabilidade química da espécie vegetal utilizada como matéria-prima é imprescindível e precisa ser conhecida para que aconteça a padronização de medicamentos fitoterápicos (PEREIRA et al., 1995).

A caracterização química pode ser utilizada para separar os acessos conservados quanto à presença e/ou concentração de substâncias específicas e princípios ativos. Destina-se também a conhecer a variabilidade intrínseca ou entre acessos de uma mesma espécie (VALLS, 2007). Portanto, a conservação da diversidade química dos recursos genéticos vegetais poderá ser mais eficiente a partir do levantamento do seu perfil químico.

Neste contexto de busca pelo conhecimento e caracterização fitoquímica da espécie procurou-se identificar e avaliar quantitativamente os teores médios dos flavonóides rutina, quercetina e canferol de folhas de plantas adultas e jovens de *M. aquifolium* coletadas de quatro áreas isoladas do município de Telêmaco Borba, PR, pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de espinheira santa (*M. aquifolium*) foram coletadas em quatro áreas da Fazenda Monte Alegre, propriedade da Klabin S/A, localizada no município de Telêmaco Borba, PR. Os pontos de coleta foram Lagoa (L) (altitude de 880 m, latitude de 24°27'21"S e longitude de 50°30'16"W), Divisa de Mortandade/Trinita (M/T) (altitude de 812 m, latitude de 24°15'23"S e longitude de 50°31'10"W), Mortandade (M) (altitude de 827 m, latitude de 24°14'58"S e longitude de 50°32'48"W) e Trinita (T) (altitude 797 m, latitude 24°17'45"S e longitude 50°31'58"W).

Um exemplar representante da espécie *M. aquifolium* foi depositado no Herbário da Klabin do Paraná, Produtos não Florestais, sob o número 2214 em 16 de Abril de 2011.

As plantas de espinheira santa amostradas das quatro áreas foram identificadas com placas brancas, metálicas numeradas, afixadas a 1,5 m e a 0,5 m de altura do nível do solo nos troncos das árvores adultas e jovens selecionadas, respectivamente.

Foram coletadas dez folhas jovens, inteiras com perfeito estado fitossanitário da região mediana da copa da planta. As folhas coletadas foram colocadas em sacos de papel kraft identificados com o número da amostra, data, período do dia da coleta e estágio de desenvolvimento da planta. Em seguida, as folhas foram encaminhadas ao laboratório para serem limpas com água destilada e para a estufa de circulação de ar forçado a temperatura de 40°C, para que atingisse 10 a 12% de teor de água.

Após a secagem, estas amostras foram trituradas no moinho de facas e passadas por uma peneira de 16 Mesh (malha de 1,0 mm). A cada operação de moagem, o moinho era desmontado e limpo. As amostras moídas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas a ausência de luz e a temperatura de 3°C até a realização das análises cromatográficas.

A extração dos flavonóides das amostras foi realizada com o emprego da metodologia adaptada de DIAGONES et al. (2012). Uma amostra de 1,0 g de *M. aquifolium* foi transferida para frasco de vidro transparente de 50 mL com tampa. Em seguida, adicionou-se 20 mL da solução metanol (PA) e água Mili Q na proporção 1:1 (v/v). A solução foi aquecida em banho-maria a 50°C sob agitação constante durante 30 minutos, e após o seu resfriamento, a solução foi novamente agitada e filtrada (filtro pregueado). O filtrado foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e deixados em repouso a temperatura de 4°C durante 1 hora, passado esse tempo, realizaram-se as leituras cromatográficas.

Utilizou-se cromatógrafo líquido Waters composto por duas bombas, um forno para coluna; detector Waters e sistema de processamento de dados, colunas com fase estacionária protegida por colunas guarda ou pré-coluna. Forno para abrigar a coluna e injetor.

As definições das condições cromatográficas foram realizadas com testes com os padrões rutina, quercetina e canferol dissolvidos em metanol e água Mili Q. A identificação dos flavonóides foi feita por comparação dos tempos de retenção com a passagem dos padrões de rutina, quercetina e canferol pela coluna cromatográfica.

As curvas de calibração foram construídas pela injeção em duplicata de soluções padrões com concentrações diferentes para cobrir uma faixa de concentração

esperada das amostras. A fase móvel constituiu-se de um sistema de gradiente para simular as condições pós-hidrólise e melhorar a separação dos flavonóides. Os limites de detecção e quantificação de rutina, quercetina e canferol foram determinados pela injeção de diluições sucessivas da mistura padrão de rutina (Merck), canferol (Merck) e quercetina (Merck). O detector apresentou faixa de linearidade com coeficiente de correlação médio de 0,9951 para rutina, 0,99911 para quercetina e 0,99936 para canferol e um fluxo de separação de 0,70 ml min⁻¹.

Com a utilização do sistema de processamento de dados (Workstation Classe) foi possível estabelecer as condições de gradientes alternando-se as proporções de metanol e água acidificada com ácido fosfórico 2%.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de CLAE-UV-DAD pode ser considerada um método rotineiro de “screening” de flavonóides em extratos de plantas. Os espectros no UV obtidos durante a análise sugerem a subclasse de flavonóides analisados e o tipo específico de aglicona (SANTOS, 2006).

Com o uso da técnica de CLAE-UV-DAD as diferentes classes de flavonóides podem ser distinguidas através da análise dos espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240 -285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser atribuída à existência do anel A e a banda I ao anel B (SANTOS, 2006). A classe dos flavonoides é do interesse deste estudo e estão na faixa de 240 a 450 nm (Figura 3.1).

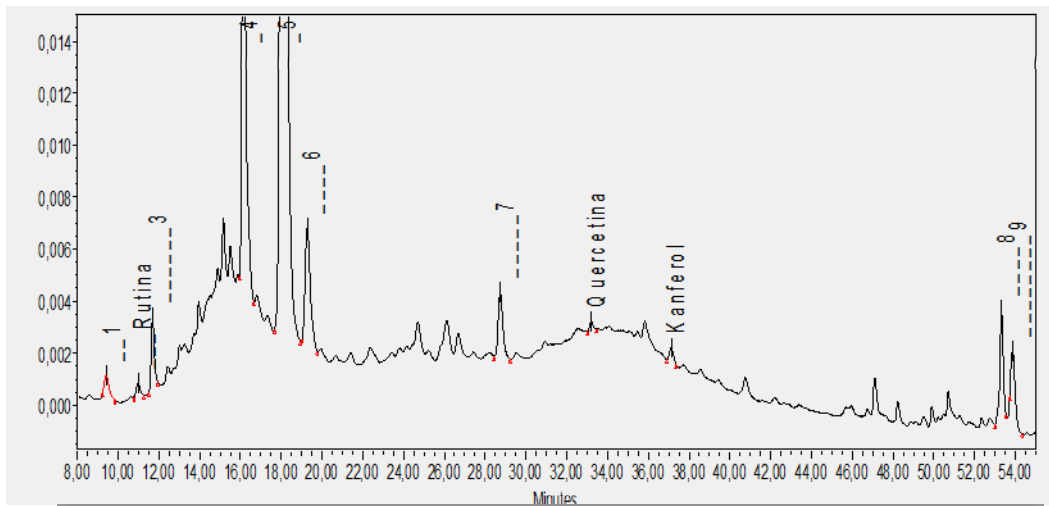
O perfil cromatográfico das folhas de *M. aquifolium* coletadas nas regiões de Lagoa, Mortandade, Divisa Mortandade/Trinita e Trinita apresentaram 12 picos de flavonóides para todas as plantas destas áreas (Figura 3.1).

Os perfis cromatográficos demonstraram serem semelhantes para as 12 amostras analisadas com relação à presença dos flavonóides rutina, quercetina e canferol nas quatro áreas coletadas da Fazenda Monte Alegre. Comparando-se o tempo de retenção do padrão flavonoide de rutina, quercetina e canferol e os espectros de absorção no ultravioleta resultou os picos observados na Figura 3.1. Não foi possível identificar os demais picos de flavonóides.

Os perfis cromatográficos das amostras demonstraram a presença de rutina [Tempo Retenção (tR) = 19,180 min em 356 nm], quercetina [tR= 32,275 min em 375 nm] e canferol [tR= 37,161 min em 363 nm].

Os flavonóides rutina, quercetina e canferol foram também identificados para a espécie *M. aquifolium* por SANNOMIYA et al. (1998), VILEGAS et al. (1999), LEITE et al. (2001) e CORSINO et al. (2003).

Figura 3.1 –Perfil cromatográfico de *Maytenus aquifolium* obtido por CLAE com a identificação de doze flavonóides detectados nos comprimentos de onda de 240 a 450 nm. Londrina. 2012.



Sannomiya et al. (1998) verificaram que a infusão de *M. aquifolium* apresentava flavonóis tetraglicosilados: canferol-3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 6)- $[\beta$ -D-glicopiranosil(1 \rightarrow 3) - α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosídeo} e quercetina -3 - O - $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6)- $[\beta$ -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3) - α - L - ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)] - β -Dgalactopiranosídeo}.

Os derivados do canferol com duas e três unidades de açúcares (canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 6) - $[\beta$ -D-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)] - β - D-galactopiranosídeo, canferol - 3 - O - α - L - ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosídeo) e quercetina triglicosilada (quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 6) - $[\beta$ -D-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)] - β -D-galactopiranosídeo) estão presentes em *M. aquifolium* (LEITE et al., 2001).

O parâmetro de linearidade nesta investigação foi obtido por meio da curva analítica do padrão rutina, quercetina e canferol.

A equação de correlação e os coeficientes de determinação obtidos para quantificar as amostras de *M. aquifolium* foram $y=2,81e^{+04}x+2,38e^{+05}$ com $R^2=0,9995$ (Rutina), $y=4,76e^{+04}x+7,69e^{+04}$ com $R^2=0,9991$ (Quercetina) e $y=3,64e^{+04}x+4,00e^{+03}$ com $R^2=0,9993$ (Canferol).

Os valores de desvio padrão relativo abaixo de 5,0% presentes na Tabela 1 indicaram que o método aplicado apresenta precisão adequada, segundo critérios da ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 3.1 – Teores médios de rutina, quercetina e canferol quantificados para plantas de *Maytenus aquifolium* coletados nas áreas de Lagoa (L), Mortandade (M), Divisa Mortandade/Trinita (M/T) e Trinita (T) da Fazenda Monte Alegre. Telêmaco Borba, PR. 2011.

Local	Amostra	Planta	Teor de		
			Rutina (mg g ⁻¹)	Quercetina (mg g ⁻¹)	Canferol (mg g ⁻¹)
L	L_1	Adulta	287,958±1,244*	1,916±0,03*	0,442±0,004*
	L_2	Jovem	106,247±2,927	2,154±0,07	0,760±0,021
	L_3	Adulta	218,989±5,507	1,860±0,02	0,674±0,001
	Média (Lagoa)		204	1,97	0,62
M	M_1	Adulta	94,108±0,116	1,842±0,02	0,276±0,001
	M_2	Adulta	164,343±5,606	1,795±0,03	0,183±0,007
	M_3	Adulta	83,437±0,090	1,903±0,03	0,415±0,014
	Média (Mortandade)		138	1,85	0,29
M/T	MT_1	Adulta	111,555±5,059	3,778±0,07	0,357±0,013
	MT_2	Jovem	63,947±1,419	3,224±0,05	0,229±0,008
	MT_3	Adulta	238,188±0,614	2,272±0,05	0,727±0,001
	Média (M/T)		138	3,10	0,44
T	T_1	Jovem	88,402±4,172	2,333±0,01	0,847±0,001
	T_2	Jovem	82,590±2,304	2,477±0,02	0,805±0,006
	T_3	Jovem	82,535±3,884	1,925±0,07	0,433±0,003
	Média (Trinita)		85	2,20	0,69

*Desvio padrão da amostra

Os metabólitos secundários das plantas oscilam de forma sazonal e diária, inter e intraplanta conforme o controle genético, expressão que pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (HARTMANN, 1996). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, a sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Análises prévias genéticas com marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) revelaram que as plantas de *M. aquifolium* localizadas nas áreas de Mortandade, Trinita e Divisa Mortandade/Trinita apresentaram índices de variabilidade genética de moderado a alto e indivíduos 100% diferentes geneticamente (SAHYUN et al., 2010). Isto justifica a variabilidade dos teores de flavonóides das plantas de *M. aquifolium* coletadas nas Florestas Ombrófila Mista de Telêmaco Borba apresentadas na Tabela 1. Há grande diversidade genética também nas plantas localizadas na área da Lagoa indicando alta variação química de flavonóides rutina, quercetina e canferol.

Yariwake et al. (2005) também verificaram variações de teores de quercetina e canferol obtidos em *M. aquifolium* coletadas em Ribeirão Preto, SP, corroborando com a hipótese de que ocorre diversidade química nesta espécie de espinheira.

A idade e o desenvolvimento da planta são de considerável importância e podem influenciar não só na quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (HENDRIKS et al., 1997; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). A padronização de folhas completamente expandidas e a coleta delas na região mediana da copa foram parâmetros importantes para o estudo de plantas adultas e jovens espinheira santa como é verificado na Figura 3. 1.

Os resultados obtidos na quantificação de teores de flavonóides de folhas de *M. aquifolium* demonstraram diferenças químicas nos teores médios de rutina, quercetina e canferol nas diferentes áreas e entre plantas de espinheira santa (Tabela 3. 1).

A idade e o desenvolvimento do vegetal, bem como dos seus órgãos, em particular, podem exercer influência sobre a quantidade total dos metabólitos produzidos e nas proporções relativas dos componentes da mistura (HENDRIKS et al., 1997). Os perfis fitoquímicos de *M. aquifolium* coletados em Telêmaco Borba detectaram a presença de flavonóides nas plantas jovens e adultas, floridas ou não (Tabela 3.1).

Verificou-se que as folhas das plantas jovens de *M. aquifolium* completamente expandidas apresentaram teores médios de rutina equivalentes a 50% ou menos do que os encontrados nas plantas adultas (Tabela 3.1).

As plantas jovens apresentaram teores de rutina entre $63,947 \pm 1,419 \text{ mg g}^{-1}$ a $106,247 \pm 2,927 \text{ mg g}^{-1}$ e as plantas adultas atingiram teores de $83,437 \pm 0,090 \text{ mg g}^{-1}$ a $287,958 \pm 1,244 \text{ mg g}^{-1}$. Os teores médios de rutina por região apresentaram grande variação (Tabela 1). Assim pode-se inferir que em plantas adultas que ocorreram em áreas de solos argilosos ou parcialmente argilosos apresentaram os teores médios de rutina mais elevados e a maior diversidade de teores médios desse flavonóide.

Os teores de quercetina para plantas jovens foram de $1,925 \pm 0,07$ a $3,224 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1}$ e nas plantas adultas de $1,795 \pm 0,03$ a $3,778 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$ (Tabela 3.1). Ocorreu baixa variação na média dos teores desse metabolito secundário entre as regiões.

Os teores de canferol das plantas jovens variaram de $0,229 \pm 0,008$ a $0,847 \pm 0,001 \text{ mg g}^{-1}$, e nas plantas adultas, $0,183 \pm 0,007$ a $0,727 \pm 0,001 \text{ mg g}^{-1}$ (Tabela 3.1).

O teor médio de quercetina encontrado em folhas de *M. aquifolium* da região de divisa Mortandade Trinita foi de $3,10 \text{ mg g}^{-1}$, 60% maior que o teor médio de plantas da região de Mortandade $1,85 \text{ mg g}^{-1}$ (Tabela 3.1).

As plantas jovens de espinheira santa oriundas de áreas de solo arenoso de Trinita demonstraram o dobro de teores de canferol que as plantas adultas amostradas de áreas de solo argiloso de Mortandade.

As diferenças na composição química entre os indivíduos de *M. aquifolium* analisados devem-se a fatores genéticos e a particularidades de microambientes onde as plantas ocorreram, tais como a fenologia, diferenças de idades e pressões provocadas por herbívoros (CASTELLANI et al., 2003).

A rutina de folhas expandidas de *M. aquifolium* atingiu teores médios mínimos de $62,5 \text{ mg g}^{-1}$ para plantas jovens e médios máximos de $289,2 \text{ mg g}^{-1}$ para plantas adultas (Tabela 3.1).

A rutina é o composto majoritário para *M. aquifolium* coletado em Telêmaco Borba. Não há registro na literatura de valores de rutina tão elevados para a espécie como os obtidos nas plantas avaliadas.

As áreas de Mortandade e Divisa Mortandade/Trinita apresentaram teores médios de rutina de 138 mg g^{-1} , enquanto as plantas coletadas na área de Lagoa expressaram teor médio de rutina de 204 mg g^{-1} , 40,3% superior as demais áreas avaliadas, e na área de Trinita, o teor médio de rutina foi inferior a 100 mg g^{-1} (Tabela 3.1).

Chabariberi et al. (2009) quantificaram os teores de rutina em folhas de *M. aquifolium* de $13,30 \pm 2,6 \text{ mg g}^{-1}$ em Ribeirão Preto, SP, por CLAE-UV/DAD. Estes valores são muito inferiores aos obtidos nas amostras de *M. aquifolium* coletadas em plantas jovens ($63,947 \pm 1,419 \text{ mg g}^{-1}$) na área de Mortandade/Trinita, Telêmaco Borba, PR (Tabela 3.1).

As plantas de *M. aquifolium* das áreas de Lagoa, Mortandade e Trinita apresentaram teores de quercetina muito próximo a $2,0 \text{ mg g}^{-1}$, enquanto que aquelas oriundas da área de Divisa Mortandade/Trinita expressaram um teor médio de $3,1 \text{ mg g}^{-1}$, um acréscimo de 64,5% de quercetina (Tabela 3.1).

As plantas de *M. aquifolium* das Florestas Ombrófilas Mistas de Telêmaco Borba apresentaram teores médios de quercetina acima de $1,925 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$, teores médios superiores aos encontrados nos trabalhos de Yariwake et al. (2005).

O flavonóide canferol foi encontrado em menor concentração que de rutina e quercetina nas plantas de *M. aquifolium* das quatro áreas da Fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, PR.

Vários fatores ambientais influenciam a produção de flavonóides nas plantas, como por exemplo, temperatura, nutrição, injúria, metabolismo do açúcar e do nitrogênio, e a qualidade de radiação (BLANK, 1947). Segundo Harborne (1994), os flavonóides totais são produzidos em menor concentração nas estações do ano que apresentam fotoperíodo bem definidos.

O flavonóide canferol está presente nas plantas de *M. aquifolium* das áreas de Lagoa, Trinita, Mortandade e Divisa Mortandade/Trinita nas concentrações de 0,62, 0,69, 0,29 e 0,44 mg g^{-1} , respectivamente (Tabela 3.1). Estes teores de canferol em folhas de *M. aquifolium* são inferiores aos encontrados por Yariwake et al. (2005) coletados nas épocas de inverno de 1992 ($1,76 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$) e 1994 ($0,84 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1}$).

As áreas de coletas de espinheira santa das localidades de Lagoa, Divisa de Mortandade/Trinita, Mortandade e Trinita demonstraram médias diferentes de teores de rutina, quercetina e canferol entre elas (Tabela 3.1).

Diferenças nas concentrações de rutina, quercetina e canferol foram encontradas nas folhas de plantas jovens e adultas de *M. aquifolium* e também em diferentes áreas das regiões (Tabela 3.1).

Na avaliação fitoquímica de *M. aquifolium* não se observou a ocorrência de flavonóides nos meses de julho e agosto segundo Catellani et al. (2003), contudo foi detectado a presença de flavonóides em 100% dos exemplares de *M. aquifolium* coletados em Telêmaco Borba no final de julho início de agosto de 2011. Os metabólitos secundários são representados por uma interface química entre as plantas e o meio ambiente, portanto a síntese dos produtos metabólicos é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

A quantificação dos flavonóides rutina, quercetina e canferol em *M. aquifolium* de Telêmaco Borba, PR pode proporcionar parâmetros para a seleção de materiais de alto valor genético e adaptativo bem como de potencial expressivo de teores médios desse flavonóides.

Desta forma pode-se pensar em cultivos de espinheira santa com características específicas, porém não se pode esquecer das condições específicas do local que poderão influenciar nos resultados obtidos.

3.5 CONCLUSÕES

Os perfis cromatográficos de *M. aquifolium* permitiram visualizar 12 picos de flavonóides com a identificação e quantificação do flavonóide rutina (tR = 19,180 min em 356 nm), quercetina (tR= 32,275 min em 375 nm) e canferol (tR= 37,161 min em 363 nm);

Os maiores teores do flavonóide rutina (204 mg g⁻¹) foram obtidos nas áreas de Lagoa, flavonóide quercetina (3,10 mg g⁻¹) na área de Divisa entre Mortandade e Trinita, e flavonóide canferol (0,69 mg g⁻¹) na área de Trinita;

As plantas de *M. aquifolium* adultas apresentaram os maiores teores de rutina e quercetina, e as plantas jovens, os maiores de canferol.

4 REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02.06.03.

BLANK, F. The anthocyanin pigments of plants. **Botany Revista**, v.13, p.241-317. 1947.

CASTELLANI, D.C et al. Variabilidade química sazonal em plantas medicinais da Mata Atlântica. In: CBO, 43 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA 2003. Recife. Anais... Recife. **Associação Brasileira de Horticultura**, 2003.

CHABARIBERI, R. DE A. O., POZZI, A.C.S., ZERAIK, M.L., YARIWAKE, J.H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p.860-864 Out./Dez.. 2009.

COMSEMA, Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul: **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul ANGIOSPERMAE**. 2002 a.

COMSEMA, Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul - Site Desenvolvido pela PROCERGS **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul ANGIOSPERMAE**. 2002b.

CORSINO, J., SILVA, D.H.S., ZANONI, M.V.B., BOLZANI, V.D.A.S., FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium* **Phytotherapy Research**, v.17, n.8, p.913–916, Sept. 2003.

DIAGONE, C.A. **Desenvolvimento de métodos cromatográficos (HPLC/DAD e eletroforético CZE/DAD) para análise de flavonóides em "espinha-santa" (*Maytenus aquifolium* Martius e *Maytenus ilicifolia* Martius)**. 259p. Tese (Doutorado em química), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2003.

DIAGONE, C.A., COLOMBO, R., LANÇAS, F.M., YARIWAKE, J.H. CZE/PAD and HPLC-UV/PAD Profile of Flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* “espinha-santa” Leaves Extracts **Chromatography Research International**, v.2012, p.1-7, 2012.

GOBBO-NETO, L & LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./apr. 2007.

GONZALEZ, F.G., PORTELA, T.Y., STIPP, E.J., STASI, L.C.DI., DI-STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, n.1, p.41-47, 2001.

HARBORNE, J.B & WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p. 481-504. 2000.

HARBORNE, J.B. The flavonoids – advances in research since 1986. **London: Chapman & Hall**. London, p. 337–385. 1994.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.80, n.1, p.177-188, 1996.

HENDRIKS, H., ANDERSON-WILDEBOER, Y., ENGELS, G., BOS, R., WOERDENBAG, H.J. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Medica**, v.63, n.4, p.356-359, 1997.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**. Maryland, v. 125, n.1, p. 58-60, 2001.

LEITE, J.P.V., RASTRELLI, L., ROMUSSI, G., OLIVEIRA, A.B., VILEGAS, J.H.Y., VILEGAS, W., PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n. 8, p.3796-3801. 2001.

LEITE, J.P.V., BRAGA, F.C., ROMUSSI, G, PERSOLI, R.M., TABACH, R, CARLINI, E.A., OLIVEIRA, A.B. Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.21, n.2, p. 248-254, 2010.

MARIOT, M.P & BARBIERI, R.L. Caracteres fisiológicos em progênies de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 2, p.798-800, jul.. 2007.

PEREIRA, A.M.S., MORO, J.R., CERDEIRA, R.M.M., FRANCA, S.C. Effects of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, n.3, p.295-297, 1995.

RAMELET, A. A. Clinical Benefits of Daflon 500 mg in the Most Severe Stages of Chronic Venous Insufficiency. **Angiology**, v.52, n.1. p.49-56. 2001.

SANNOMIYA, M., VILEGAS, W., RASTRELLI, L., PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v.49, n.3 September p.237-239. 1998.

SANTOS, V.A.F.F.M. **Avaliação da capacidade antioxidante e possíveis associações sinérgicas de substâncias fenólicas em *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae)**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2006. 150f.

SAHYUN, S.A., RUAS, E.A., RUAS, C.F., MEDRI, C., SOUZA, J.R.P., JOHANSSON, L.A.P.S., MIRANDA, L.V.; RUAS, P.M. Genetic variability of three natural populations of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) from Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v.53, n.5, out ,p.1037-1042. 2010.

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. et al. 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.263-6, 1998.

VILEGAS, W., SANOMMIYA, M., RASTRELLI, L., PIZZA, C. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.2, p.403-406, 1999.

YARIWAKE, J.H., LANÇAS, F.M., CAPPELARO, E.A., VASCONCELOS, E.C., TIBERTI, L.A., PEREIRA, A.M.S., FRANCA, S.C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosina**, v.15, n.1, p.162-168. 2005.

ZARONI, M., PONTAROLO, R., ABRAHÃO, W.S.M., FÁVERO, M.L.D., CORREA JÚNIOR, C., STREMEL, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p.29-39, 2004.

VALLS, J.M.F. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 281-305. 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

Os perfis cromatográficos de *M. aquifolium* permitiram visualizar 12 picos de flavonóides com a identificação e quantificação do flavonóide rutina (tR = 19,180 min em 356 nm], quercetina (tR= 32,275 min em 375 nm) e canferol (tR= 37,161 min em 363 nm);

Os maiores teores do flavonóide rutina (204 mg g⁻¹) foram obtidos nas áreas de Lagoa, flavonóide quercetina (3,10 mg g⁻¹) na área de Divisa entre Mortandade e Trinita, e flavonóide canferol (0,69 mg g⁻¹) na área de Trinita;

As plantas de *M. aquifolium* adultas apresentaram os maiores teores de rutina e quercetina, e as plantas jovens, os maiores de canferol.

5 REFERÊNCIAS

- ALVES, R. DE B. DAS N. **Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen**. 2008. 129p. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS CAMPUS DE BOTUCATU. BOTUCATU – SP. Junho – 2008.
- ALVES, R. DE B. DAS N., COSTA, T. S. A., DA SILVA, D. B. , VIEIRA, R. F. Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Caracterização Química de Metabólitos Secundários em Germoplasma Vegetal. **Documentos 315**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, DF. Julho, 2010.
<http://www.cenargen.embrapa.br/curadorias/docs/manuais/doc315.pdf>
- ANDRADE-LIMA, D. **Plantas das Caatingas**. Rio de Janeiro: A tribuna de Santos, 1989. 243p.
- AMOROZO, M. C. M & GELY, A. L. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo amazonas, Barcarena, **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Série Botânica, Belém, v. 4, p. 47-131, 1988.
- AQUINO-NETO, F.R. & NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003, 187p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FITOTERAPIA, 2011. Disponível em:
 <<http://www.abfit.org.br/noticias.shtml>>. Acesso em 19maio 2012.
- ATROCH, E. M. A. C. **Aspectos fisiológicos, anatômicos e biossintéticos de flavonóides em plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link. submetidas a diferentes níveis de irradiância**. 1999. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1999.
- BACKHOUSE, N et al. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. **Agents Action**, v.42, n.3-4,p.114-7, 1994.
- BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., OTOFUJI, G. M., CIPRIANI, T. R., SOUZA, L. M., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., MARQUES, M. C. A., MESIAVELA, S. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺,K⁺- ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 433 – 440, 2007.
- BARBIERI, R.L. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L.B. de; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 403-413.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária. 1991.
- BATALHA, M. O. , MING, L. C., NATES, J. F. D. , ALCÂNTARA, R. C. L. ,CASTRO, D. M. , MACHADO, J. G. , LOURENZANI, A. E. B., BARRETO, C. V. **Complexo agroindustrial de plantas medicinais e aromáticas no Estado de São Paulo**: Diagnóstico e

proposição de ações e melhoria da eficiência e da complexidade. Sumário Executivo do projeto. São Carlos: UFScar/Unesp/Sebrae, 2002. 57 p.

BEHLING, E. B., et al. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.3, p.285-292, 2004.

BERTONI, B. W. **Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana*** Mart. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BLANK, F. The anthocyanin pigments of plants. **Botany Revista**, v.13, p.241-317. 1947.

BOHM, B.A. Intraspecific flavonoid variation. **Botany Revista**, v.53, p197-279. 1987.

BRAM, M.R & QUINN, J.A. Sex expression, sex-specific traits, and the effects of salinity on growth and reproduction of *Amaranthus cannabinus* (Amaranthaceae), a dioecious annual. **American Journal of Botany**, v.87, n.11, p.1609-1618, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, 2006. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf>. Acesso em: 3 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.03. Determina a Publicação do “Guia para a validação de métodos analíticos bioanalíticos”. Brasília. Diário Oficial da União, 02.06.03.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/formulario_fitoterapico.htm>. Acesso em: 3 set. 2011

BRITO, C.F. **MICROPROPAGAÇÃO DE BABOSA (*Aloe vera* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia). 2007. 53p Escola de Agronomia. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia CRUZ DAS ALMAS – BAHIA.FEVEREIRO. 2007.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A & CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

CARDOSO, M.G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal**. Lavras: Editora da UFLA, 2001. 81p

CARLINI, E.L.A. **Estudo da ação anti úlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (Espinheira santa e outras)**. Brasília: CEME/AFIP. 1988.

CARLINI, E.A & FROCHTENGARTEN, M.L. Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). **Brasília-Distrito Federal**, p. 67-73. 1988.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus mol. emend. Mol.* (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. 253p. Tese (Doutorado em Ciências-Biologia Vegetal)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1992.

CARVALHO-OKANO, R.M & LEITÃO FILHO, H.F. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: REIS, M.S.; SILVA, S.R. **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp, espinheira-santa**. Brasília: IBAMA, 2004. p.11-52.

CARVALHO, F.I.F., SILVA, S.A., KUREK, A.J., MARCHIORO, V.S. **Estimativa e implicações da herdabilidade como estratégia de seleção**. Pelotas: Ed.da UFPel, 2001. 99p.

CARVALHO, A.C.B., BALBINO, E.E., MACIEL, A., PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosina**, v.18, p. 314-319. 2008.

CASTELLANI, D. C. Plantas Medicinais e Aromáticas: Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNM). Seminário Matogrossense de Etnobiologia e Etnoecologia e o II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais. Universidade Federal do Mato Grosso- UFMT. Cuiabá, MT, 2002.

CASTELLANI, DEBORA.C et al. Variabilidade química sazonal em plantas medicinais da Mata Atlântica. In: CBO, 43 CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA 2003. Recife. Anais... Recife **Associação Brasileira de Horticultura**, 2003. Disponível : <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/pmfg5001c.pdf>. Acessado em: 2 jan, 2013.

CASTRO, H.G et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais-metabólitos secundários**. Suprema. 2001.104p.

CAZAROLLI, L.H., ZANATTA, L, JORGE, A. P., DE SOUZA, E., HORST, H., WOEHL, V. M., PIZZOLATTI, M. G., SZPOGANICZ, B., SILVA, F. R. M. B. follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti hyperglycemic potential rule in diabetes. **Chemico-Biological Interactions**, Florianópolis, v. 163, n.3, p. 177-191, 2006.

CHABARIBERI, R. DE A. O., POZZI, A.C. S., ZERAIK, M. L., YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19.n.4. 860-864 Out./Dez. 2009.

CIPRIANI, T.R., MELLINGER, C.G., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Product**, v. 67, p.703-706. 2004.

CIRIO, G. M., DONI FILHO, L., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G., ZANIN, S. M. W. Inter-relação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart. Ex. Reiss (espinheira-santa) como insumo para a indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 67-76, jul./dez. 2003.

COELHO, R G. **Estudo químico de *Zollernia ilicifolia*, *Wilbrandia ebracteata* e *Caesalpinia férrea***. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2004.198p.

COLEY, P.D., BRYANT, J.P., CHAPIN I.II, F.S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v. 230, n.4728, p.895-899, 1985.

COLEY, P.D. Patrones en las defensas de las plantas: ¿porqué los herbívoros prefieren ciertas especies? *Revista de Biología Tropical*, n.35 (supl. 1), p.151-164, 1987.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P. S. **Princípios básicos da cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos.** 6. ed. Campinas: Unicamp, 1995. p. 13-19.

COLLINS, H.C., BRAGA, L.G., BONATO, S.P. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7nd. ed. Campinas: Unicamp, 1997.

COLLINS, C.L H., SILVA, C. R., FARIA, ANIZIO, M., COLLINS, K. E, JARDIM., I. C. S. F. The Search for More pH Stable Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 4, p.604-612, 2009.

CORDEIRO, P. J. M., VILEGAS, J.H.Y., LANCAS, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *M.aquifolium* ("espinaheira santa"). *Journal Brazilian Chemical Society*. [online]. v. 10, n. 6 [cited 2007-06-25], p. 523-526. 1999.

COMSEMA, Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul: **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul ANGIOSPERMAE 2002a.** Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/>>. Acesso: 24 jan 2012.

COMSEMA, Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul - Site Desenvolvido pela PROCERGS **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul ANGIOSPERMAE.** 2002b. acesso 2012. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/especies-ameacadas.pdf>. Acesso: 24 jan 2012.

CORRÊA JUNIOR, C., LIN, C.M., SCHEFFER, M. C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares.** Curitiba: EMATER-PR, v.I ,158 p, 1991.

CORRÊA, A. D. , SIQUEIRA-BATISTA, R., QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais – Do Cultivo à Terapêutica-Rio de Janeiro,** Editora Vozes, 1998.

CORRÊA JÚNIOR, C. Influência das Adubações Orgânica e Mineral na Produção de Camomila *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert e do Seu Óleo Essencial. In: **Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agrônômica,** v. 1, p. 129-153, UNESP, Botucatu, SP, 1998.

CORSINO, J., SILVA, D. H. S., ZANONI, M. V. B., BOLZANI, V. DA S., FRANÇA, S. C., PEREIRA, A.M.S., FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium* **Phytotherapy Research**, v.17, n.8, p.913–916, Sept 2003.

CORSINO, J., DE CARVALHO, P.R., KATO, M.J., LATORRE, L.R., OLIVEIRA, O.M.M.F., ARAUJO, A.R., BOLZANI, V.S., FRANÇA, S.C., PEREIRA, M.A.S., FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v.55.p. 741-748. 2000.

DA SILVA, K. L & CECHINEL, F. V. Plantas do gênero *Bauhinia* composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, Itajaí, v. 25, n. 4, p. 449-454, 2002.

DE SOUSA, E., ZANATTA, L., SEIFRIZ, I., CRECZYNSKI-PASA, T. B., PIZZOLATTI, M. G., SZPOGANICZ, B., SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic effect and antioxidant

potential of kaempferol-3,7-O- (α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves **Journal of Natural Products**, Florianópolis, v. 67, n. 3, p. 829-832, 2004.

DE GEUS, H. J., BOER, J., BRINKMAN, U. A.T. H. Multidimensionality in gas chromatography. **TRAC Trends in Analytical Chemistry**, v.15, p.168. 1996.

DIAGONE, CA **Desenvolvimento de métodos cromatográficos (HPLC/DAD e eletroforético CZE/DAD) para análise de flavonóides em "espinheira-santa" (*Maytenus aquifolium* Martius e *Maytenus ilicifolia* Martius)**. 259p. Tese (Doutorado em química), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2003.

DIAGONE, C.A., COLOMBO, R., LANÇAS, F. M., YARIWAKE, J. H. "CZE/PAD and HPLC-UV/PAD Profile of Flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* "espinheira santa" Leaves Extracts," **Chromatography Research International**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

DIXON, R.A & PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085-197, 1995.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: ed. UNESP, p.9-21. 1996.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperitin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**. Oxford, v. 24, p. 851-874, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a ed., Atheneu: São Paulo, 2003.

FONSECA, A. P. N. DE D et al. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, Aug. 2007.

GLYPHIS, J.P & PUTTICK, G.M. Phenolics in some Southern African Mediterranean shrubland plants. **Phytochemistry**, v. 27, p. 743-751, 1988.

GOBBO-NETO, L & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, A.G, ALVARENGA, N.L, RAVELO, A.G, JIMENEZ, I.A, BAZZOCCHI, I.L, CANELA, N.J., MOUJIR, L.M. Antibiotic phenol nor-triterpenes from *Maytenus canariensis*. **Phytochemistry**, v.43, p.129-132. 1996.

GONZALEZ, F.G., PORTELA, T.Y., STIPP, E.J., STASI, L.C.DI., DI-STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, n.1, p.41-47, 2001.

GUERRA, M.P & NODARI, R.O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In Simões et al. (ed.) Farmacognosia – da Planta ao Medicamento. 5^a ed. Florianópolis: Editora da UFSC, p.13-28. 2003.

HAMILTON, A.C. Medicinal plants, conservation and livelihoods. **Biodiversity and Conservation**, v. 13 p.1477-1517. 2004.

- HAMMOND, J. A., FIELDING, D., BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, v.21, p.213-228, 1997.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. London: Chapman and Hall, 1973. 295 p.
- HARBORNE, J.B. The flavonoids – advances in research since 1986. **London: Chapman & Hall**. London, p. 337–385. 1994.
- HARBORNE, J.B. & WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n.6, p. 481-504. 2000.
- HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-188, 1996.
- HAY, R. K. M & SVOBODA, K. P. Botany. In: HAY, R. K. M & WATERMAN, P. G. **Volatileoil crops: their biology, biochemistry and production**. Essex: Longman, 1993. p. 73-92.
- HEIGL, D & FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbaldrugs. **Die Pharmazie**, v. 12, p. 881-885, 2003.
- HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., VENEMA, D. P. Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p.1591-1598, 1992.
- HUGHES, J. B, DAILY, G.C. , EHRLICH, P. R. **Population Diversity: Its Extent and Extinction**. **Science**, v. 278, n. 5338, pp. 689 – 692. 24 October 1997.
- JING, S.W & COLEY, P.D. **Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in Acer negundo**. **Oikos**, v.58, p.369-377, 1990.
- JOLY, A.B. **Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1993.
- KAGEYAMA, P. Y., CASTRO, C. F. A., CARPANEZZI, A. A. Implantação de matas ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária, p. 130-143 In: **SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR**. São Paulo, 1989. Anais. Campinas: Fundação Cargill. 1989. 335 p.
- KAGEYAMA, P.Y., SEBBENN, A.M., RIBAS, L.A., GANDARA, F.B. CASTELLEN, M., PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v.64, p. 93-107, 2003.
- KOZERA, C., DITRIICH, V. A. de O. , SILVA, S. M. Composição florística da Floresta Ombrófila Mista Montana do Parque Municipal do Barigui, Curitiba, PR. **Floresta**. Curitiba, v. 36, n. 1, Jan. /abr. 2006.
- KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**. Maryland, v. 125, p. 58-60, 2001.
- KAMEI, H., T. KOIDE., T. KOJIMAM, M. HASEGAWA, K. TERABE, T. UMEDA E Y. LARSON, R.A. The antioxidant of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, p. 969. 1988.

LOBO, A. M. **Biossíntese de Produtos Naturais**. Universidade de Nova Lisboa, Portugal, 1976.

LEITE, P. F. **As diferentes unidades fitoecológicas da Região Sul do Brasil: proposta de classificação**. 1994. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1994.

LEITE, J.P.V., RASTRELLI, L., ROMUSSI, G., OLIVEIRA, A.B., VILEGAS, J.H.Y, VILEGAS W, PIZZA C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 3796-3801. 2001.

LEHMKUHL, C. W & TCACENCO, F. A. PRESERVAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE ESPINHEIRA-SANTA (*Maytenus* spp.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.1, fev. 2007.

LIMA, O.G., COELHO, J.S.B., WEIGERT, E., D'ALBUQUERQUE, I.L, SOUZA, M.A.M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. **Revista Inst Antibióticos**, v. 9, p. 17-25. 1969.

LIMA, D.M. et al . Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 4, 2011

LINDROTH, R. L., HSIA, M. T. S., SCRIBER, J. M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. Maryland Heights, v. 15, p. 681-686, 1987.

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para cultivo de espinheira-santa. **PLMED – Plantas Mediciniais – CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônômicas**, Campinas, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm>>. Acesso em: 29 ago. 2011.

MARCANO, D & MASAHISSA, H. **Fitoquímica organica**. 1991. p. 81, Caracas: Universidade Central de Venezuela, 1991.

MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoid Identification**. Londres: Academic Press, 113p, 1982.

MAIRESSE, L. A. S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. 2005. 340 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). 2005.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition** 2004, 79, 727-747.

MARIOT, M.P. **Recursos genéticos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*) no Rio Grande do Sul**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Fitomelhoramento) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2005.

- MARIOT, M. P & BARBIERI, R. L. Caracteres fisiológicos em progênies de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 798-800, jul. 2007.
- MARIOT, M. P., BARBIERI, R. L., SINIGAGLIA, C., RIBEIRO, M. V. Variability in matrices of espinheira-santa accessions. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 351-357. 2008.
- MARIOT, M.P & BARBIERI, R.L. Divergência genética entre acessos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek e *M. aquifolium* Mart.) com base em caracteres morfológicos e fisiológicos. **Revista brasileira de plantas medicinais** Botucatu, v. 12, n. 3, Sept. 2010.
- MARTENS, S & MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2395-2398. 2005.
- MARTENS, S & MITHÖFER, A. **Flavones and flavone synthases. Phytochemistry**, v. 66, October, p.2399-2407. 2005.
- MAZZA, M.C & BAGGIO, A. J. Pesquisa na Área de conservação e Manejo de Plantas Mediciniais Desenvolvidas na Embrapa Florestas. Brasília DF: Embrapa/Ibama/CNPq. 2002.
- MAZZA, M. C. M., MAZZA, C. A. da SILVA., RADOMSKI, M. I., SOARES, A. de O., RACHWAL, M. F. G., SANTOS, J. E. DOS. Caracterização de populações e habitats de *Maytenus ilicifolia* na Floresta Nacional de Irati, região centro-sul do estado do Paraná. In: **CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL**, 6., 2003, Fortaleza. 2003. Anais de trabalhos completos. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2003. p. 211-212.
- MAZZA, M. C. M. **Concervação *in situ* de *Maytenus Ilcifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae) Na floresta nacional de Irati-PR.** 2006. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências, Área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2006.
- MEDEIROS, M.F.T., FONSECA, V.S. DA., ANDREATA, R.H.P. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta botanica.brasileira**, v.18, n.2. p. 391-399, 2004.
- MOLNÁR-PERL, I. & FÜZFAI, Z. “Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids,” **Journal of Chromatography A**, vol. 1073, no. 1-2, pp. 201–227, 2005.
- MOSSI, A.J. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.** 2003. 101p. Tese (Doutorado em Ciências – Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.
- MOSSI, A. J., MAZUTI, M., PAROUL, N., CORAZZA, M. L., DARIVA, C., CANSIAN, R. L., OLIVEIRA, J. V. Genetic diversity and conservation of native populations of *Maytenus Ilcifolia* Mart. ex Reiss.**Brazilian Journal of Biology**. 69, 339. 2009.
- MOSSI, A. J., MAZUTTI, M. A., CANSIAN, R. L., OLIVEIRA, D.DE., OLIVEIRA, J. V. DE., DALLAGO, R., LEONTIEV-ORLOV, O., TREICHEL, H., ECHEVERRIGARAY, S., NASCIMENTO FILHO, I. DO. Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e

semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 5, 2010 .

NICOLAS, J.J., RICHARD-FORGET, F.C., GOUPY, P.M., AMIOT, M.J., AUBERT, S. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, p.109-157, 1994.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 433p.

OLIVEIRA, M. G. M., MONTEIRO, M. G., MACAÚBAS, C., BARBOSA, V. P., CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two Maytenus species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdã, v. 34, n.1, p. 29-41, 1991.

OLIVEIRA, M.C.C., CARVALHO, M.G., FERREIRA, D.T., FILHO, R.B. Flavonóides das folhas de *Stiffitia chrysantha* Mikan. **Química Nova**, v.22, n.2, 1999.

PAIVA, S.R., FONTOURA, L.A., FIGUEIREDO, M.R., PERFIL CROMATOGRÁFICO DE DUAS ESPÉCIES DE PLUMBAGINACEAE: *Plumbago scandens* L. E *Plumbago auriculata* LAM. **Química Nova**, v. 25, p.717, 2002.

PARANÁ. Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Curitiba.1995.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. 2004. Dissertação de Mestrado**. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Porto Alegre, 2004.

PEPATO, M. T., BAVIERA A. M., VENDRAMINI, R. C., BRUNETTI, I. L. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin induced diabetic rats. **BMC Complementary and alternative medicine**, Florianópolis, v. 4, p. 1-7, 2004

PEPATO, M. T., KELLER, E. H., BAVIERA, A. M., KETTELHUT, I. C., VENDRAMINI, R. C., BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology, Florianópolis**, v. 81, p. 191-197, 2006.

PERECIN, M.B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de Espinheira-Santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss.** 134p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba: Departamento de Genética, ESALQ/USP. 2000.

PERECIN, M.B & KAGEYAMA, P.Y. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de espinheira-santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. e suas implicações para o manejo da conservação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.4, n.2, p.80-90, 2002.

PEREIRA, A.M.S. et al. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Acta Horticulturae**, v.333, p.205-10, 1993.

- PEREIRA, R.R., PIZZOLLATI, M.G., DE LIMA, T.C.M. Ação do extrato de *Velozia stipitata* sobre úlceras gástricas experimentais em ratos. 12º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Curitiba. 1992.
- PEREIRA, A.M.S, RODRIGUES, D.C., CERDEIRA, R.M., FRANÇA, S.C. Isolamento de metabólitos de *maytenus* associadas à ação anti-úlceras gástrica. 12º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Curitiba. 1993.
- PEREIRA, A.M.S, MORO, J.R., CERDEIRA, R.M.M, FRANCA, S.C. Effects of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, n. 3, p. 295-297, 1995.
- PEREIRA, A.M.S., JANUÁRIO, A.H., QUEIROZ, M.E.E., BIONDO, R., FRANÇA, S.C. Evaluation of *Maytenus aquifolia* Mart. and *Maytenus ilicifolia* Mart. chemotypes for tannins, total phenols and triterpenes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.8, n.1, p.13-17, 2005.
- PETROVICK, P.R., MARQUES, L.C., DE PAULA, I.C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **Journal Ethnopharmacol** ,v.66,p.51-55. 1999.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.
- PIZZOLATTI, M. G., CUNHA, J.R. A., SZPOGANICZ, B., SOUZA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Química Nova**, Florianópolis, v. 26, p. 466-469, 2003.
- PRIMACK, R. **Essentials of conservation biology**. 4.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 585p.
- QUEIROZ, E. F. “**A biodiversidade brasileira como fonte de novos fitoterápicos**”, 1º Congresso Brasileiro de Fitoterapia. 3º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia (Ciaf), no Cineteatro dos Barrageiros, na Itaipu. 2012. Acesso em jan, 2013. Disponível em: <http://www.h2foz.com.br/noticia/3%C2%BA-ciaf-mercado-de-fitoterapicos-devera-chegar-us-93-bi-em-2015-diz-especialista>.
- RADOMSKI, M. I., PERECIN, M. B., STEENBOCK, W. Aspectos ecológicos de espécies de espinheira-santa. In: REIS, Maurício S. dos; SILVA, Suelma R. (Org.) Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa. v. 1. Brasília: Ibama, 2004. p.93-114. Coleção plantas medicinais e aromáticas, espinheira-santa.
- RADOMSKI, M.I., PERECIN, M. B., STEENBOCK, W. Aspectos ecológicos de espécies de espinheira-santa. In: REIS, M. S. dos; SILVA, S. R. (Org.). Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheirasanta. Brasília, DF: Ibama,, 2004b. p. 93-114. (Coleção plantas medicinais e aromáticas, v. 1).
- RADOMSKI, M. I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas, no município da Lapa – Paraná**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998. 98 f.

- REIF, J.C., MELCHINGERI, A.E., FRISCH, M. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. **Crop Science**, v.45,p.1–7. 2005.
- ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 657-691, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730300058X>>. Acesso em: 6 set. 2011.
- ROCHA, A.S. **Características bioquímicas em cascas, folhas e talos de vegetais pós-colheita em sistema de produção convencional e orgânico**. 2006. 63p. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, AC: Botânica. Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, BOTUCATU-SP. 2006.
- RODRIGUES, R. R. **Análise de um remanescente de vegetação natural às margens do rio Passa Cinco, Ipeúna, SP**. 1991. 325 f Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) –Universidade de Campinas, Campinas. 1991.
- SALUCCI, M., STIVALA, L. A., MAIANI, G., BUGIANESI, R., VANNINI, V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells. **British Journal of Câncer**, v. 86, p.1645-1651, 2002.
- SAHYUN, A.S. **Variabilidade genética de populações de espinheira santa (*Maytenus aquifolium*) por marcadores moleculares**. 2007. 78p. Dissertação de Mestrado UEL, Londrina. 2007.
- SAHYUN, S.A., RUAS, E.A., RUAS, C.F., MEDRI, C., SOUZA, J.R.P., JOHANSSON, L.A.P.S., MIRANDA, L.V., RUAS, P.M. Genetic variability of three natural populations of *Maytenus aquifolium* (Celesteraceae) from Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Curitiba, v.53, n.5, out, p.1037-1042. 2010.
- SANDES, A.R.R & DI BLASI, G. **Biodiversidade e Diversidade Química e Genética, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 2002. Disponível em: www.biotecnologia.com.br. Acesso em 17 Julho. 2004.
- SANNOMIYA, M., VILEGAS, W., RASTRELLI, L., PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v.49, p.237-239. 1998.
- SANTOS, C. A. M., TORRES, K. R., LEONER, R. Plantas Medicinais: herbarium, **Flora et Scientia**. Curitiba, 1987. 160p.
- SANTOS-OLIVEIRA, R., COULAUD-CUNHA, S., COLACO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. *Revista Brasileira de Farmacognosina*, v.19, n.2.p. 650-659. 2009.
- SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Resolução SMA48, de 21/9/04. 2004. <http://www.ibot.sp.gov.br/resolucao_sma48/resolucao48.htm> (acesso em 31/10/2011).
- SCHEFFER, M.C. **Sistema de cruzamento e variação genética entre populações e progênies de espinheira-santa**. 2001. 104p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal - Silvicultura). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

SCHEFFER, M. C & ARAÚJO, J. A. de. Observações sobre a frutificação de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) na região sul do Brasil. Livro de resumos. São Paulo: UNIFESP. (SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV. Águas de Lindóia, SP, 13 a 17/10/1998) 1998.

SCOTT, R.P.W. **Capillary Chromatography**, part of the Chrom Ed. Series. 2008. Disponível em : <http://www.chromatography-online.org/Capillary/Column-Switching/Techniques/Heart-Cutting/rs33.html>. acesso : 8/10/2012.

SILVA, F. R. M. B., SZPOGANICZ, B., PIZZOLATTI, M. G., WILLRICH, M. A. V., DE SOUSA E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. Florianópolis, v. 83, p. 33-37, 2002.

SILVA, J. L., SILVA, R. P., JORGE, R. M., FÁTIMA SILVA, G. D., VIEIRA FILHO, S. A., FONSECA, A. P. N. D., TAGLIATI, C. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.30. 2005.

SILVA DA. D. S. M. **Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)**. 2009. Disponível em: <<http://www.webartigos.com/articles/19831/1/Cromatografia-Liquida-de-Alta-Eficiencia-HPLC/-pagina1.html>>. Acesso em: 14 jun. 2010.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.O., OLIVEIRA, M.G.M., MONTEIRO, M.G. et al.. Antiulcerogenic effect of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

SOUZA, L. M., IACOMIN, M., GORIN, P. A. J., SARI, R. S.; HADDAD, M. A., SASSAKI, G. L. Glyco - and sphingophosphonolipids from the medusa *Phyllorhiza punctata*: NMR and ESI-MS/MS fingerprints. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.145, p. 85-96, 2007.

SOUZA, L. M. DE., CIPRIANI, T. R., SANT'ANA, C. F. , IACOMINI, M., GORIN, P. A. J., SASSAKI, G. L. "Heart-cutting two-dimensional (size exclusion × reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*," **Journal of Chromatography A**, V. 1216, no. 1, pp. 99–105, 2009.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version7. 2001. Available at: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Access in May 2007.

TÔRRES, A. C. B. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Goiânia, 2009.

VALLS, J. M. F. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 281-305.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999, p.152-9.

VIEIRA, R. F., SILVA, S. R., ALVES, R. de B. das N., SILVA, D. B. DA, WETZEL, M. M. da S., DIAS, T. A. B., UDRY, M. C., MARTINS, R. C. (Eds.). **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: resultados da 1ª. Reunião técnica**. Brasília: Embrapa/IBAMA/CNPq, 2002.

- VIEIRA, R. F & AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização química de metabólitos secundários em germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 343-376.
- VIEIRA, E.A., FIALHO, J.F.F., SILVA, M.S., FALEIRO, F.G. **Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do Cerrado acessada por meio de descritores morfológicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007b. 15p.
- 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. **Phytother Res**, v. 8, p. 241-244. 1994.
- VILEGAS, J.H.Y., LANÇAS, F.M., ANTONIOSI FILHO, N.R. High temperature capillary GC analysis of phytopreparations of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium* M.–Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant. **Chromatographia**, v.40, n.5/6, p.341-4, 1995.
- VILEGAS, J.H.Y & LANÇAS, F.M. Detecção de adulterações em amostras comerciais de “espinheira santa” por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.18, p. 241-248. 1997.
- VILEGAS, J.H.Y. et al. 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.263-6, 1998.
- VILEGAS, W, SANOMMIYA, M., RASTRELLI, L., PIZZA, C. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n.2, p. 403 – 406, 1999.
- XU, F., LIU, Y., SONG, R., DONG, H., ZHANG, Z. “HPLC/DAD comparison of sixteen bioactive components between Da-Cheng-Qi decoction and its parent herbal medicines,” **Natural Product Communications**, vol. 5, no. 6, pp. 893–896, 2010.
- WALTER, B.M.T., CAVALCANTI, T.B., BIANCHETTI, L. B., VALLS, J. F. M. Coleta de germoplasma: relevância e conceitos básicos. In: WALTER, B.M.T& CAVALCANTI, T.B.(Ed.tec.) **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 27-55.
- WINK, M. **Physiology of secondary product formation in plants**. IN: CHARLWOOD, B.V & RHODES, M.J.C. Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon, 1990.
- WRI/UICN/PNUMA - WORLD RESOURCES INSTITUTE; THE WORLD CONSERVATION UNION; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **A Estratégia Global da Biodiversidade**. 1992. 232p. (tradução).
- YARIWAKE, J.H., LANÇAS, F.M., CAPPELARO, E. A, VASCONCELOS, E.C., TIBERTI, L.A., PEREIRA, A.M.S., FRANCA, S.C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosina**, v.15.n. 162-168. 2005.

ZARONI, M., PONTAROLO, R., ABRAHÃO, W.S.M., FÁVERO, M.L.D., CORREA JÚNIOR, C., STREMEL, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, p.29-39, 2004.

ZIMBACK, L., MORI, E. S., KAGEYAMA, P. Y., VEIGA, R. F. A., MELLO JUNIOR, J. R. S. Genetic structure of *Trichilla pallida* Swartz (Meliaceae) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, v. 65, p. 114-119, 2004.

ZUANAZZI, J. A. da S. Flavonóides In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P. GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., **Farmacognosia**. 3ed. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade. UFRGS /Ed da UFSC, 2000.489-516p.

ZUANAZZI, J.A.S. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2001, p.499-526.

ZUANAZZI, J. A & MONTANHA, J. A. **Flavonóides**. In: SIMÕES, *et al* (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. 1102 p.

ZUANAZZI, J. A S & MONTANHA, J. A. **Em Flavonóides**, SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANM, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R., Ed. Da UFRGS/UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 2004, cap. 23.