



**Autor: Raul Sgarbosa Zambon**



Núcleo de Bioensaios  
Biossíntese e Ecofisiologia  
de Produtos Naturais

**Identificação Simultânea de Triterpenos  
Quinonametídeos e Alcalóides Piridínicos  
Sesquiterpênicos em *Maytenus ilicifolia*  
por CLAE – DAD**

**Araraquara**

**2012**

**Autor: Raul Sgarbosa Zambon**

**Identificação Simultânea de Triterpenos  
Quinonametídeos e Alcalóides Piridínicos  
Sesquiterpênicos em *Maytenus ilicifolia* por CLAE –  
DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação  
em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau  
de Farmacêutico-Bioquímico

Profa. Dra. Maysa Furlan (Orientadora)

Dra. Vânia Aparecida de F. F. Macedo dos Santos (Co-orientadora)

**Araraquara**

**2012**

## **Dedicatória**

*A Deus pai, por ter me dado a vida, à minha mãe Maria, por todo o carinho e esforço que me permitiram superar todos os desafios que a vida me apresentou e minha família que sempre estiveram comigo em todos os momentos.*

*A minha namorada Hosana que vem alegrando cada dia da minha vida desde que a conheci, obrigado pelo amor e carinho.*

*Por sempre me mostrarem os melhores caminhos, por sempre estarem comigo em minhas vitórias e me ajudarem a levantar nas derrotas dedico esta tese a todos vocês.*

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Maria e Orlando

O amor de vocês permitiu com que eu nascesse e seus ensinamentos e perseverança me conduziram até aqui, obrigado e amo vocês.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, pela oportunidade e suporte durante toda minha formação acadêmica, ensinamento os quais levarei por toda minha vida.

Ao Instituto de Química – UNESP e ao NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maysa Furlan, pela qual sou grato por partilhar seu vasto conhecimento em química, pela orientação pelos caminhos da ciência e pelo exemplo de paixão pela ciência e formação. Obrigado por todo o incentivo, amizade e ensinamentos transmitidos durante a orientação.

À minha querida co-orientadora Dra. Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos Santos, sou grato pelo exemplo de perseverança e de luta, pelos ensinamentos e dedicação à esse trabalho. Sou grato pela sua amizade, orientações e momentos passados durante esse projeto.

À CNPQ pelo fomento a esse projeto, cujo apoio financeiro viabilizou o desenvolvimento dessas atividades.

## Sumário

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                                                            | 15 |
| 1.1 – Família Celastraceae .....                                                                               | 15 |
| 1.2 – A espécie <i>Maytenus ilicifolia</i> .....                                                               | 16 |
| 1.3 – CLAE e técnicas hifenadas – descrição da importância da técnica e vantagens das técnicas hifenadas ..... | 18 |
| 2. Objetivos .....                                                                                             | 20 |
| 3. Materiais e Métodos .....                                                                                   | 21 |
| 3.1 – Material vegetal .....                                                                                   | 21 |
| 3.2 – Solventes utilizados .....                                                                               | 22 |
| 3.3 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) .....                                                 | 22 |
| 3.4 – Tratamento das amostras para análise por CLAE .....                                                      | 23 |
| 3.5 – Equipamentos utilizados nas análises das amostras por CLAE ...                                           | 23 |
| 3.6 – Métodos espectrométricos .....                                                                           | 24 |
| 4. Procedimento Experimental .....                                                                             | 25 |
| 4.1 – Análise das cascas das raízes da planta adulta de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....                       | 25 |

|                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 – Preparação do extrato das cascas das raízes de planta adulta de <i>M. ilicifolia</i> .....                                                                    | 25 |
| 4.3 – Fracionamento cromatográfico da fração DCM das cascas das raízes da planta adulta de <i>M. ilicifolia</i> .....                                               | 27 |
| 4.4 – Análise das raízes da planta jovem de <i>M.ilicifolia</i> .....                                                                                               | 29 |
| 4.5 – Preparação e fracionamento do extrato das raízes da planta jovem de <i>M. ilicifolia</i> .....                                                                | 30 |
| 4.6 – Otimização das condições cromatográficas .....                                                                                                                | 31 |
| 5. Resultados e Discussão .....                                                                                                                                     | 33 |
| 5.1 – Análise por CLAE – DAD e purificação dos constituintes das cascas das raízes da planta adulta de <i>M. ilicifolia</i> .....                                   | 33 |
| 5.2 – Análise por CLAE – DAD e purificação dos constituintes das raízes da planta jovem de <i>M. ilicifolia</i> .....                                               | 44 |
| 5.3 – Substâncias isoladas .....                                                                                                                                    | 54 |
| 5.4 – Caracterização espectrométrica das substâncias isoladas .....                                                                                                 | 55 |
| 5.4.1– Caracterização espectrométrica da aquifoliunina E1 .....                                                                                                     | 55 |
| 5.4.2 – Caracterização espectrométrica da maiteina .....                                                                                                            | 59 |
| 5.4.3 – Caracterização espectrométrica da maitenina .....                                                                                                           | 60 |
| 5.4.4 – Caracterização espectrométrica da pristimerina .....                                                                                                        | 65 |
| 5.5 – Otimização das condições cromatográficas utilizadas na análise dos metabólitos constitutivos do extrato de raiz da planta jovem de <i>M. ilicifolia</i> ..... | 67 |

|                   |    |
|-------------------|----|
| 6. Conclusão..... | 71 |
|-------------------|----|

|                      |    |
|----------------------|----|
| 7. Referências ..... | 72 |
|----------------------|----|

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo o estudo de isolamento e a identificação dos principais metabólitos especiais presentes nas raízes de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). O estudo fitoquímico das cascas das raízes da planta adulta e das raízes da planta jovem resultou no isolamento de quatro substâncias pertencentes a duas diferentes classes de metabólitos especiais, incluindo os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, aquifoliunina E-I e a maiteína e os triterpenos quinonametídeos, pristimerina e maitenina. Este estudo mostrou que o acúmulo desses metabólitos são dependentes do ciclo de desenvolvimento da planta. A análise desses metabólitos por espectrometria de massas permitiu identificar íons de fragmentação característicos dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e dos triterpenos quinonametídeos. A otimização cromatográfica e análise qualitativa por CLAE-DAD permitiu identificar os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, aquifoliunina E-I, maiteína; e os triterpenos quinonametídeos, pristimerina e maitenina, presentes no extrato de raízes da planta jovem como principais metabólitos constitutivos.



## Lista de Ilustrações

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esquema 1-</b> Partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas das raízes da planta adulta de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....                                | 26 |
| <b>Esquema 2-</b> Fracionamento cromatográfico da fração DCM das cascas das raízes da planta adulta de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....                                   | 28 |
| <b>Esquema 3</b> - Isolamento e purificação dos triterpenos quinonametídeos da planta jovem de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....                                           | 31 |
| <b>Figura 1</b> – Condição cromatográfica em rampa gradiente.....                                                                                                         | 32 |
| <b>Figura 2</b> – (A) Espectro de absorção máxima no UV dos alcaloides piridínicos sesquiterpênicos, (B) espectro de absorção máxima dos triterpenos quinonametídeos..... | 34 |
| <b>Figura 3</b> – Extrato etanólico analisado por CLAE-DAD em comprimentos de onda (A) $\lambda = 231$ nm, (B) $\lambda = 254$ nm, (C) $\lambda = 420$ nm. ....           | 35 |
| <b>Figura 4</b> – Fração de partição DCM analisado por CLAE-DAD em comprimentos de onda (A) $\lambda = 231$ nm, (B) $\lambda = 254$ nm, (C) $\lambda = 420$ nm. ....      | 36 |

**Figura 5** – Fração de partição HA analisado por CLAE-DAD em comprimentos de onda **(A)**  $\lambda = 231$  nm, **(B)**  $\lambda = 254$  nm, **(C)**  $\lambda = 420$  nm. .... 37

**Figura 6** – **(A)** Cromatograma do extrato EtOH, **(B)** fração de partição DCM, **(C)** fração M70.2 das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia*, por CLAE-DAD no modo gradiente em  $\lambda = 231$  nm..... 38

**Figura 7:** Cromatograma do extrato EtOH (A), (B) fração de partição DCM, (C) fração M70.5 das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia*, por CLAE-DAD no modo gradiente  $\lambda = 231$  nm..... 39

**Figura 8** :Fração M70.2. Condição: coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> 10  $\mu$ m (250 x 21,2 mm) modo isocrático, ACN:H<sub>2</sub>O (3:2),vazão: 10 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 254$  nm, tempo de análise 30 minutos. .... 40

**Figura 9:** Fração M70.5. Condição: coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> 10  $\mu$ m (250 x 21,2 mm) modo isocrático, ACN:H<sub>2</sub>O (7:3),vazão: 10 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 254$  nm, tempo de análise 20 minutos ..... 41

**Figura 10:** **(A)** Fração M70.5.4, **(B)** Fração M70.5.5, **(C)** Fração M70.5.6. Condição: coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda = 254$  nm e  $\lambda = 231$  nm, tempo de análise 20 minutos. ... 43

**Figura 11:** Cromatograma do extrato DCM das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*.

Condição: coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm), modo isocrático

ACN: H<sub>2</sub>O (85:15), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm e tempo de análise 20 minutos. .... 45

**Figura 12:** Fração F1. Condição: coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6

mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (4:1), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de

análise 60 minutos ..... 46

**Figura 13:** Fração F2. Condição: coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6

mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (4: 1), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de

análise 60 minutos. .... 47

**Figura 14:** Fração F3. Condição: coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6

mm). modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (4:1), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de

análise 60 minutos ..... 48

**Figura 15:** Fração F4. Condição: Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm),

modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1) vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de análise

60 minutos..... 49

**Figura 16:** Fração F5. Condição:coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6

mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1) vazão 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de

análise 60 minutos ..... 50

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 17:</b> Fração F6. Condição:coluna Phenomenex® Gemini C <sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H <sub>2</sub> O (4:1) vazão: 1 mL.min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm, tempo de análise 60 minutos. .... | 51 |
| <b>Figura 18:</b> Fração F2. Condição: coluna Phenomenex® C <sub>18</sub> 10 µm (250 x 21,2 mm), modo isocrático MeOH:H <sub>2</sub> O (9:1),vazão: 12 mL.min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm, tempo de análise 40 minutos.....      | 52 |
| <b>Figura 19:</b> Fração F3. Condição: coluna Phenomenex® C <sub>18</sub> 10 µm (250 x 21,2 mm) modo isocrático MeOH:H <sub>2</sub> O (4:1),vazão: 12 mL.min <sup>-1</sup> , λ = 254 nm , tempo de análise 30 minutos.....      | 53 |
| <b>Figura 20 –</b> Substância aquifoliunina E-I (Substância 1) .....                                                                                                                                                            | 55 |
| <b>Figura 21:</b> Espectro de massas da aquifoliunina E-I (Substância 1) .....                                                                                                                                                  | 56 |
| <b>Figura 22:</b> Espectro de massas da aquifoliunina E-I (substância 1).....                                                                                                                                                   | 56 |
| <b>Figura 23:</b> Espectro de fragmentação do íon <i>m/z</i> 850,3, onde é demonstrado o padrão de fragmentação de RODRIGUES-FILHO <i>et al.</i> ; 2001. ....                                                                   | 57 |
| <b>Figura 24:</b> Proposta de fragmentação e formação de íons observados no espectro de massas da aquifoliunina E-I (substância 1).....                                                                                         | 58 |
| <b>Figura 25 –</b> Maiteina (Substância 2).....                                                                                                                                                                                 | 59 |

|                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 26:</b> Espectro de massas da maiteina (Substância 2) .....                                                                                                                              | 59 |
| <b>Figura 27:</b> Espectro de fragmentação do íon $m/z$ 850,3 para maiteina (Substância 2), onde é demonstrado mais uma vez o padrão de fragmentação de RODRIGUES-FILHO <i>et al.</i> ; 2001 ..... | 60 |
| <b>Figura 28 –</b> Maitenina (Substância 4) .....                                                                                                                                                  | 60 |
| <b>Figura 29:</b> Espectro de massas do íon $m/z$ 421.3 .....                                                                                                                                      | 61 |
| <b>Figura 30:</b> Espectro de massas do pico base $m/z$ 201 .....                                                                                                                                  | 62 |
| <b>Figura 31:</b> Proposta de formação do íon tropílio segundo Rodrigues <i>et al.</i> 2002 .....                                                                                                  | 64 |
| <b>Figura 32:</b> Pristimerina (Substância 3) .....                                                                                                                                                | 65 |
| <b>Figura 33:</b> Espectro de massas do íon $m/z$ 465.30. ....                                                                                                                                     | 65 |
| <b>Figura 34:</b> Espectro de massas do pico base $m/z$ 201 .....                                                                                                                                  | 66 |
| <b>Figura 35:</b> Principais fragmentações observadas no espectro de massas da pristimerina.....                                                                                                   | 66 |

**Figura 36:** Cromatograma obtido por análise CLAE-DAD em rampa gradiente, a partir do extrato de raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*..... 66

**Figura 37 – (A)** Cromatograma mostrando identificação das substâncias maiteína, maitenol **(B)** nas raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*..... 69

**Figura 38: (C)** Cromatograma mostrando identificação das substâncias aquifoliunina E-I e maitenina **(D)** nas raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*. .... 70

**Figura 39: (E)** Cromatograma mostrando identificação da substância pristimerina nas raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*. .... 71

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

AcOEt – Acetato de Etila

ACN – Acetonitrila

CC – Cromatografia em Coluna

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Compartiva

CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio deuterado

CD<sub>3</sub>OD – Metanol deuterado

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos

CLAE – UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector em

Ultra - Violeta

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DCM – Diclorometano

EtOH - Etanol

HA – Fração de partição Hexano Acetato

HEX – Hexano

MeOH – Metanol

M/Z = Relação Massa - Carga

OAc – Acetato de etila

P.A – Para análise

R<sub>f</sub> – Fator de Retardamento

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UV – Ultra – Violeta

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Família Celastraceae

A família Celastraceae é caracterizada por plantas de porte variado, apresentando indivíduos que variam do porte herbáceo ao arbóreo, na qual geralmente destacam-se as plantas de menor tamanho, mesmo nos indivíduos de maior altura. Seus indivíduos estão amplamente distribuídos, sendo encontrados exemplares nas Américas e no continente Europeu, onde a grande maioria encontram-se presentes em regiões de clima subtropical e apenas poucos conhecidos que habitem regiões de climáticas de menor temperatura (SIMMOMS *et al.*; 2008; SIMMOMS *et al.*; 2001 ).

Taxonomicamente são aproximadamente 1210 espécies conhecidas, separadas em 98 gêneros, dentro de 5 sub-famílias, Campylostemonoideae, Celastroideae, Tripterygioideae, Cassinoideae, Goupioideae, onde os critérios de classificação de cada família são a forma de crescimento, formato da folha, característica florais e tipos de fruto (SIMMOMS *et al.*; 2008).

Historicamente, a família é formada por espécies de amplo emprego na medicina popular. A espécie *Catha edulis* é utilizada como estimulante do sistema nervoso central em países africanos, onde se destacam diversas outras atividades, que vão desde efeito anti-ulcerogênicos a antiproliferativos (SIMMOMS *et al.*; 2001, JORGE *et. al.*; 2004).

Bioquimicamente, são produzidos inúmeros metabólitos especiais, destacando-se os sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, onde os representantes dessas três últimas classes são os pertencentes às séries do lupano, oleano,



friedelano, taraxerano, D:B – friedobacarano e quinonametídeos (NÚÑEZ *et al.*; 2012). Também se destacam alcalóides, onde podem ser encontrados representantes da classe dos piridínicos sesquiterpênicos, flavonóides, taninos e polissacarídeos e outras classes de metabólitos especiais dos mais diversos tipos (LIÃO *et al.*; 2003; BAGGIO *et al.*; 2007; CIPRIANI *et al.*; 2009).

## **1.2 A espécie *Maytenus ilicifolia***

A espécie *Maytenus ilicifolia* Martius é uma planta nativa da região sul da América Latina, sendo encontrada em regiões de clima subtropical como a Argentina, Paraguai e ainda o Sul do Brasil (CRESTANI *et al.*; 2009).

Conhecida popularmente como “espinheira – santa”, botanicamente é uma planta de porte arbóreo, com folhas simples inteiras, lanceoladas, com curto pecíolo e sua borda apresenta formato de pequenos espinhos, caracterizando seu nome popular (DUARTE *et al.*; 2004).

A planta apresenta uma grande importância econômica devido ao seu uso na medicina popular, onde a infusão de suas folhas é utilizada tradicionalmente no tratamento do diabetes, problemas renais, desordens do sistema nervoso central, anti-inflamatório e no combate a úlceras gástricas (CRESTANI *et al.*; 2009), e na indústria de fitoterápicos (DI STASI, 2004), onde nesses dois ramos ela tem destaque principalmente pela potente ação antiulcerogênica, tendo o extrato padronizado de suas folhas ação comprovada no tratamento de úlceras gástricas (JORGE *et al.*; 2004).

As principais classes de metabólitos especiais presentes nas folhas, descritas para esse efeito são:

a) flavonóides, onde esses agem na inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ATPase diminuindo a secreção de ácido clorídrico e assim diminuindo a injúria tecidual (BAGGIO *et al.*; 2007; CRESTANI *et al.*; 2009;);

b) taninos condensados, os quais são capazes de precipitar proteínas, contribuindo para o processo cicatricial onde a precipitação de determinadas proteínas sanguíneas atuam como catalisador do processo cicatricial (JORGE *et al.*; 2004), e;

c) polissacarídeos que atuam formando um filme protegendo o tecido contra os danos causados pelo suco gástrico (CIPRIANE *et al.*; 2009). Todos esses mecanismos se completam, conferindo a propriedade anti-ulcerogênica a planta.

Devido a essas características em 1988, a espécie foi incluída como fitoterápico no programa de fitoterapia coordenado pela Central de Medicamentos, visando uma terapia racional e de baixo custo para as úlceras pépticas (DI STASI, 2004). Sendo que atualmente, muitas indústrias farmacêuticas produzem e comercializam fitofármacos contendo essa espécie, sendo as folhas utilizadas na obtenção de extratos padronizados e os taninos totais utilizados como marcadores para controle de qualidade (SOARES *et al.*; 2004).

Muitas outras espécies tem morfologia similar, incluindo *Soracea bomplandii* (Moraceae), *Zolernia ilicifolia* (Fabaceae) e portanto, muitas adulterações são comumente encontradas no comércio de plantas medicinais (LEITE *et al.*; 2001).

As espécies *M. aquifolium*, *S. bomplandii*, *Z. ilicifolia* são tradicionalmente usadas na medicina como analgésicos e antiulcerogênicos (DI STASI *et al.*; 2001), com o mesmo uso tradicional da verdadeira “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia*). A eficácia e segurança dessas espécies foram confirmadas por estudos farmacológicos e toxicológicos. Sendo que apesar do extrato de *Z. ilicifolia* produzir

efeitos antiulcerogênicos, este produziu efeitos tóxicos agudos (GONZALES *et al.*; 2001).

Estudos fitoquímicos realizados com *Z. ilicifolia* mostrou a presença de glicosídeos cianogênicos, o que torna um fator preocupante já que esta é considerada uma planta medicinal e adulterante de *M. ilicifolia*. Sendo assim, a informação química obtida é importante não somente para a correta compreensão e utilização popular da espécie, mas também para uma futura validação desses compostos como marcadores na avaliação da infusão de espécies de *Maytenus* e seus adulterantes (LEITE *et al.*; 2001).

As raízes da *M. ilicifolia* são uma importante fonte de metabólitos especiais, destacando-se os triterpenos quinonametídeos e os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, os quais são considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae (CORSINO *et al.*; 1998; LIÃO *et al.*; 2003).

Essas duas classes de metabólitos secundários exibem um amplo espectro de atividades biológicas. Os triterpenos quinonametídeos, pristimerina e maitenina, apresentam atividades antioxidantes (CORSINO *et al.*; 2003; CARVALHO *et al.*; 2005; SANTOS *et al.*; 2010), antibiótica (MOUJIR *et al.*; 1990) e antiproliferativa (COSTA *et al.*; 2008), enquanto os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos apresentam atividade citotóxica (RODRÍGUES *et al.*; 2005) e anti-HIV (DUAN *et al.*; 2000).

### **1.3 CLAE e técnicas hífenadas – descrição da importância da técnica e vantagens das técnicas hífenadas**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no UV é uma das técnicas analíticas mais versáteis, pois permite a separação de uma classe de composto, bem como sua detecção. Devido a essas características, bem como o desenvolvimento de várias fases estacionárias com o passar dos anos, tornou a técnica amplamente disseminada e aceita. A técnica tem inúmeras utilizações em várias áreas, que vão desde a medicina diagnóstica até o descobrimento de novos fármacos (FARIA *et al.*; 2009; HIMMELSBACH; 2012).

A forma mais tradicionalmente utilizada da CLAE é a cromatografia em fase reversa, onde a fase estacionária apresenta menor polaridade que a fase móvel. Essa forma de trabalho consiste por aproximadamente 85% das aplicações encontradas para a técnica (FARIA *et al.*; 2009).

Uma fase reversa apolar consiste geralmente de moléculas orgânicas ligadas a um átomo de silício, como exemplo o octadecilsilano. Porém a ligação de outros componentes a sílica, como metais e outros polímeros, conferem especificidades específicas, permitindo uma extraordinária gama de aplicações (FARIA *et al.*; 2009).

Um segundo elemento importante para um sistema de CLAE, além da determinação de fases, seria a seleção de uma técnica de detecção. Os detectores mais usuais encontrados são espectrofotômetros, onde se destacam os que apresentem faixa de trabalho na região do UV e também do UV – Visível, sendo o detector de arranjo de diodos (DAD) um exemplo desse último modelo (MALVIYA *et al.*; 2010).

Os detectores espectrofotométricos conferem a capacidade de detecção de várias substâncias, principalmente se tratando do DAD que permite até mesmo a determinação de algumas classes de compostos pelo espectro de absorção específico. Esses detectores também permitem a capacidade de quantificação dos compostos separados e detectados (MALVIYA *et al.*; 2010).

Apesar dessas características, detectores espectrofotométricos não permitem a determinação de uma substância específica desconhecida em uma mistura, com grau de confiabilidade aceitável. Para resolver essa questão, a técnica CLAE foi conjugada a outras ferramentas de determinação estrutural, como o espectrômetro de massas e aparelhos de ressonância magnética nuclear, gerando a CLAE-EM e CLAE-RMN, criando assim as chamadas técnicas hifenadas (LACOURSE; 2002).

A vantagem dessas técnicas consiste na separação de uma mistura de substâncias desconhecidas, por CLAE, e após a separação a determinação de cada composto da mistura, abrindo assim um vasto campo para aplicação nas mais diversas áreas (LI *et al.*; 2011.)

No referido trabalho pretendeu-se desenvolver um método cromatográfico que revele de maneira representativa, o perfil cromatográfico dos principais metabólitos especiais presentes nas raízes de *M. ilicifolia* e fornecer subsídios preliminares para futuros estudos de quantificação.

## 2. OBJETIVOS

- Identificar e isolar os principais metabólitos principais presentes nas raízes de *Maytenus ilicifolia* e;

- Otimizar condições cromatográficas, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para análise simultânea dos triterpenos quinonametídeos e alcaloides piridínicos sesquiterpênicos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal**

As plantas de *Maytenus ilicifolia* foram previamente coletadas na fazenda experimental da UNAERP (Universidade de Ribeirão Preto), Campus de Ribeirão Preto e foram mantidas em casa de vegetação no Instituto de Química de Araraquara. A identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Rita Maria de Carvalho do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas. Os exemplares estão depositados no herbário da UNICAMP (HPM-BR 0059).

#### **3.2 Solventes utilizados**

Os solventes utilizados nos processos de extração foram das marcas Mallinckrodt e Merck P. A.

Para as separações por CLAE utilizou-se (metanol) de grau CLAE e marca J. T. Baker<sup>®</sup>. A água ultra pura empregada foi obtida via osmose reversa em aparelho Millipore.

### 3.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Esta técnica foi empregada na análise comparativa da partição DCM e das frações obtidas no decorrer do fracionamento cromatográfico do extrato das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus ilicifolia*.

As cromatoplasmas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 PF<sub>254</sub>, com indicador de fluorescência em água destilada, na proporção de 1:2 (m:v) sobre placas de vidro, obtendo-se 25 mm de espessura de adsorvente através da utilização de espalhador Quickfitt<sup>®</sup>. Após a preparação das cromatoplasmas, estas foram ativadas em estufa por 30 minutos.

**Revelação das cromatoplasmas:** cada cromatoplasma foi revelada por meio de um ou mais dos métodos físicos e químicos descritos abaixo:

**(A)** Inspeção em luz ultravioleta: as cromatoplasmas foram expostas a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.

**(B)** Solução de anisaldeído: aproximadamente 5,0 mL de solução de anisaldeído (0,5 mL de anisaldeído + 10,0 mL de ácido sulfúrico concentrado + 85,0 mL de MeOH) foi preparada com a adição dos reagentes em banho de gelo. Tal solução foi acondicionada em vidro âmbar e armazenada à 8 °C.

Para a revelação de cromatoplasmas, borrifaram-se pequenas alíquotas e então, estas foram colocadas em estufas à 120 °C.

**(C)** Revelador de Dragendorff (revelação de substâncias nitrogenadas gerais)

Solução A: foi preparada por simples solubilização do sal em meio aquoso ácido (0,85 g de subnitrato de bismuto + 10,0 mL de HOAc + 40,0 mL de água destilada);

Solução B: 8,0 g de iodeto de bismuto dissolvido em 20,0 mL de água.

Para a preparação do revelador de Dragendorff, tomou-se do estoque, 5,0 mL da solução A e misturou-se à 20,0 mL da solução B.

### **3.4 Tratamento das amostras para análises por CLAE**

Foram pesados 10 mg de amostra de interesse e dissolveu-se em 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (95:5). Essa amostra foi então eluída em uma coluna de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 3 cm de fase estacionária (LiChroprep RP-18, 25-40 µm, Merck). A coluna foi ambientada com MeOH:H<sub>2</sub>O (95:5) e logo em seguida a amostra foi aplicada, sendo então eluída com os seguintes sistemas de solventes: 4,0 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (95:5), 5,0 mL de MeOH e 5,0 mL de DCM, tendo-se desta forma 3 frações. A uma alíquota de 0,5 mL da fração MeOH:H<sub>2</sub>O (95:5) adicionou-se 1,0 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1). Essa solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm e em seguida analisada por CLAE.

### **3.5 Equipamentos utilizados nas análises das amostras por CLAE**

Nas análises dos extratos, frações de partição e substâncias puras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram utilizadas os seguintes cromatógrafos analíticos:

- cromatógrafo sistema quaternário VarianPro Star, modelo 240, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo 330, auto injetor Varian Pro Star, modelo 410; coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5µm (250 x 4,6 mm).



- cromatógrafo sistema ternário Shimadzu, modelo LC-10 AD, controlador CBM 10 A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M 10 AVP, coluna Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C<sub>18</sub> 5µm (250 x 4,6 mm).

Nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa foi utilizado o cromatógrafo preparativo ternário Varian Star Dynamax, modelo 320, detector UV-Vis; coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 10µm (250 x 21,2 mm).

### 3.6 Métodos espectrométricos

**(A)** Para a identificação das substâncias isoladas foram utilizados padrões autênticos de alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e triterpenos quinonametídeos isolados pela Dra. Vânia Ap. F. F. M. Santos. Na elucidação estrutural, foram empregadas as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear mono e bidimensional. Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian INOVA 500<sup>®</sup>, operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e em 125 MHz na frequência do carbono. O padrão interno utilizado como referência foi tetrametilsilano (TMS) e os solventes deuterados CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD das marcas Aldrich e Merck.

**(B)** Os espectros de massas de baixa e alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Modelo ultrOTOFG – ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker), no modo positivo.

## **4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

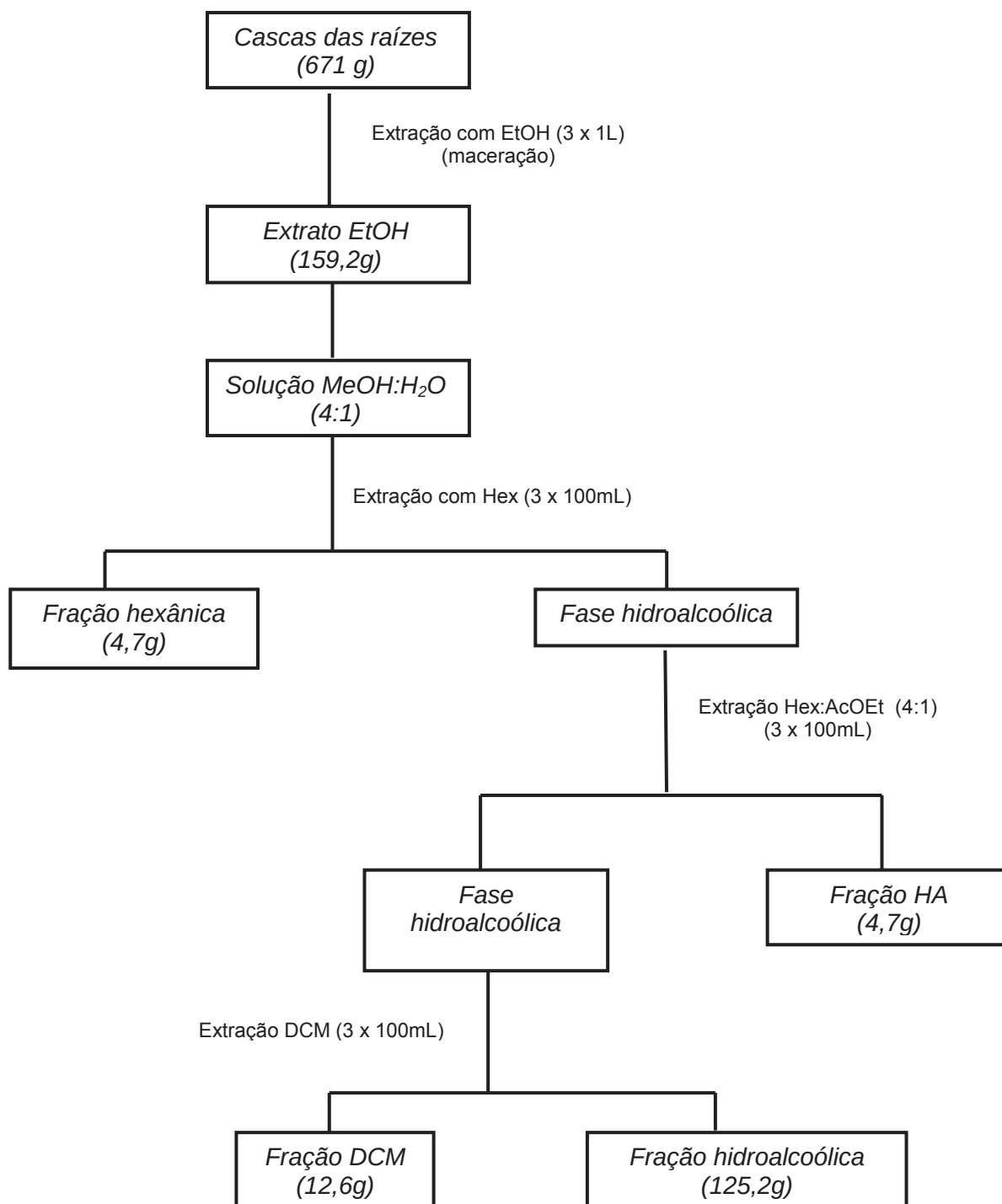
### **4.1 Análise das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus ilicifolia***

O estudo fitoquímico das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus ilicifolia* foi realizado tendo como objetivo principal a identificação e o isolamento dos principais metabólitos especiais.

### **4.2 Preparação do extrato das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia***

As cascas das raízes coletadas foram primeiramente secas em estufa a 40° C e, em seguida, o material seco foi particularizado por trituração em moinho de facas. Foram obtidos 671 g de material vegetal seco.

O material obtido foi submetido a extração por maceração com etanol (EtOH), sendo realizadas 3 extrações consecutivas. Posteriormente, o extrato EtOH foi filtrado e o solvente removido por meio de rotaevaporador. O extrato seco obtido foi então submetido a partição líquido-líquido com: hexano (Hex), hexano e acetato de etila (AcOEt) na proporção 4:1, e diclorometano (DCM). Foram utilizados 100 mL de solvente e realizadas 3 extrações consecutivas. Como resultado obteve-se as frações Hex (4,7g), HA (4,7g), DCM (12,6g) e hidroalcoólica (125,2g). O esquema das etapas descritas são apresentadas no esquema 1 página 26.

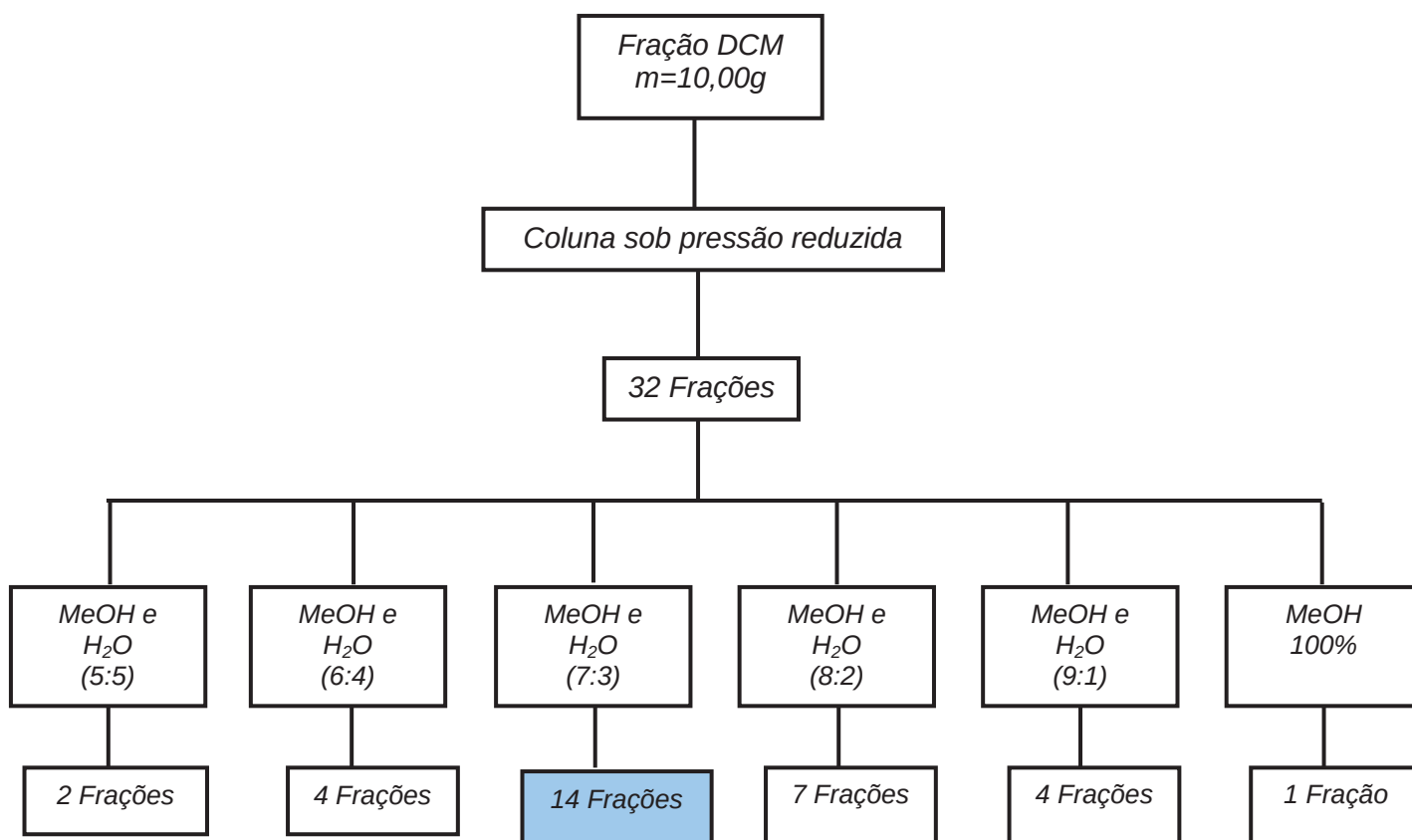


**Esquema 1-** Partição líquido-líquido do extrato etanólico das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus ilicifolia*.

### **4.3 Fracionamento cromatográfico da fração DCM das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia***

As frações obtidas a partir da partição líquido-líquido, frações: HA (4,7g), DCM (12,6g) e hidroalcoólica (125,2g) foram analisadas por CLAE-DAD no modo gradiente, onde os cromatogramas gerados foram analisados nos comprimentos de onda de 231 e 420 nm, característico dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e dos triterpenos quinonametídeos, respectivamente. Após análise por CLAE foi selecionado para posterior fracionamento, a fração de partição DCM, a qual evidenciou bandas características dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos corroboradas pelo máximo de absorção em 231 nm.

Assim, dos 12,6g da fração DCM, 10,0g foram submetidos a fracionamento em cromatografia de coluna (CC) à pressão reduzida, em fase reversa, onde sílica C18 foi utilizada como fase estacionária. Foi utilizada uma coluna de 20 x 4,5 cm, empregando como suporte sílica C<sub>18</sub> com pastilha de carvão (2 cm). Como solventes foram utilizados água e metanol (MeOH), em ordem decrescente de polaridade, resultando um total de 36 frações de 200 mL cada, conforme o esquema 2 página 28.



**Esquema 2-** Fracionamento cromatográfico da fração DCM das cascas das raízes da planta adulta de *Maytenus*

Todas as frações foram secas em evaporador rotativo e submetidas à análise preliminar por meio da técnica de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando diferentes sistemas de solventes e como reveladores, o anisaldeído e o reagente de Dragendorff.

Das 14 frações coletadas (M70.1 – M70.14) quando eluídas com 70 % de MeOH, as subfrações (M70.2 – M70.5) apresentaram afinidade pelo reagente Dragendorff, quando analisadas através de CCDC empregando como sistema de solventes Hex:AcOEt, na proporção de 1:4. Esta análise preliminar permitiu inferir a presença de substâncias nitrogenadas.

No entanto, não foi verificada diferença significativa no R<sub>f</sub> em CCDC dessas subfrações. Sendo assim, essas subfrações foram analisadas por CLAE-DAD no modo gradiente e posteriormente no modo isocrático. Essa análise teve como objetivo estabelecer condições isocráticas com o intuito de fracioná-las e purificá-las.

A subfração M70.5 foi submetida a CLAE-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 10 µm (250 x 21,2 mm); eluente ACN:H<sub>2</sub>O (11:9); vazão de 16 mL min<sup>-1</sup>; tempo de análise de 60 min e λ= 254 nm) e resultou na coleta de 6 frações. Essas foram submetidos á análise por CLAE-DAD e a substância referente à fração 5 apresentou-se pura e esta foi denominada de substância **1**.

A subfração M70.2 foi submetida a CLAE-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 10 µm (250 x 21,2 mm); eluente ACN:H<sub>2</sub>O (3:2); vazão de 15 mL min<sup>-1</sup>; tempo de análise de 30 min e λ= 254 nm). Foram coletadas 2 frações, as quais foram analisadas por CLAE-DAD, sendo que a fração 2 apresentou-se pura, esta foi denominada de substância **2**.

#### **4.4 Análise das raízes da planta jovem de *Maytenus ilicifolia***

O estudo fitoquímico das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia* foi realizado com o objetivo de identificar e isolar outros metabólitos especiais descritos na literatura e considerados marcadores quimiotaxonômicos da família em estudo.

#### 4.5 Preparação e fracionamento do extrato das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*

O estudo fitoquímico das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia* apresentou como metabólito majoritário, os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Posteriormente, a análise por CLAE-DAD do extrato das raízes da planta jovem (3 anos) mostrou o acúmulo dos triterpenos quinonametídeos como metabólito majoritário, sendo este selecionado para o isolamento desta classe de substância.

As raízes foram congeladas em N<sub>2</sub> líquido, trituradas utilizando gral e pistilo, e como solvente extrator foi utilizado o DCM.

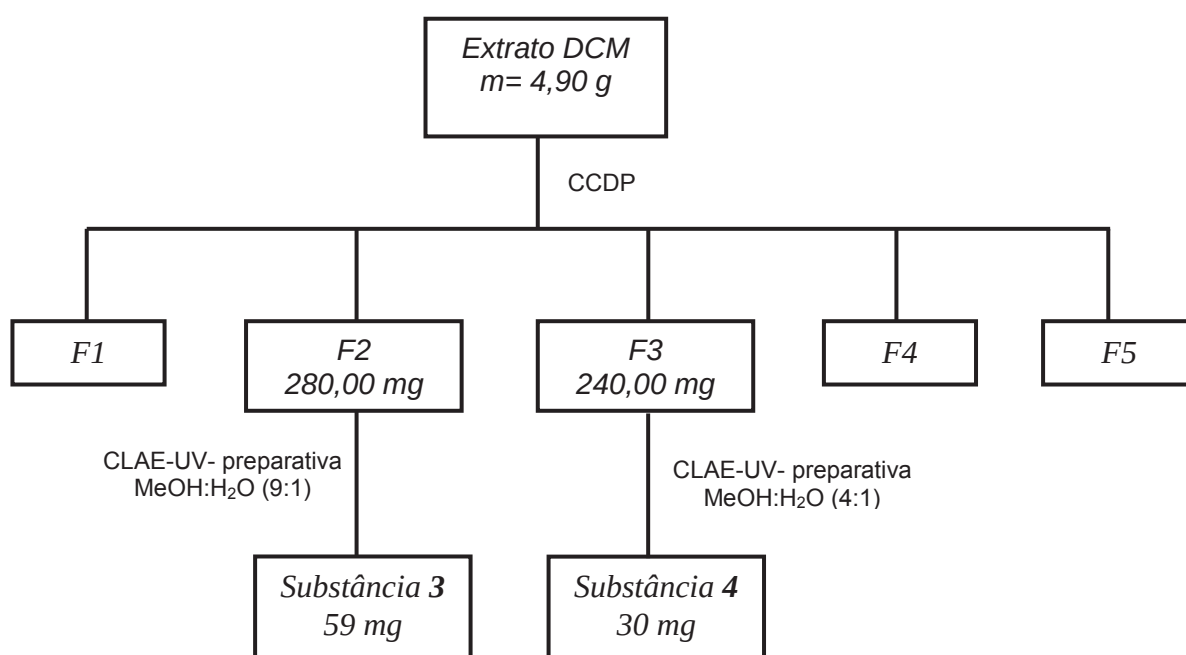
Posteriormente, o extrato DCM foi filtrado e evaporado obtendo-se 4,90 g de extrato, o fracionamento encontra-se descrito no esquema 3 página 31.

Alíquotas do extrato foram fracionadas por CCDP empregando como sistema de solventes Hex:AcOEt na proporção de 7:3. Estas placas foram eluídas três vezes. As 5 frações coletadas foram submetidas à extração em ultrassom utilizando o MeOH:AcOEt na proporção de 9:1, filtradas à vácuo e concentradas.

Após análise e determinação da condição cromatográfica no modo isocrático por CLAE-DAD das frações coletadas, duas (F2 e F3) foram selecionadas para serem submetidas à purificação.

A fração F2 (280,0 mg) foi submetida à purificação por CLAE-UV preparativa (condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 10 µm (250 x 21,2 mm); eluente: MeOH: H<sub>2</sub>O (9:1); vazão 10 mL. min<sup>-1</sup>, tempo de análise: 40 min e  $\lambda$  = 254 nm). A purificação resultou na coleta de 6 frações das quais a fração F2.5 (59,0 mg), após análise por CLAE-DAD apresentou-se pura. Esta foi denominada de substância **3**.

A fração F3 (240,0 mg) também foi submetida à análise por CLAE-UV preparativa (Condição: coluna Phenomenex® C<sub>18</sub>, 10µm (250x21,2 mm); eluente: MeOH: H<sub>2</sub>O (4:1); vazão 12 mL. min<sup>-1</sup>, tempo de análise: 30 min e  $\lambda$  = 254 nm) e foram coletadas 5 frações. Foi observado por CLAE-DAD que a fração coletada F3.5 apresentava algumas impurezas, sendo assim, esta foi submetida a repurificação obtendo-se a substância **4**.



**Esquema 3** - Isolamento e purificação dos triterpenos quinonametídeos da planta jovem de *Maytenus ilicifolia*.

#### 4.6 Otimização das condições cromatográficas

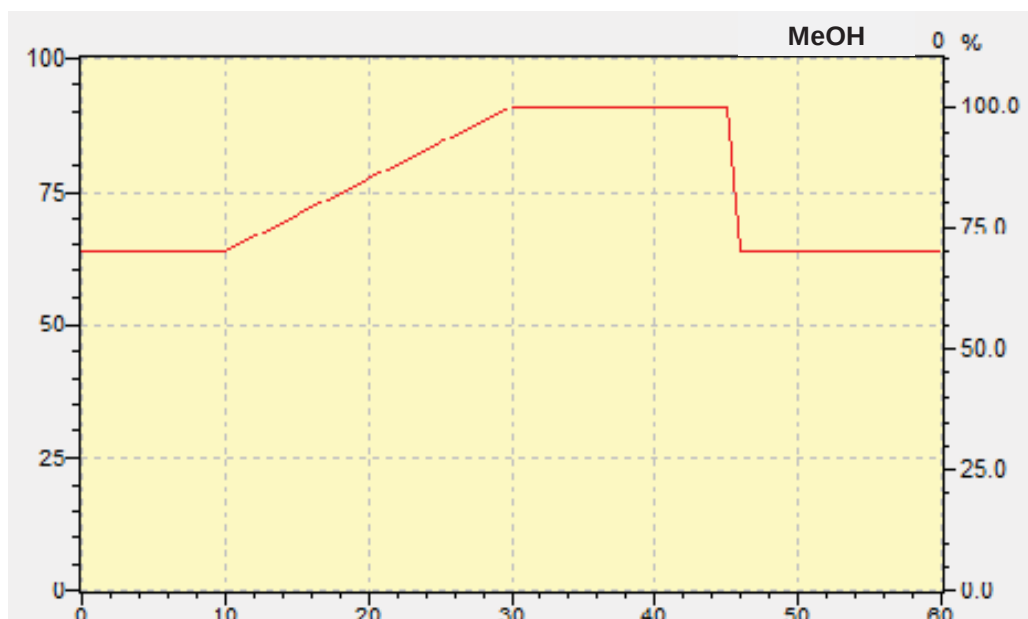
A análise do perfil cromatográfico das cascas das raízes da planta adulta por CLAE-DAD levou a identificação de alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. No entanto, a análise por CLAE-DAD das raízes da planta jovem mostraram como



metabólitos majoritários os triterpenos quinonametídeos e como metabólitos minoritários os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos.

Diante deste fato, decidiu-se otimizar as condições cromatográficas, visando a obtenção de um cromatograma onde fosse possível observar as duas classes de metabólitos principais com uma boa resolução dos picos e em uma etapa futura quantificar simultaneamente esses dois marcadores quimiotaxonômicos da família Celastraceae.

Utilizou-se de uma rampa cromatográfica compilada na figura 1, p. 32 Iniciou-se com 70% de MeOH (até 10 min – eluição isocrática) passando para 100% de MeOH (em 20 min – eluição gradiente). Essa análise proporcionou a melhor resolução dos constituintes dos extratos.



**Figura 1** – Condição cromatográfica em rampa gradiente

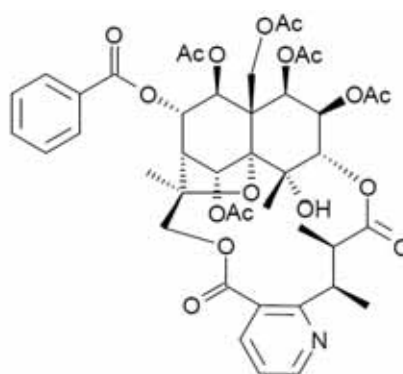
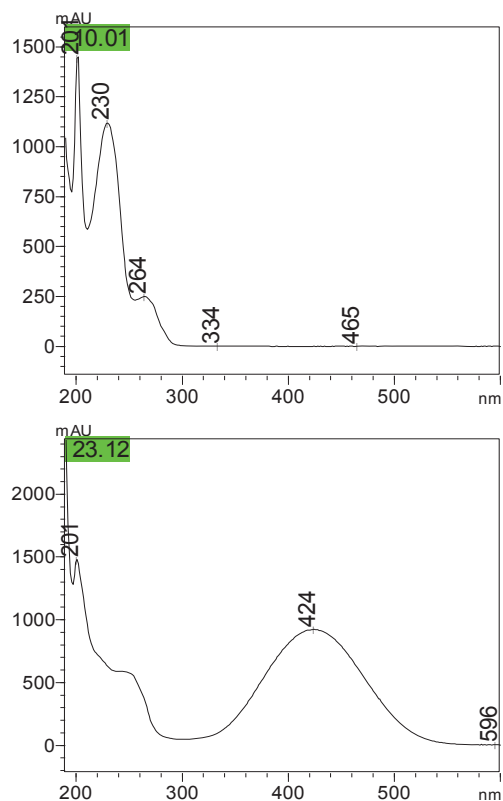
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise por CLAE-DAD e purificação dos constituintes das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia*

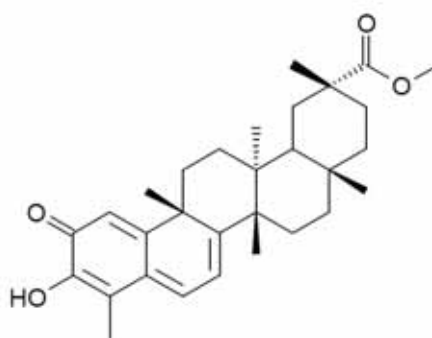
Com o intuito de investigar o perfil cromatográfico das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia* para posterior identificação e isolamento dos principais metabólitos especiais, o extrato etanólico, a fração de partição DCM e HA foram analisados por CLAE-DAD. Essa análise permitiu identificar picos majoritários referentes exclusivamente à classe dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, corroborados esses pela absorção no UV em 231 nm. A figura 2 p. 34, demonstra o espectro de absorção no UV característico dos alcaloides piridínicos sesquiterpínicos e dos triterpenos quinonametídeos.

Os cromatogramas referentes ao extrato etanólico e as frações de partição DCM e HA analisados em  $\lambda = 231$  nm são apresentados nas figuras 3-4, p. 35-37.

Os cromatogramas analisados por CLAE-DAD em  $\lambda = 420$  nm (figuras 3-5, p. 18-20) não mostraram a presença bandas no UV, referente à classe dos triterpenos quinonametídeos.

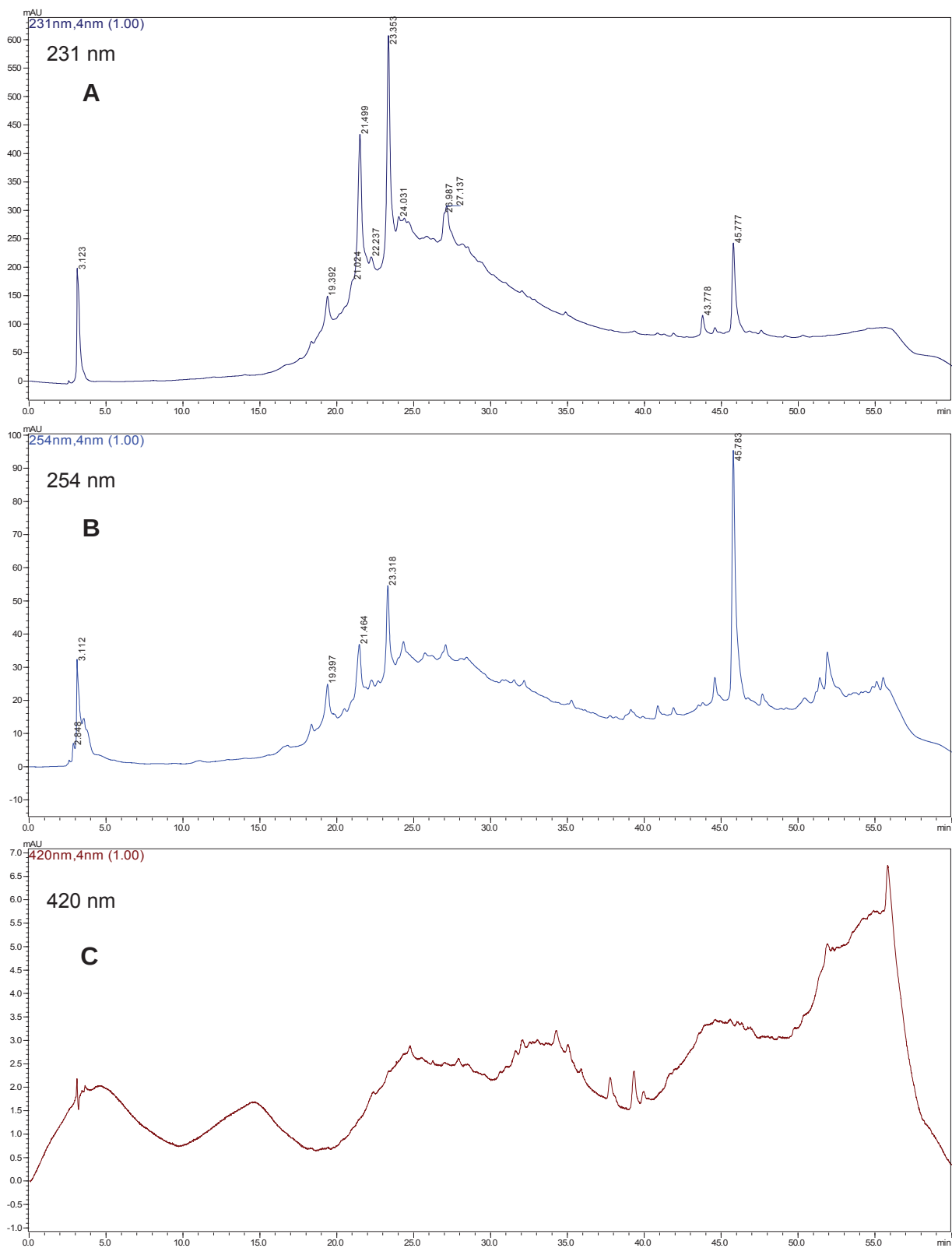


A

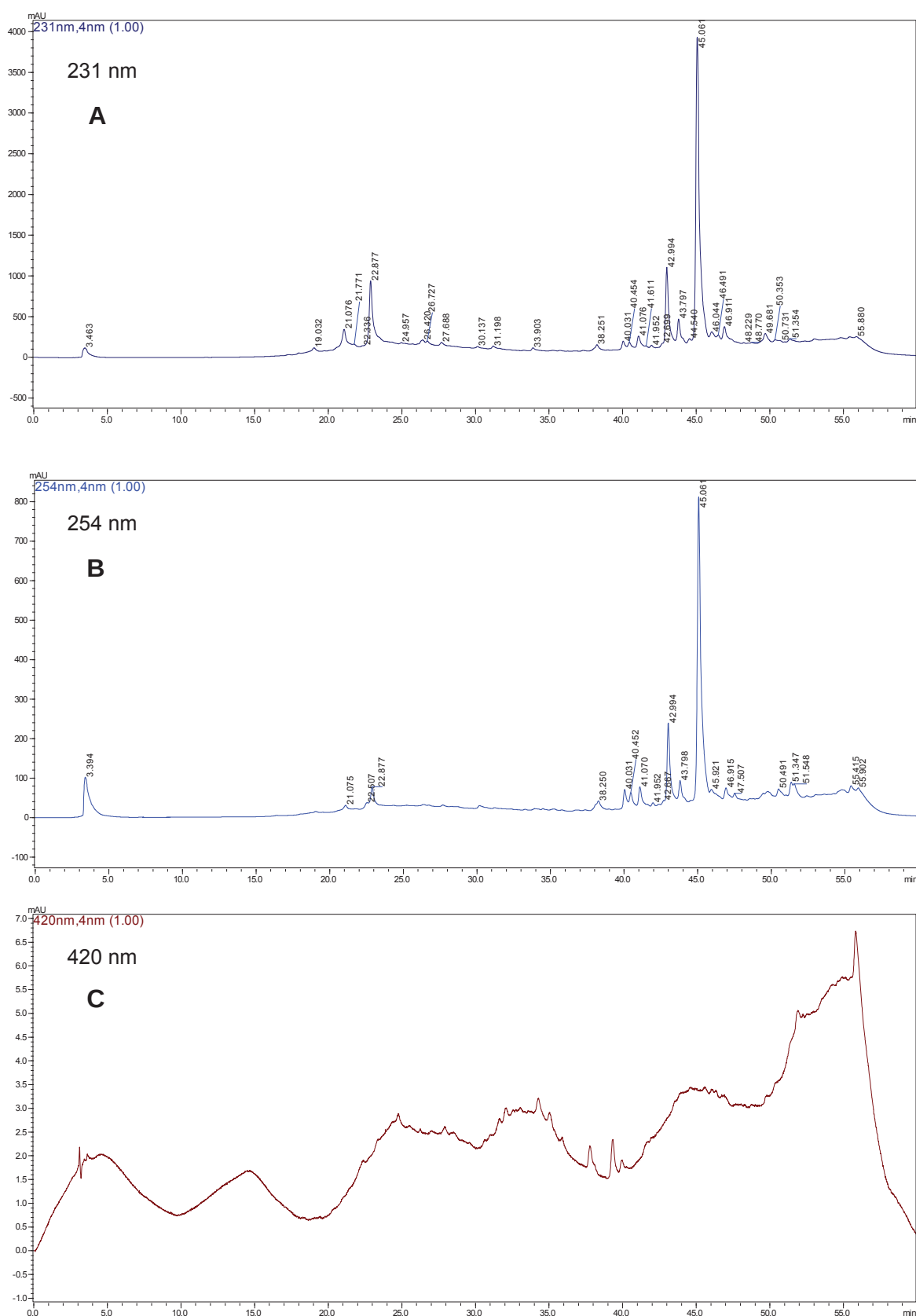


B

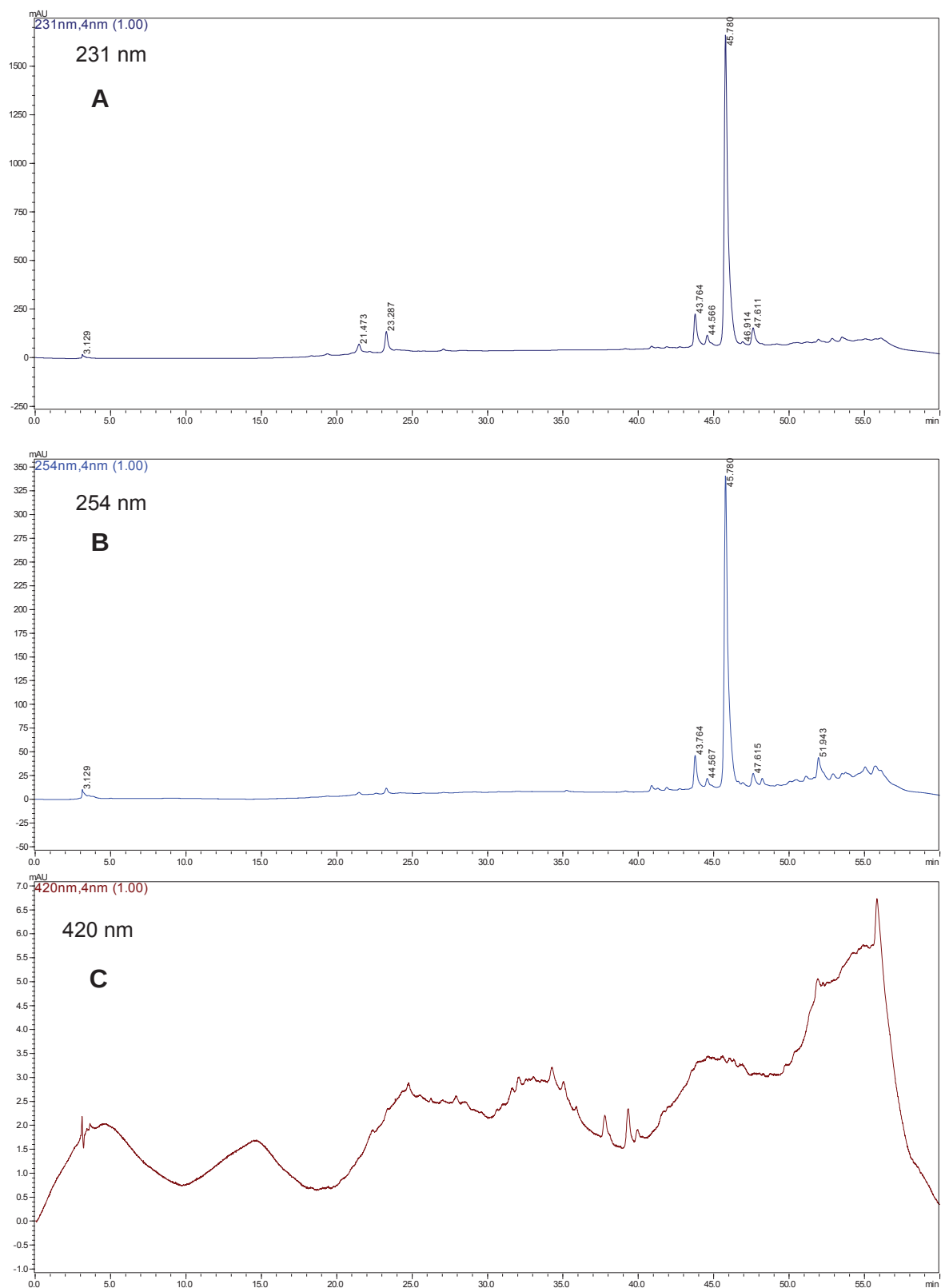
**Figura 2 – (A)** Espectro de absorção máxima no UV dos alcaloides piridínicos sesquiterpênicos, **(B)** espectro de absorção máxima dos triterpenos quinonametídeos



**Figura 3** – Extrato etanólico analisado por CLAE-DAD em comprimentos de onda **(A)**  $\lambda = 231$  nm, **(B)**  $\lambda = 254$  nm, **(C)**  $\lambda = 420$  nm.



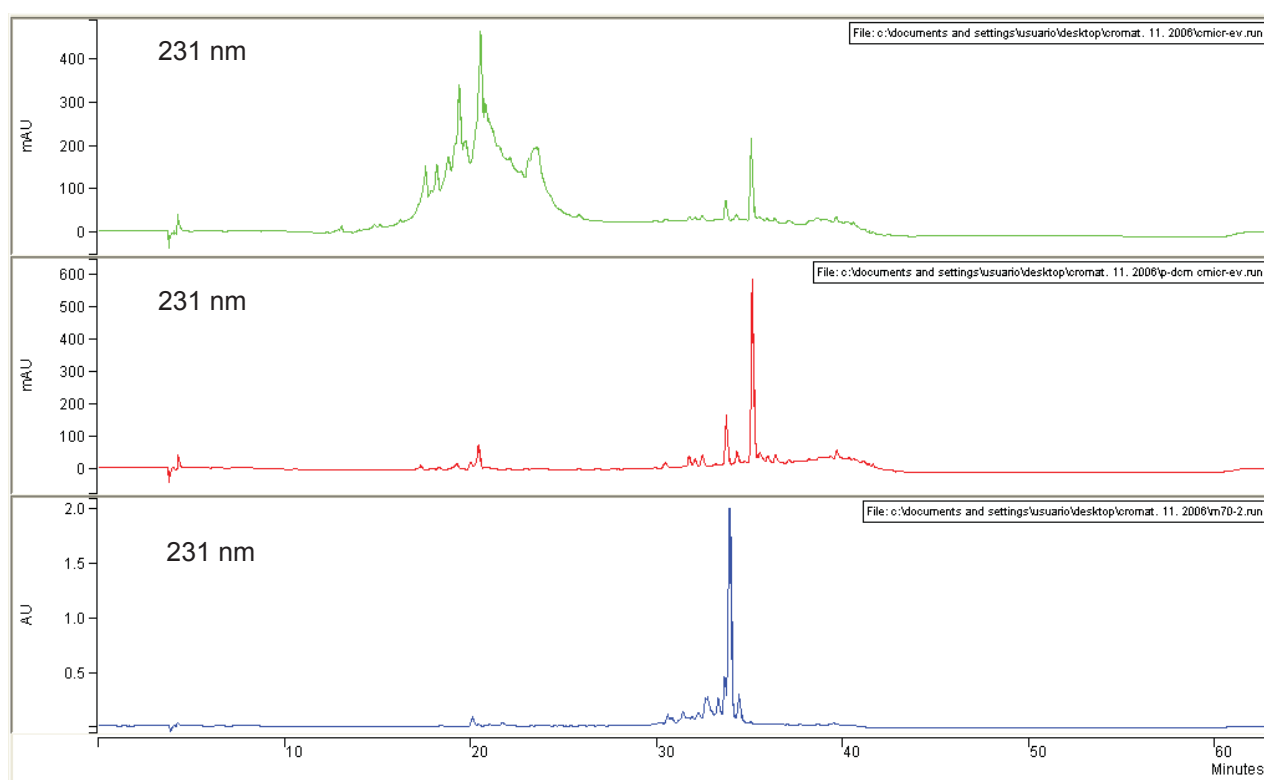
**Figura 4** – Fração de partição DCM analisado por CLAE-DAD em comprimentos de onda  
**(A)**  $\lambda = 231$  nm, **(B)**  $\lambda = 254$  nm, **(C)**  $\lambda = 420$  nm.



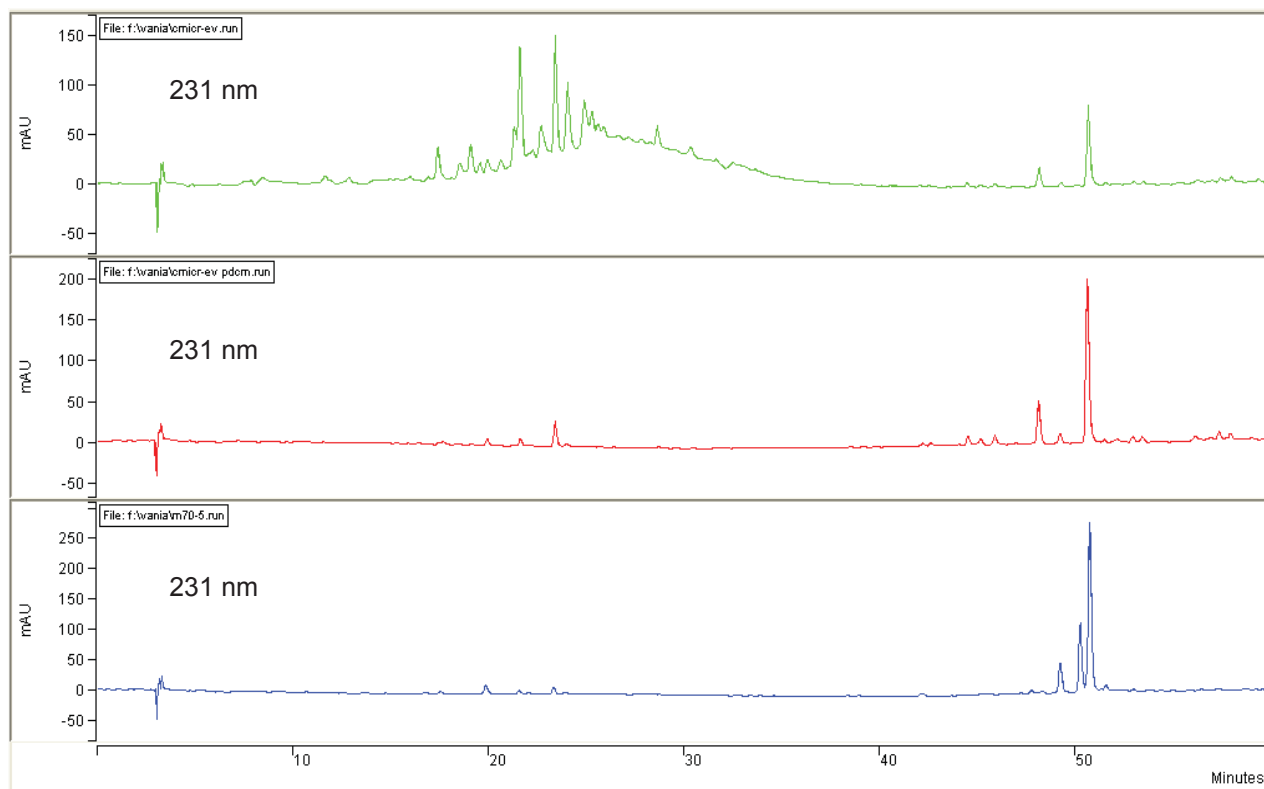
**Figura 5** – Fração de partição HA analisado por CLAE-DAD em comprimentos de onda  
(A)  $\lambda = 231$  nm, (B)  $\lambda = 254$  nm, (C)  $\lambda = 420$  nm.

Após fracionamento utilizando cromatografia de coluna (CC) à pressão reduzida, foram realizadas análises das frações obtidas após o fracionamento da fração DCM por CLAE-DAD. Após essa análise, foram selecionadas para posterior purificação as frações denominadas M70.2 e M70.5, respectivamente. Essas frações foram selecionadas por apresentarem picos majoritários com bandas de absorção no UV referentes à classe dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, isto é,  $\lambda = 231$  nm, e por apresentarem tempos de retenções distintos.

Os cromatogramas das frações selecionadas são mostrados nas figuras 6 e 7, p.38- 39 respectivamente.



**Figura 6:** (A) Cromatograma do extrato EtOH, (B) fração de partição DCM, (C) fração M70.2 das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia*, por CLAE-DAD no modo gradiente em  $\lambda = 231$  nm.

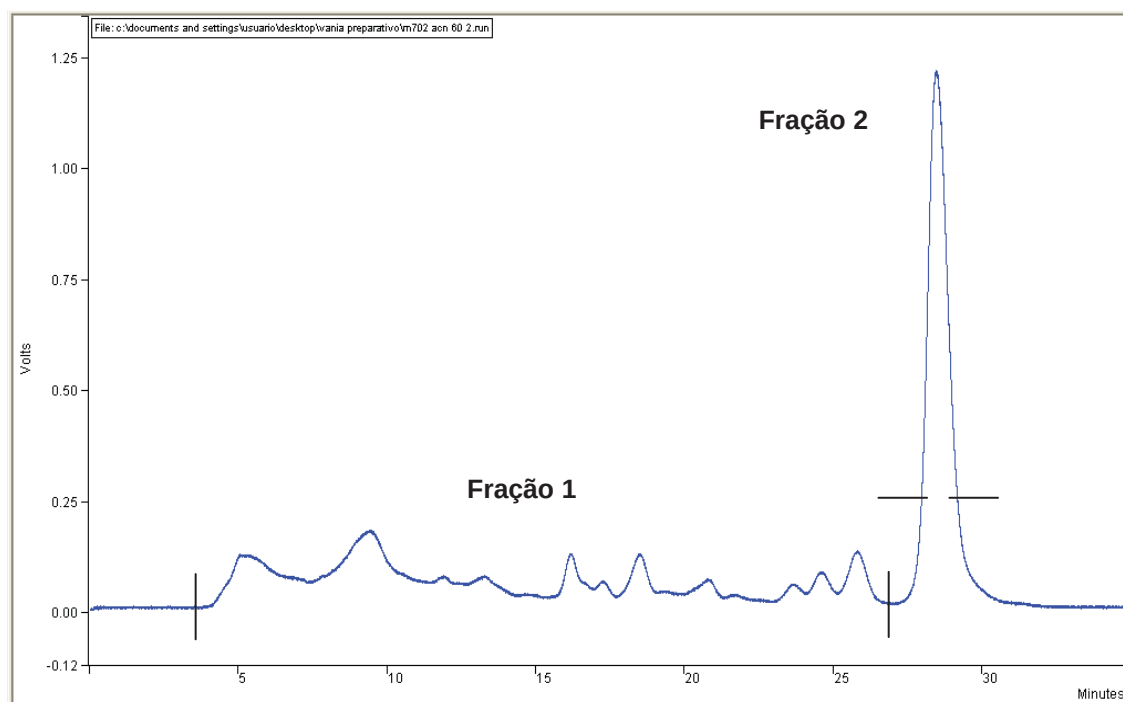


**Figura 7:** (A) Cromatograma do extrato EtOH, (B) fração de partição DCM, (C) fração M70.5 das cascas das raízes da planta adulta de *M. ilicifolia*, por CLAE-DAD no modo gradiente em  $\lambda = 231$  nm.

Visando o isolamento e purificação desses alcalóides, essas frações foram submetidas á CLAE-UV preparativa, para isso foram estabelecidas as condições isocráticas.

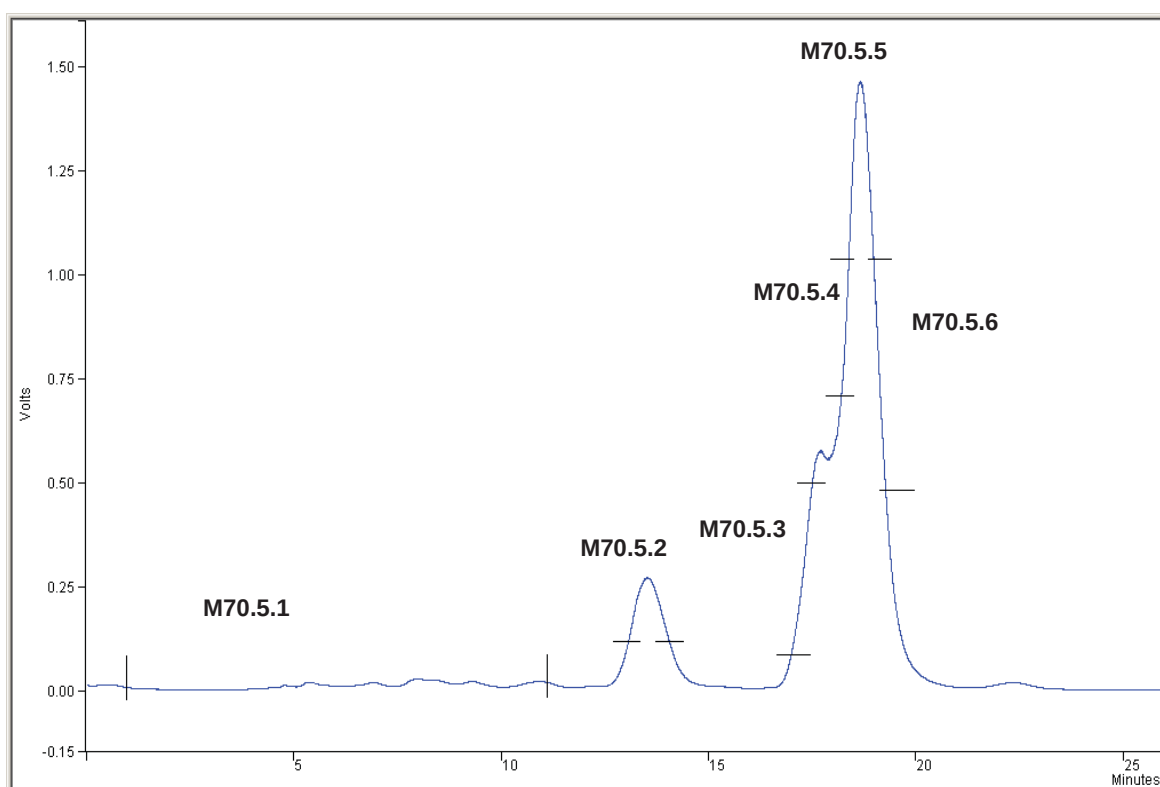
A subfração M70.2, figura 8, p. 40, foi submetida a CLAE-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 10  $\mu$ m (250 x 21,2 mm); eluente ACN:H<sub>2</sub>O (3:2); vazão de 15 mL min<sup>-1</sup>; tempo de análise de 30 min e  $\lambda = 254$  nm). Foram coletadas 2 frações, as quais foram analisadas por CLAE-DAD, sendo que a fração 2 apresentou-se pura, esta foi denominada substância **2**.





**Figura 8** :Fração M70.2. Condição: coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> 10 µm (250 x 21,2 mm) modo isocrático, ACN:H<sub>2</sub>O (3:2), vazão: 10 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de análise 30 minutos.

A purificação da subfração M70.5 em escala preparativa levou a coleta de 6 frações, as quais foram nomeadas de M705.1 – M705.6, respectivamente. Essas frações encontram-se indicadas no cromatograma presente na figura 9 p. 41.



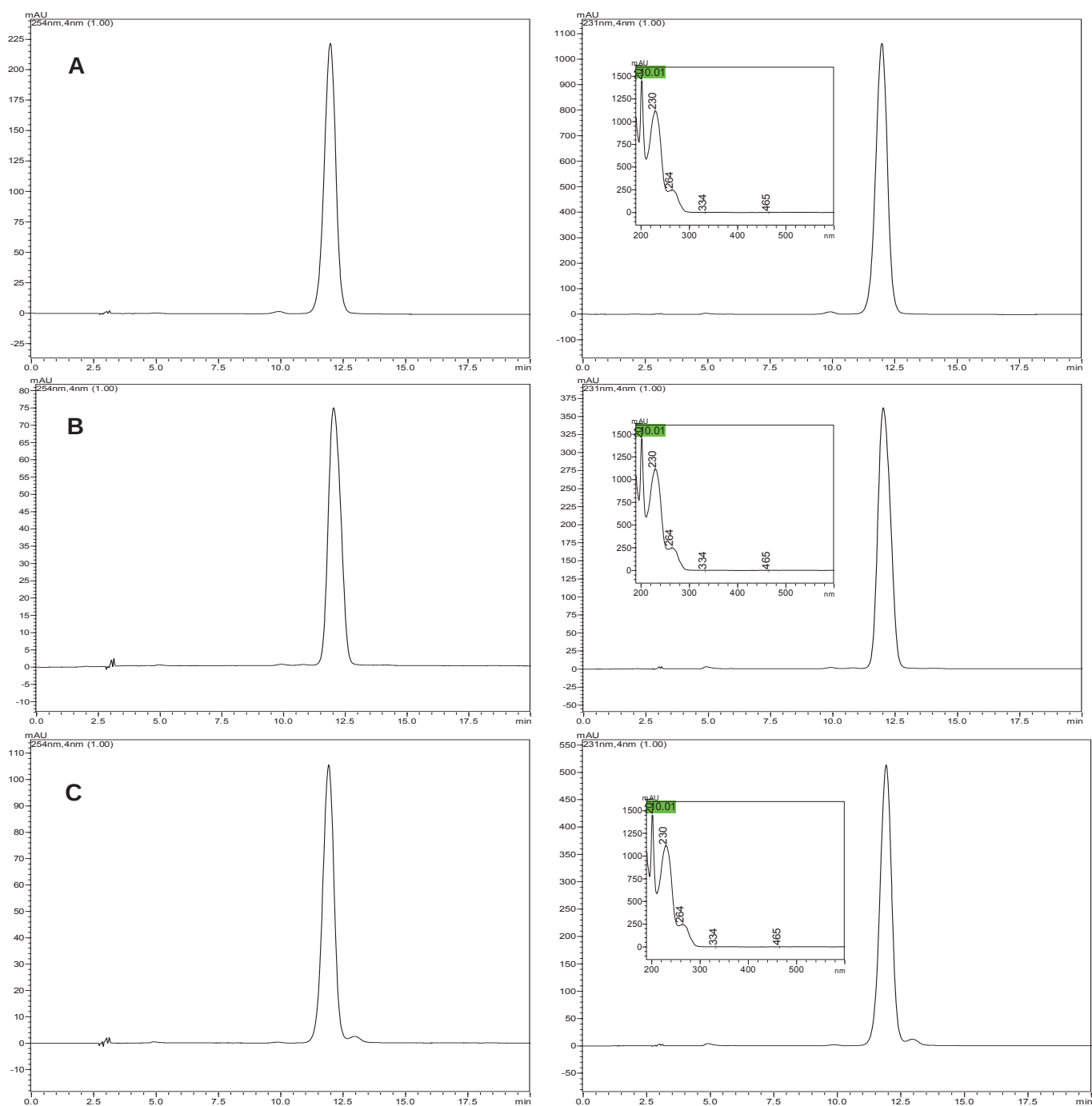
**Figura 9:** Fração M70.5. Condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 10  $\mu$ m (250 x 21,2 mm) modo isocrático, ACN:H<sub>2</sub>O (7:3), vazão: 10 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm, tempo de análise 20 minutos

Posteriormente, essas foram analisadas por CLAE-DAD visando à verificação da pureza das frações coletadas. O sistema de solventes foi substituído na tentativa de comprovar a pureza dos picos recolhidos, onde a condição otimizada foi o sistema MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1) em modo isocrático, 1mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 e 231 nm, tempo de análise 20 minutos.

Os cromatogramas das demais subfrações, M70.5.4 - M70.5.6, são apresentados na figura 10, p. 43 nos comprimentos de onda 254 e 231nm.

O comprimento de onda 254 nm foi escolhido para uma melhor verificação da pureza das frações, pois grande parte dos metabólitos especiais, e outras classes de substâncias, apresentam absorção nesse comprimento de onda, sendo assim melhores evidenciadas nesse comprimento de onda se presentes.

Assim sendo, pode-se observar nos cromatogramas, figura 10, p. 43, que dentre as subfrações analisadas, aquela que apresentou maior grau de pureza, onde para a determinação de pureza as amostras foram aplicadas na concentração 1 mg/mL e analisadas nos comprimentos de onda 231 e 254 nm, foi a fração M70.5.5 a qual foi nomeada de substância **1**.

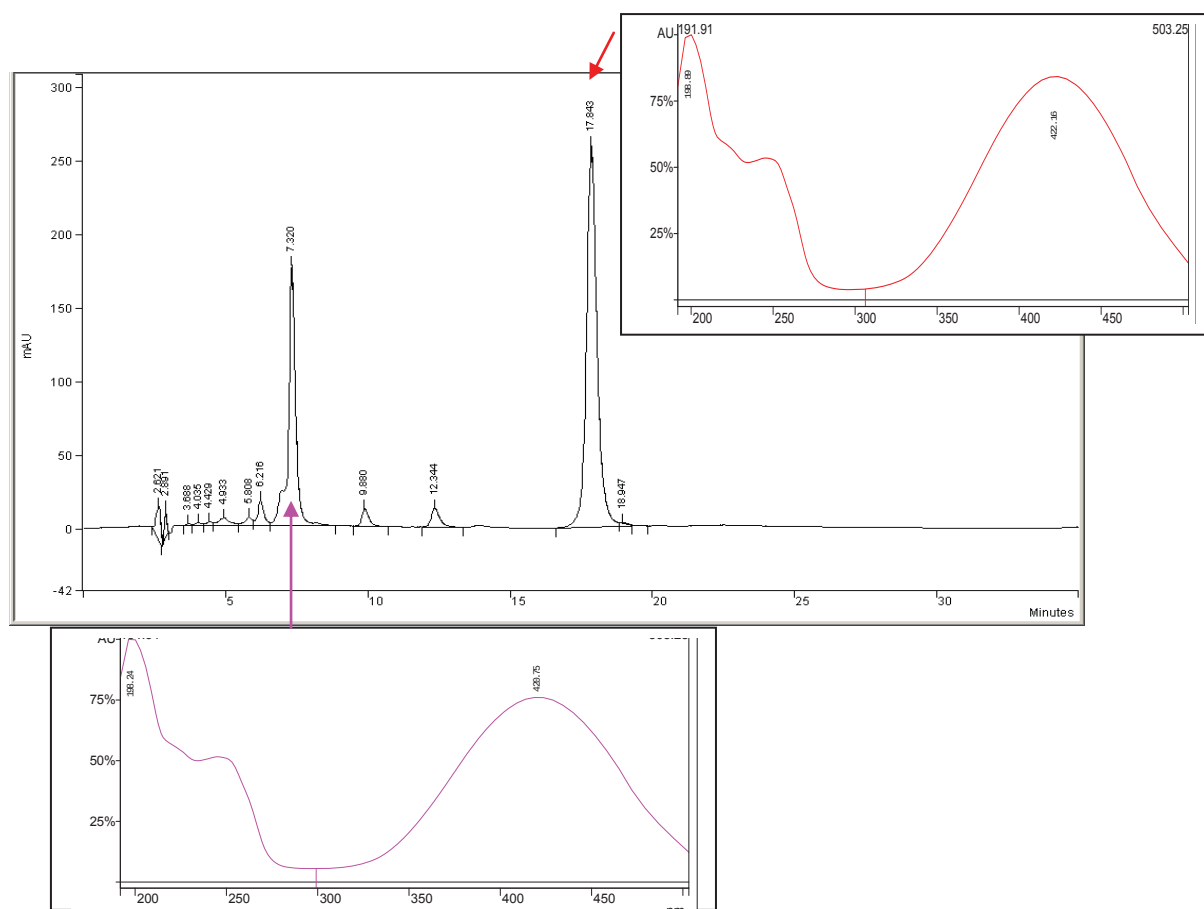


**Figura 10: (A) Fração M70.5.4, (B) Fração M70.5.5, (C) Fração M70.5.6.** Condição: coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm e  $\lambda$  = 231 nm, tempo de análise 20 minutos.

## 5.2 Análise por CLAE-DAD e purificação dos constituintes das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*

A análise por CLAE-DAD do extrato etanólico e da fração de partição DCM das cascas das raízes da planta adulta evidenciaram como metabólito exclusivo e majoritário os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Visando averiguar o perfil cromatográfico das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia* (2 anos) e identificar outros marcadores quimiotaxonômicos da família, foi realizada a análise por CLAE-DAD do extrato DCM da planta jovem de *M. ilicifolia*,

A partir da análise do cromatograma do extrato DCM foi possível observar dois picos majoritários apresentando bandas com absorção máxima no espectro de UV, características dos triterpenos quinonametídeos corroboradas pelo máximo de absorção em 420 nm. O cromatograma do extrato DCM das raízes da planta jovem, assim como as bandas de absorção máxima referente aos triterpenos quinonametídeos é apresentada na figura 11, p. 45.



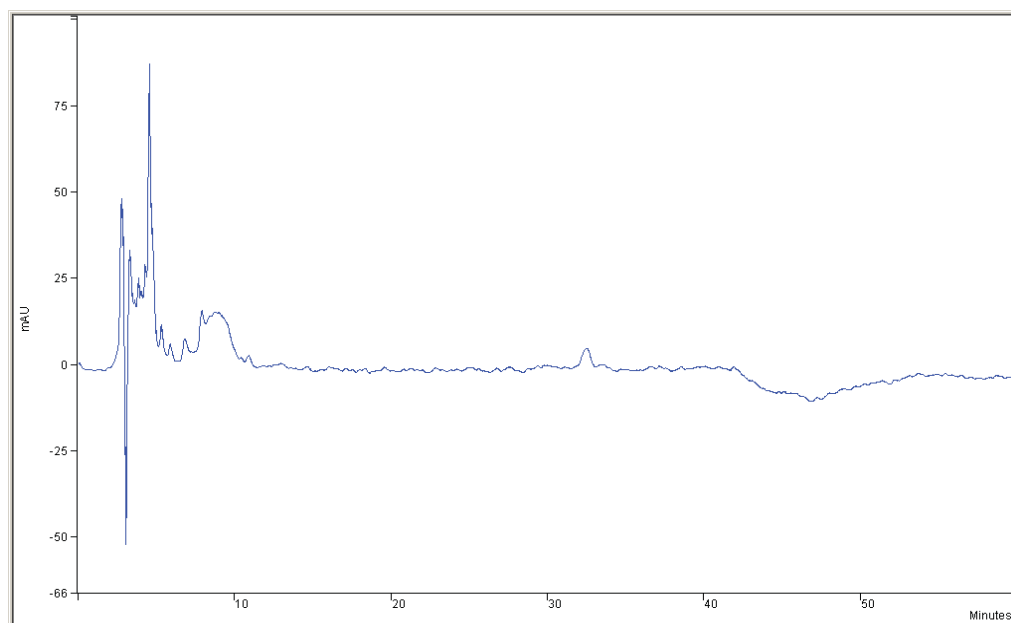
**Figura 11:** Cromatograma do extrato DCM das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*. Condição: coluna Phenomenex® Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm), modo isocrático ACN: H<sub>2</sub>O (85:15), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm e tempo de análise 20 minutos.

Após identificação dos triterpenos quinonametídeos, o extrato DCM das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia* foi submetido ao fracionamento por CDCC. Foram coletadas 6 frações, sendo todas submetidas à análise por CLAE-DAD. Essa análise teve como objetivo isolar e identificar as frações ricas no metabólito de interesse.

Nas figuras 12-17, p. 46-51 são apresentados os cromatogramas referentes as 6 frações coletadas após análise por CLAE-DAD.

As frações F1- F3 foram analisadas por CLAE-DAD, modo isocrático, sistema MeOH:H<sub>2</sub>O (4:1), coluna Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 10 µm (250 x 4,6mm), vazão de 1mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 e 420 nm, 60 minutos de análise. O comprimento de onda 254 nm foi selecionado por permitir um melhor acompanhamento da pureza das frações e o comprimento de onda 420 nm, por ser característico dos triterpenos quinonametídeos.

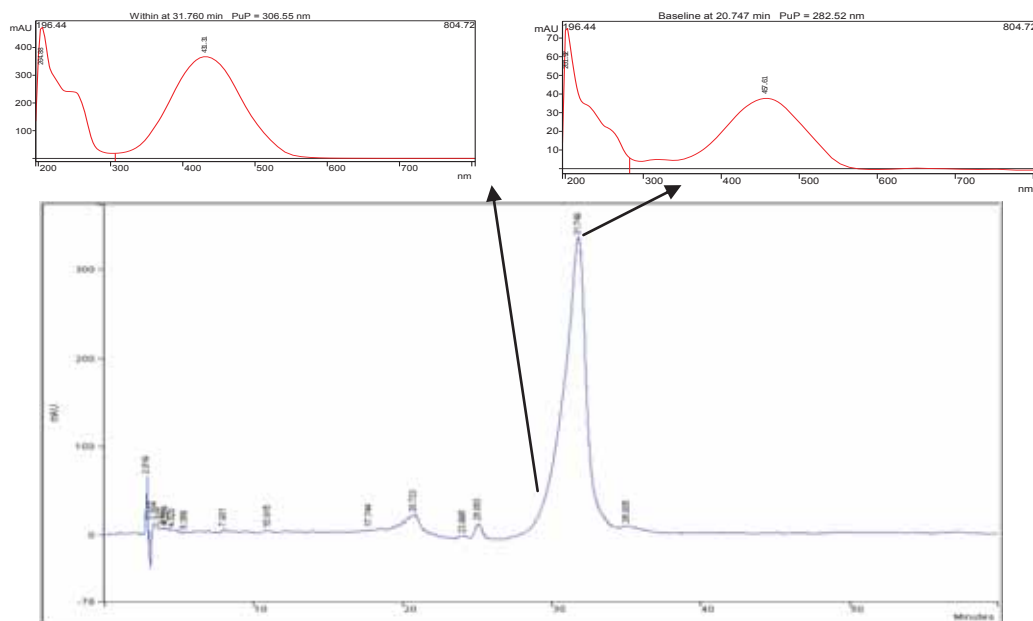
A fração F1 não apresentou resultados significativos nessa análise, como mostrado na figura 12, p. 46.



**Figura 12 :** Fração F1. Condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (4:1), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de análise 60 minutos

Na figura 13, p. 47 é mostrado o cromatograma referente á fração F2 onde foi possível observar um pico majoritário eluindo com tempo de retenção de 31,2 minutos e um pico minoritário eluindo com tempo de retenção 20,7 minutos. Ambos, picos apresentaram bandas de absorção máxima no UV característicos dos triterpenos quinonametídeos, corroborado pelo máximo de absorção em 420 nm.

Diante dessa análise e da aparente pureza mostrada por essa fração, esta foi escolhida para ser submetida à purificação em escala preparativa.

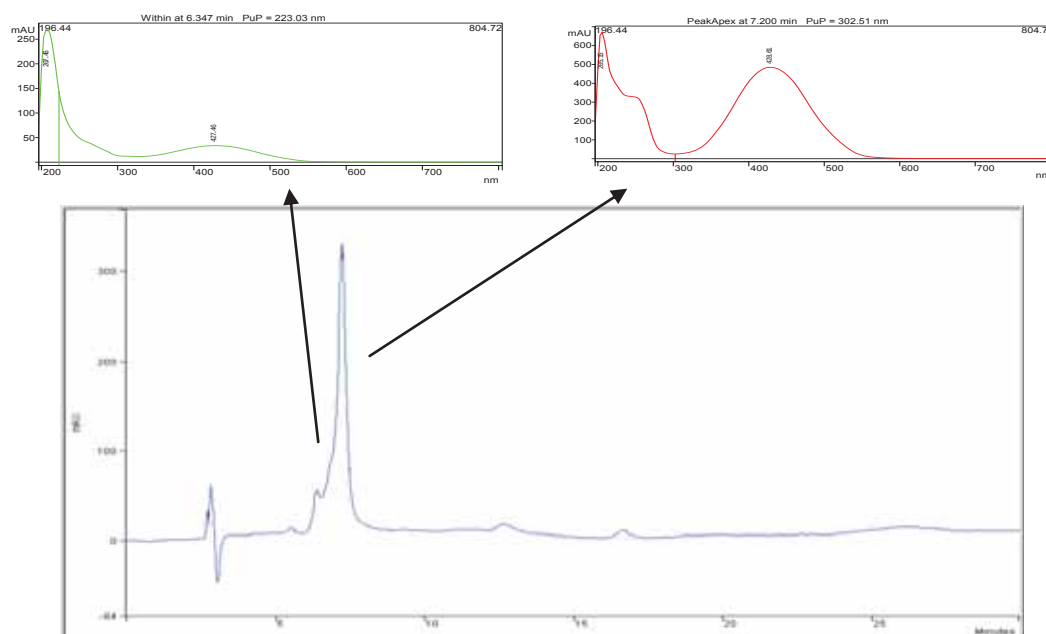


**Figura 13 :** Fração F2. Condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (4: 1), vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm, tempo de análise 60 minutos.

No cromatograma referente à fração F3, apresentado na figura 14, p. 48 observou-se um pico majoritário com tempo de retenção de 8 minutos e de uma substância co-eluído com tempo de retenção próximo ao pico majoritário.

As bandas de absorção máxima no UV apresentadas pelo pico majoritário e pela substância em co-eluição apresentaram bandas características dos triterpenos quinonametídeos. Visando a obtenção da substância majoritária com grau de pureza satisfatório, a fração F3 foi selecionada para ser submetida à purificação por CLAE-UV preparativa.

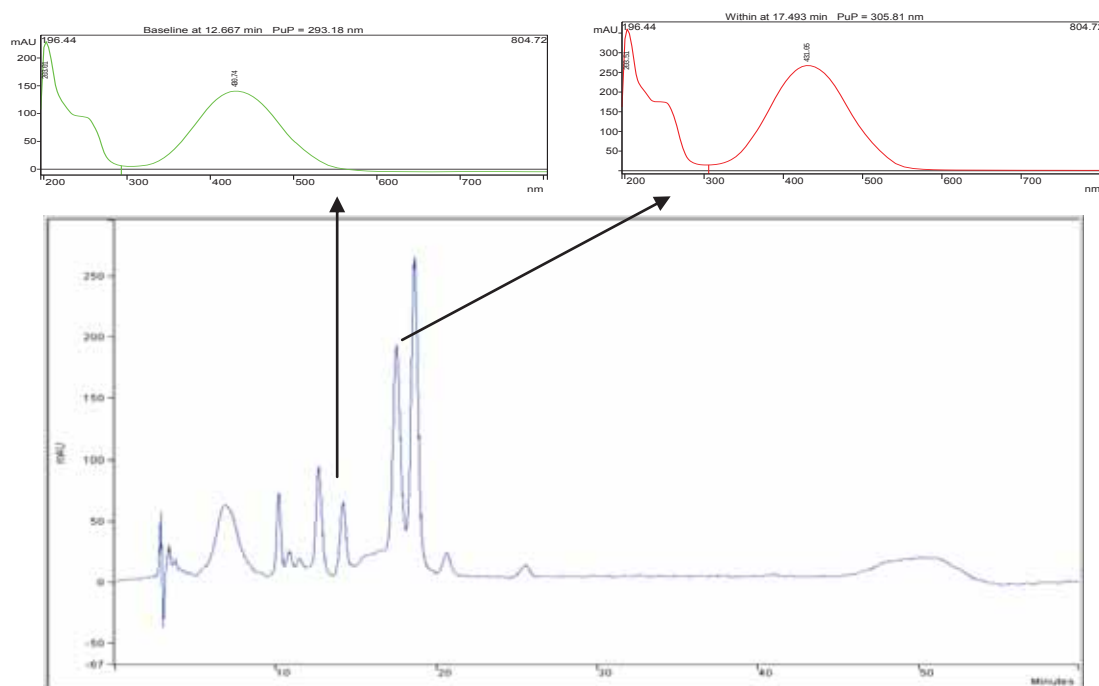




**Figura 14 :** Fração F3. Condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (250 x 4,6 mm). modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (4:1), vazão: 1mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm, tempo de análise 60 minutos

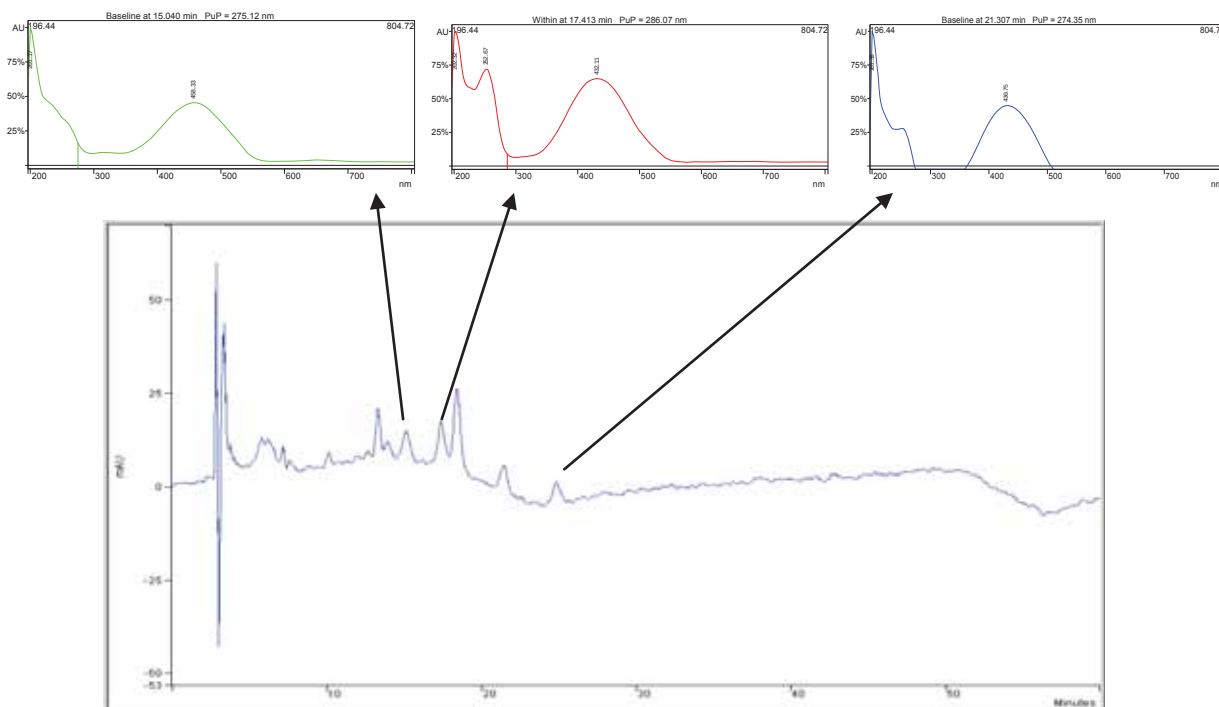
Nos cromatogramas, figuras 15 e 16, são apresentados os cromatogramas das frações F4 e F5. Na tentativa de definir uma boa condição cromatográfica, a condição dessas diferem da condição das frações anteriores. As condições cromatográficas otimizadas estabelecidas encontram-se abaixo dos cromatogramas apresentados a seguir.

Na análise do cromatograma da fração F4, figura 15 página 49, foi possível observar um pico minoritário com tempo de retenção de aproximadamente 13 minutos e um pico majoritário apolar quando comparado ao anterior, com tempo de retenção de 17 minutos. Também foi possível observar bandas de absorção máxima características dos triterpenos quinonametídeos.



**Figura 15 :** Fração F4. Condição: Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1) vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm, tempo de análise 60 minutos.

A partir da análise do cromatograma da fração F5, figura 16, p. 50, foi possível observar 3 picos com tempo de retenção de 15, 18 e 23 minutos, respectivamente. Apesar de ambos apresentarem banda de absorção máxima em 420 nm, a concentração deles e a massa para purificação em escala preparativa foi inviável.

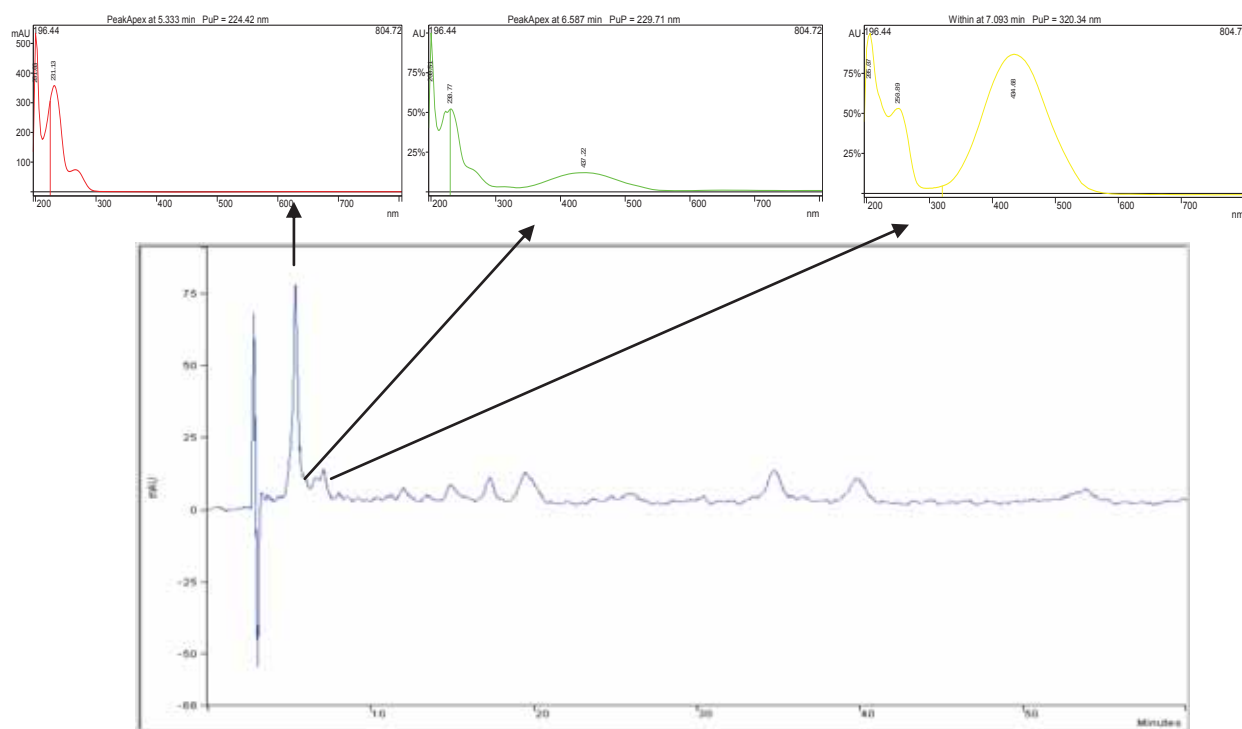


**Figura 16:** Fração F5. Condição:coluna Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1) vazão 1 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm, tempo de análise 60 minutos

Na figura 17, p. 51 é apresentado o cromatograma da fração F6, sob as mesmas condições experimentais apresentadas para as frações F1-F3. Essa fração por ser a mais polar com relação a 5 frações anteriores, apresenta no cromatograma das substâncias eluindo muito próximos, com baixo sinal de resposta e com absorção máxima em 420 nm. No entanto, quando analisado no comprimento de onda de 231 nm é possível observar um pico majoritário com uma banda com máximo de absorção no UV característico dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos.

Vale ressaltar que a análise das cascas das raízes da planta adulta apresentou como metabólito majoritário e exclusivo os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Já o estudo fitoquímico utilizando raízes da planta jovem permitiu

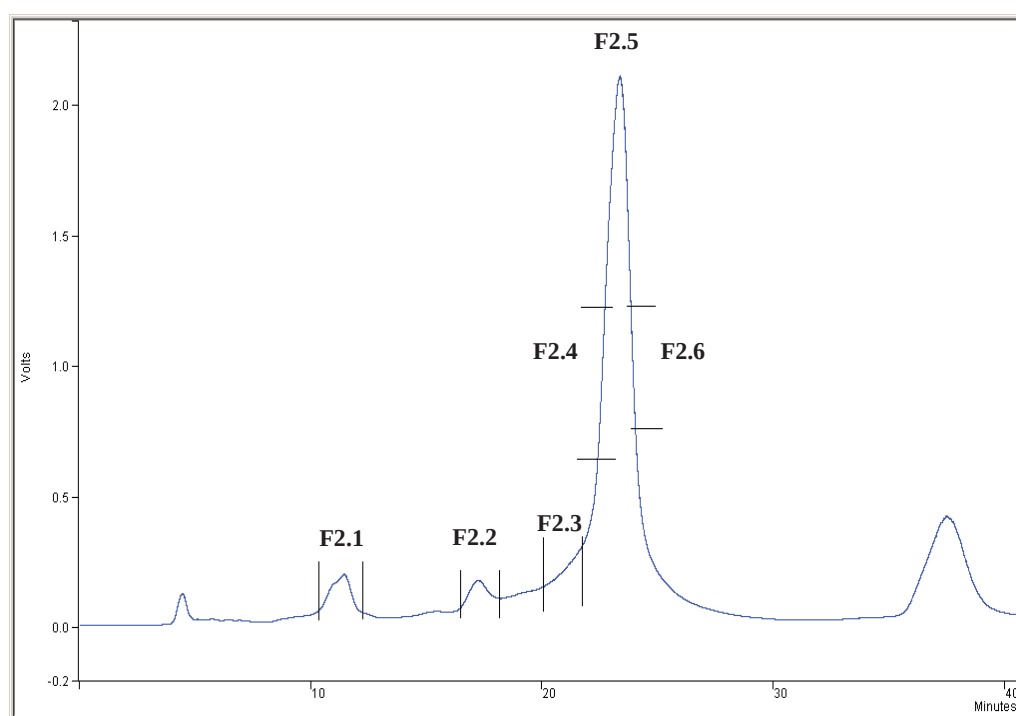
identificar os triterpenos quinonametídeos como metabólito majoritário e os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Essa análise permite inferir que o acúmulo dessas duas classes de metabólitos secundários é dependente do ciclo de vida da planta, tornando-se atrativos estudos posteriores do ciclo circadiano de acúmulo da *M. ilicifolia*.



**Figura 17 :** Fração F6. Condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Gemini C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm), modo isocrático MeOH: H<sub>2</sub>O (4:1) vazão: 1 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de análise 60 minutos.

Após análise criteriosa das frações obtidas das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*, foram selecionadas para serem submetidas à purificação as frações F2 e F3. Essas frações foram selecionadas devido as suas massas, sinal de resposta indicando quantidades apreciáveis dos compostos de interesse, condições cromatográficas favoráveis e principalmente por apresentarem como metabólito majoritário os triterpenos quinonametídeos.

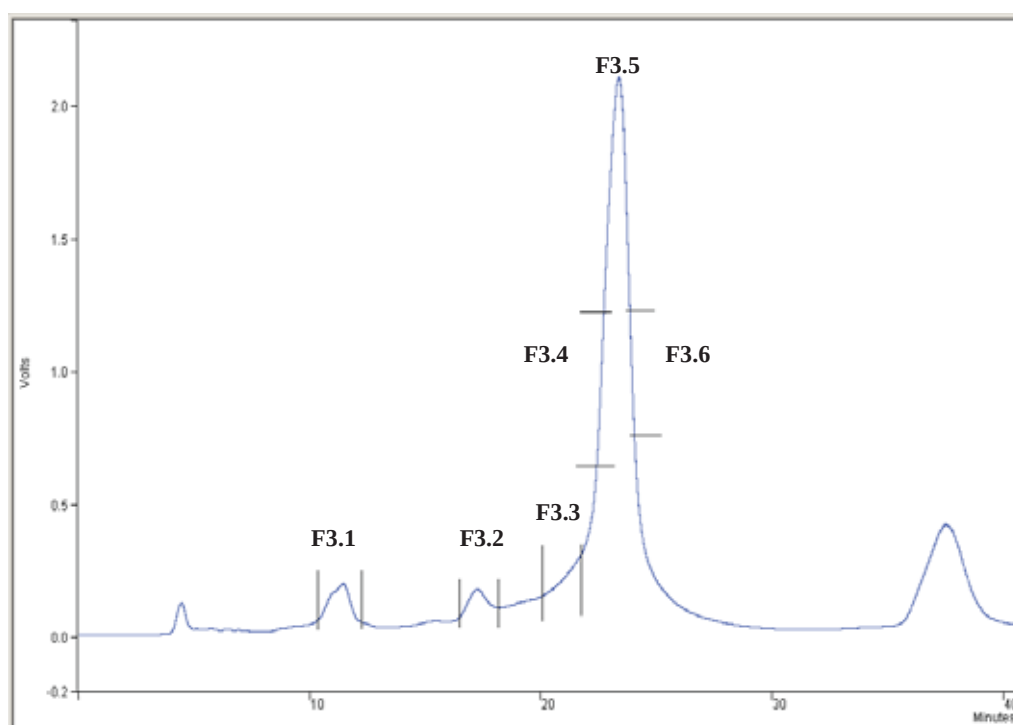
No cromatograma apresentado na figura 18, p. 52 da fração F2 está indicado as subfrações coletadas e logo abaixo a condição cromatográfica estabelecida. A partir do cromatograma foram coletadas 6 subfrações, sendo o pico majoritário e de interesse fracionado para assegurar a obtenção de subfrações com maior grau de pureza. Ao se fracionar o pico majoritário garante-se que eventuais substâncias que estejam co-eluinto na base do pico majoritário, não sejam encontradas nas subfrações coletadas mais próximas ao ápice. O mesmo vale para substâncias que possam co-eluir na descida da banda, evitando a contaminação das subfrações anteriores.



**Figura 18:** Fração F2. Condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 10  $\mu$ m (250 x 21,2 mm), modo isocrático MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1), vazão: 12 mL.min<sup>-1</sup>,  $\lambda$  = 254 nm, tempo de análise 40 minutos.

Após análise por CLAE-DAD das subfrações coletadas, a subfração F2.5 apresentou-se pura e foi denominada de substância **3**.

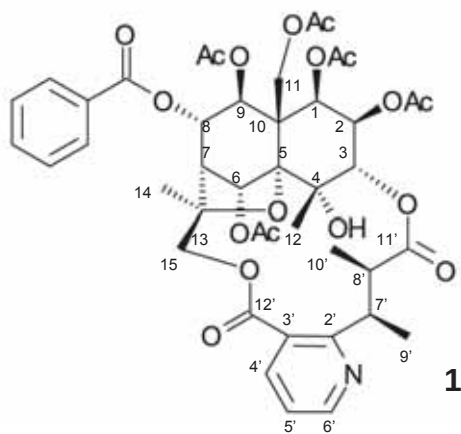
Na figura 19, p. 53 é apresentado o cromatograma da fração F3, neste encontram-se indicado as 6 subfrações coletas das quais o pico majoritário foi mais de uma vez fracionado com o intuito de recolhimento e obtenção da fração de interesse com grau de pureza. Abaixo do cromatograma encontra-se a condição cromatográfica otimizada para a purificação da mesma.



**Figura 19:** Fração F3. Condição: coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 10 µm (250 x 21,2 mm) modo isocrático MeOH:H<sub>2</sub>O (4:1), vazão: 12 mL.min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm, tempo de análise 30 minutos

Posteriormente a análise por CLAE-UV preparativa, todas as subfrações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD com o intuito de verificar a pureza dos picos isolados, sendo sempre monitorada em dois comprimentos de onda, 254 e 420 nm. Após análise verificou-se que a subfração F3.5 encontra-se pura e foi designada como substância **4**.

### 5.3 Substâncias Isoladas



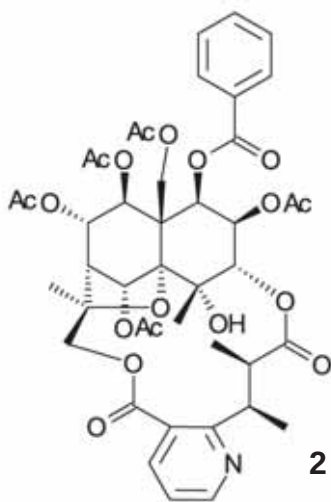
**aquifoliunina E-I**

Classe: Alcalóide Piridínico Sesquiterpênico

Procedimento: raiz da planta adulta *M. ilicifolia*

Isolamento: p. 29

Identificação: p. 56



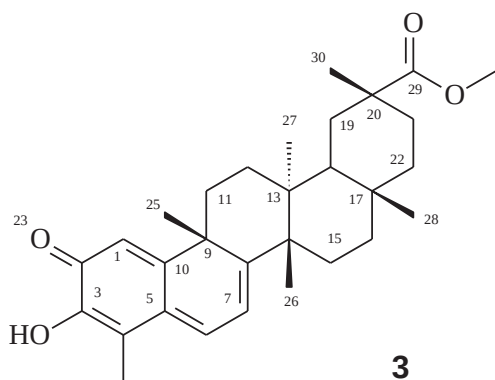
**maiteina**

Classe: Alcalóide Piridínico Sesquiterpênico

Procedimento: raiz da planta adulta *M. ilicifolia*

Isolamento: p. 29

Identificação: p. 59



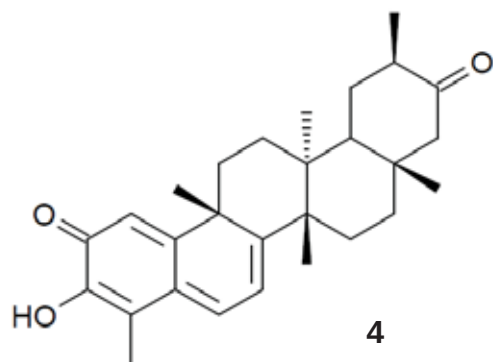
**pristimerina**

Classe: Triterpeno Quinonametídeo

Procedimento: raiz da planta jovem *M. ilicifolia*

isolamento: p. 31

identificação: p. 62

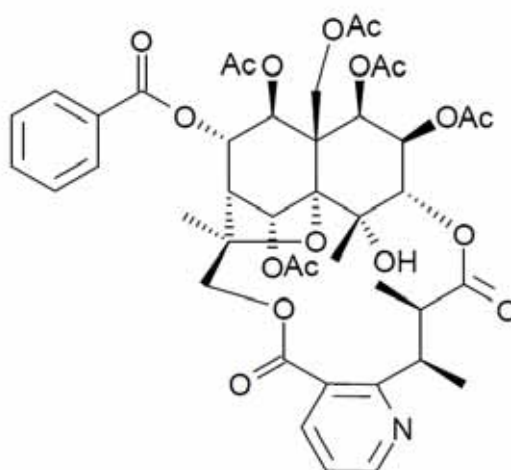


**maitenina**

Classe: Triterpeno Quinonametídeo  
 procedimento: raiz da planta jovem *M. ilicifolia*  
 isolamento: p. 31  
 identificação: p. 60

## 5.4 Caracterização espectrométrica das substâncias isoladas

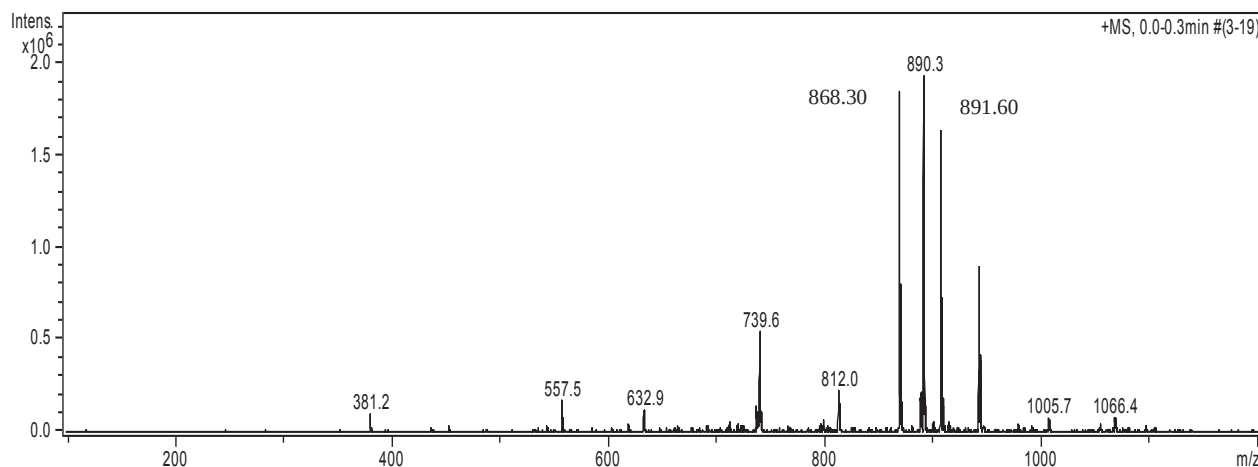
### 5.4.1 Caracterização espectrométrica da aquifoliunina E-I (substância 1)



**Figura 20** – aquifoliunina E-I (substância 1)

A identificação dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos por espectrometria de massas foram realizadas tomando como base os padrões de fragmentações desta classe de metabólito. A substância **1** figura 21, p. 56, apresenta fórmula molecular  $C_{43}H_{49}NO_{18}$ , definida pelo espectro de massas, o qual apresentou pico da molécula protonada em  $m/z$  868, 30  $M+1^+$ .

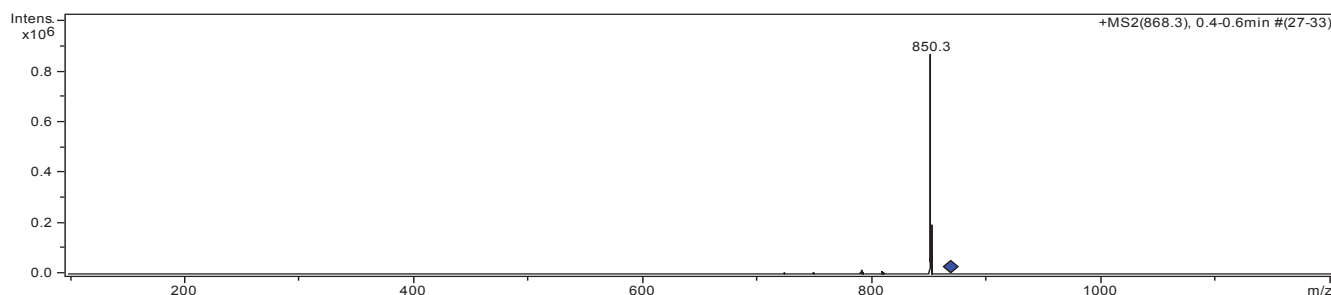




**Figura 21:** Espectro de massas da aquifoliunina E-I (substância 1).

Segundo RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2001, o estudo de fragmentação dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos gera a formação de íons na região de  $m/z$  550 do espectro. Esses íons são gerados devido a perda de fragmentos não carregados como OAc (60 Da),  $\text{CH}_2\text{O}_2$  (46 Da),  $\text{CO}_2$  (44 Da),  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$  (42 Da), CO (28 Da), geralmente presentes nas estruturas dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos.

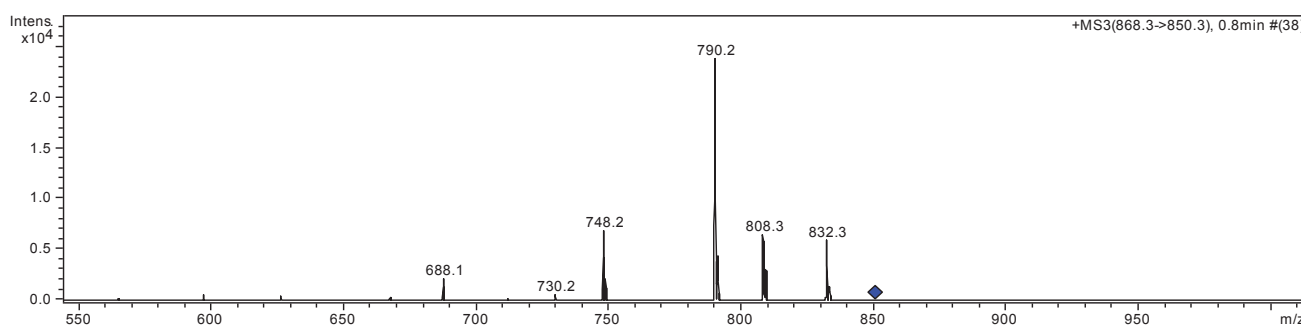
O fato acima pode ser confirmado pelo estudo do padrão de fragmentação do ion  $m/z$  850,3, gerado pela fragmentação do ion molecular  $m/z$  868, 30.



**Figura 22:** Espectro de massas da substância 1.

Conforme mostrado na figura 23, p. 57, o íon  $m/z$  850,3 da origem a um íon  $m/z$  790,2 onde esse é gerado pela perda de uma unidade OAc (60 Da). Em seguida vemos um íon de  $m/z$  790,2, gerado pela perda de uma unidade  $C_2H_2O$  (42 Da), considerando o íon parental nesse caso o  $m/z$  748,2, e por último a unidade de  $m/z$  748,2 perde mais unidade ACOH (60 Da) gerando o íon  $m/z$  688,1.

Os íons observados para a substância **1** estão de acordo com o padrão de fragmentação encontrado para os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos, corroborando o padrão de fragmentação proposto por RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2001.



**Figura 23:** Espectro de fragmentação do íon  $m/z$  850,3, onde é demonstrado o padrão de fragmentação de RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2001.

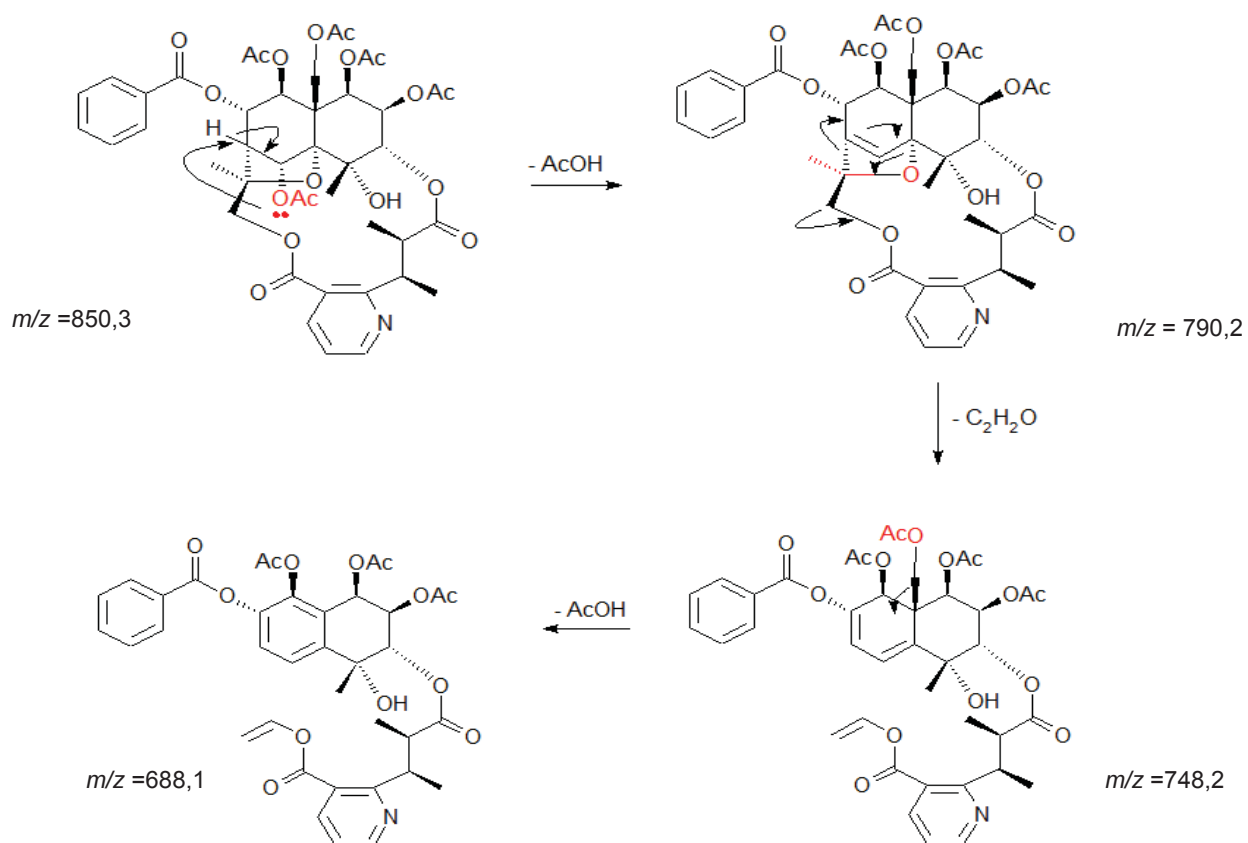
Baseado na estrutura da aquifoliunina E-I foi proposto um padrão de fragmentação, baseando-se nas informações de RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2001, o qual é apresentado na figura 24, p. 58.

Com a exposição à energia, o grupo acetato (OAc, 60 Da) ligado a posição 6 abandona a estrutura da aquifoliunina E-I, onde ocorre o ataque do par de elétrons do oxigênio do grupo OAc ao hidrogênio da posição 7. Com isso o composto se

estabiliza, ao par eletrônico do hidrogênio atacado e estabelece uma insaturação na ligação entre os carbonos 6 e 7.

Em seguida acontece o abandono de uma unidade  $C_2H_2O$  (42 Da), onde para isso ocorre um rearranjo via ataque nucleofílico envolvendo o oxigênio ligado a posição 5 do anel e os carbonos 13 e 14. Ocorre um translocamento de cargas no anel A do núcleo sesquiterpênico, formando um sistema de insaturações conjugadas e ocorre cisão do composto, deixando assim de ser um alcalóide cíclico.

Em uma etapa posterior, ocorre a perda de mais uma unidade OAc (60 Da), essa ligada a posição 10, gerando assim um anel aromatizado, que estabiliza o composto. Esse padrão de fragmentação é condizente com a proposta descrita acima.



**Figura 24:** Proposta de fragmentação e formação de íons observados no espectro de massas da substância 1.

#### 5.4.2 Caracterização espectrométrica da maiteína (substância 2)

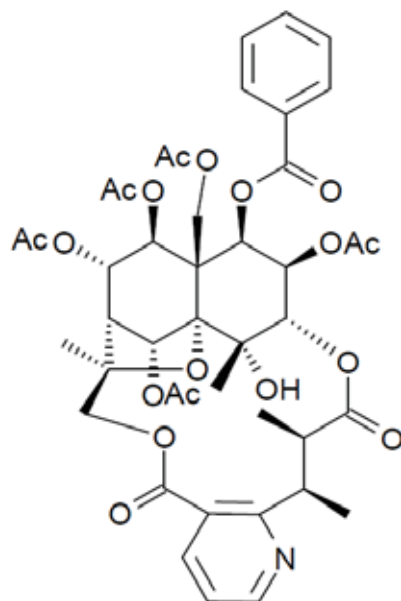


Figura 25 – maiteína (substância 2)

A substância **2**, figura 26, p. 59, também apresenta fórmula molecular  $C_{43}H_{49}NO_{18}$ , definida pelo espectro de massas, o qual apresentou pico da molécula protonada em  $m/z$  868,  $3 M+1^+$ .

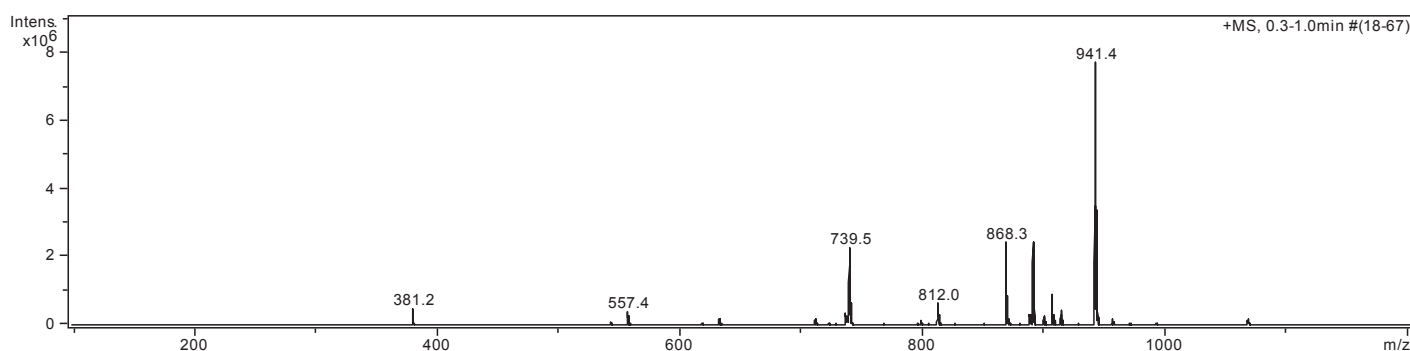
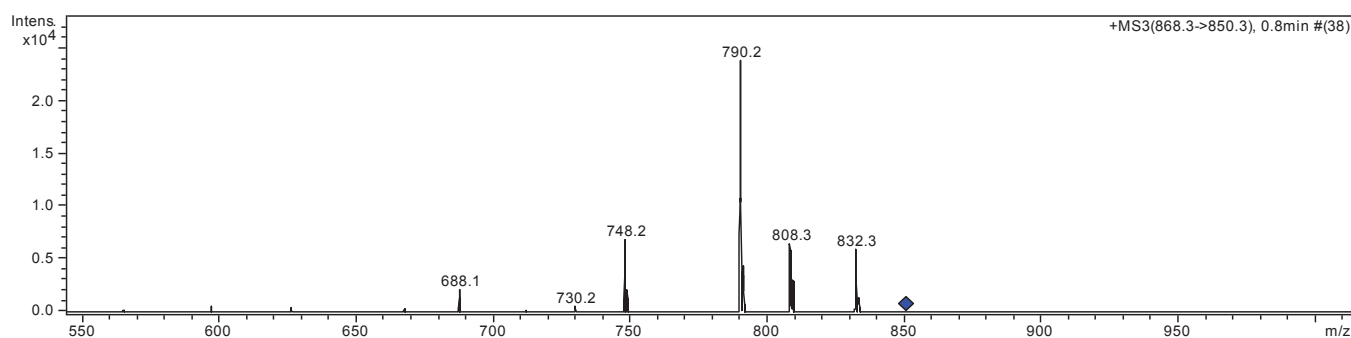


Figura 26: Espectro de massas da substância 2.

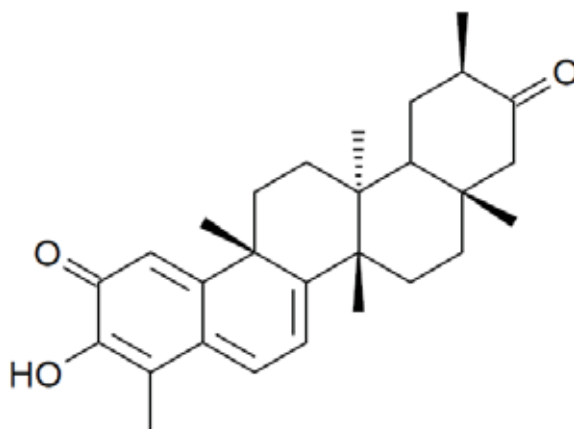
Da mesma forma que a substância **1**, também apresentou o mesmo padrão de fragmentação da região do espectro de  $m/z$  550, corroborando o caminho de

fragmentação proposto por RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2001, como demonstrado pela figura 27, p 60.



**Figura 27:** Espectro de fragmentação do íon  $m/z$  850,3 para substância 2, onde é demonstrado mais uma vez o padrão de fragmentação de RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2001

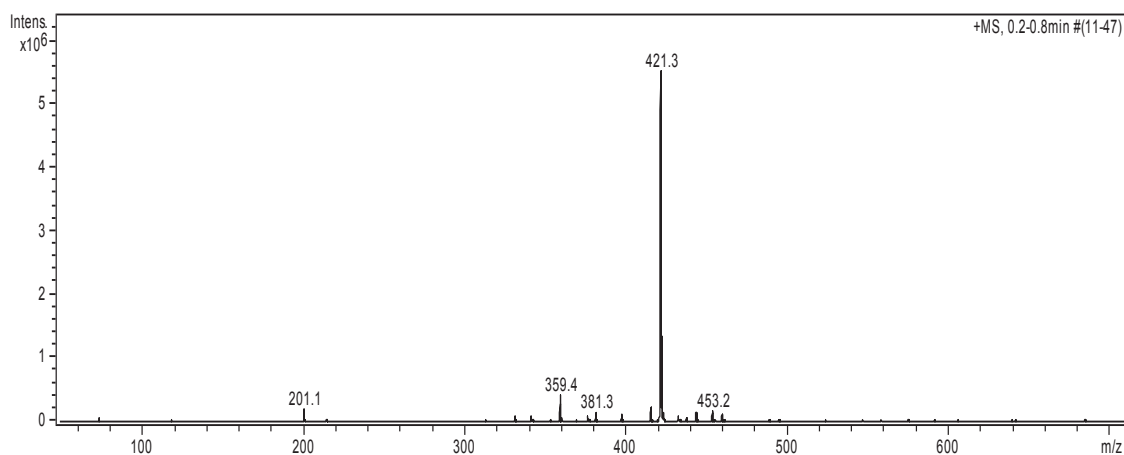
#### 5.4.3 Caracterização espectrométrica da maitenina (substância 4)



**Figura 28 –** maitenina (substância 4)

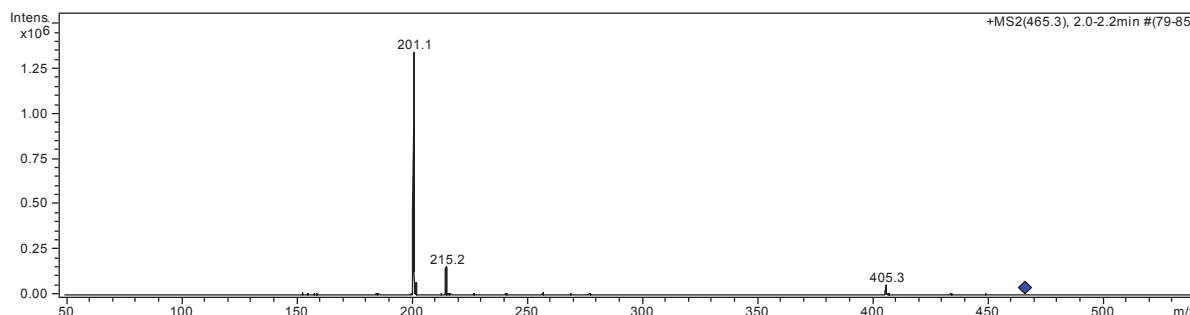
A identificação dos triterpenos quinonametídeos por espectrometria de massas foi realizada tomando como base os padrões de fragmentações desta classe de metabólito, os quais são amplamente conhecidos (LIÃO, 1994; RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2002; KHALID *et al.*; 2007).

A substância **4**, figura 29, p. 61 apresentou fórmula molecular  $C_{43}H_{49}NO_{18}$ , definida pelo espectro de massas, o qual apresentou pico da molécula protonada em  $m/z$  421, 3  $M+1^+$ .



**Figura 29:** Espectro de massas do íon  $m/z$  421.3

Na figura 30, p. 62, do espectro de massas da substância **4** foi possível observar a presença do pico base  $m/z$  201, referente a formação de um íon tropílio característico dos triterpenos quinonametídeos.



**Figura 30:** Espectro de massas do pico base m/z 201.

Segundo a proposta apresentada por RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2002, inicialmente a carbonila presente no anel A, na posição 2, com o impacto da radiação perde um par de elétrons, ficando assim positivada. Imediatamente acontece um deslocamento de cargas das insaturações presentes nos anéis B e C de forma a compensar a carga positiva da carbonila.

O movimento de cargas forma um carbocátion terciário na posição 8, ajudando a estabilizar o composto. Em seguida o composto formado sob a ação da força irradiante sofre um rearranjo, onde ocorre a abertura do anel C, com formação de um carbocátion primário onde anteriormente era a posição 12, no anel C. Também ocorre a formação de uma insaturação na posição 9, anel B.

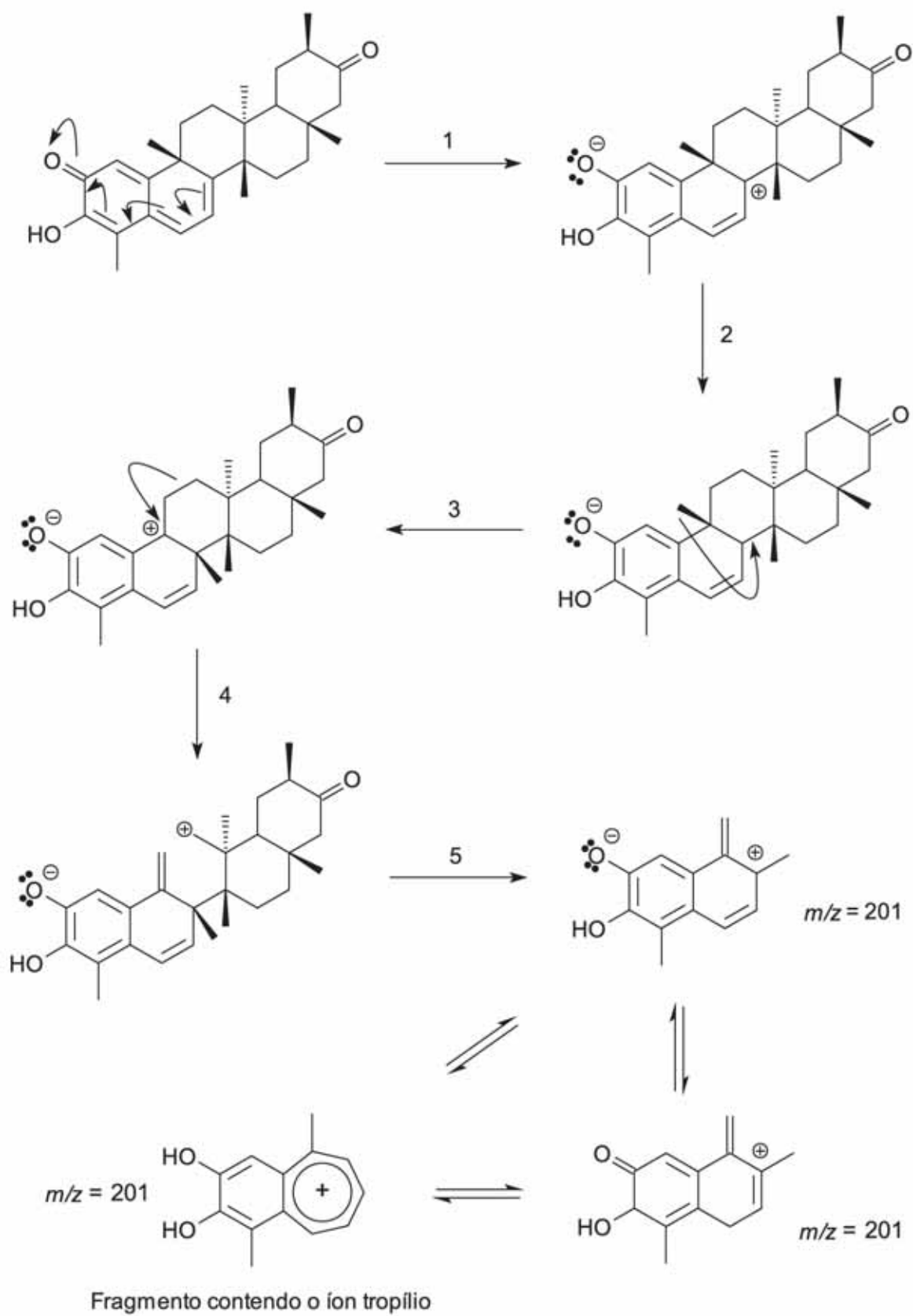
O composto formado sofre fragmentação, perdendo o esqueleto básico dos anéis C, D e E, gerando um sistema de dois anéis cíclicos fundidos de 6 membros, com um sistema conjugado de insaturações. O sistema sofre mais uma vez rearranjo, resultando em um composto de 2 anéis cíclicos fundidos, onde um apresenta 6 e o segundo 7 unidades, onde o membro de 7 unidades apresenta uma carga positiva estabilizada por ressonância.

Esse último sistema resultante do rearranjo é estável apresentando pico base m/z 201, referente à formação de um íon tropílio, sendo característico dos

triterpenos quinonametídeos. Esse sinal é encontrado no padrão de fragmentação da substância **4**, corroborando o padrão de fragmentação proposto por RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2002.

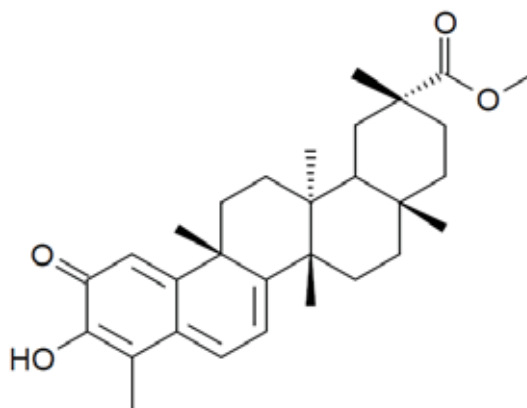
Na figura 31, p. 64, é mostrado o padrão de fragmentação da maitenina, segundo o mecanismo proposto e descrito anteriormente.





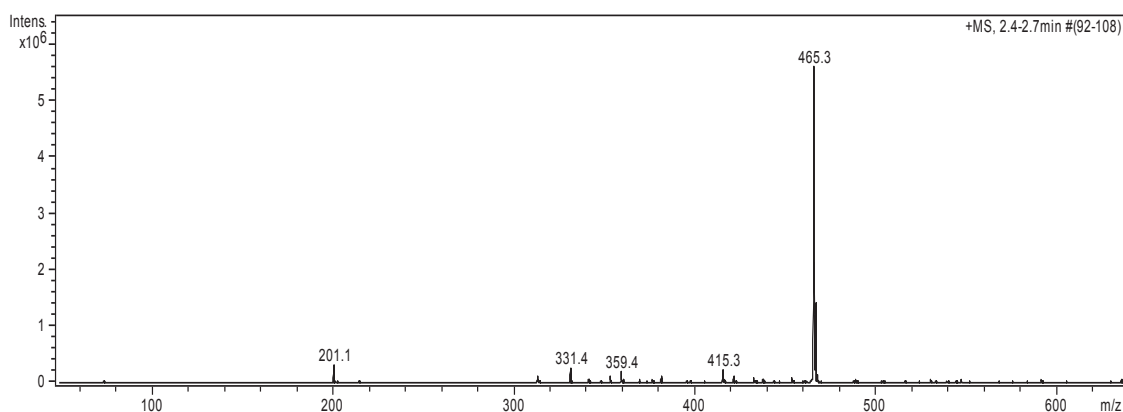
**Figura 31:** Proposta de formação do íon tropílio segundo RODRIGUES-FILHO *et al.*; 2002

#### 5.4.4 Caracterização espectrométrica da pristimerina (substância 3)



**Figura 32:** pristimerina (substância 3)

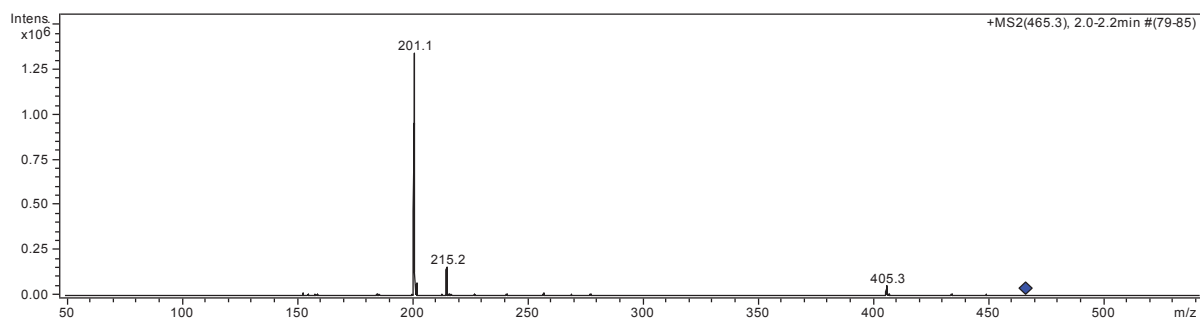
A substância **3** apresentou fórmula molecular  $C_{30}H_{40}O_4$ , definida pelo espectro de massas, o qual apresentou pico da molécula protonada em  $m/z$  465, 3  $M+1^+$ , conforme mostrado na figura 33, p. 65



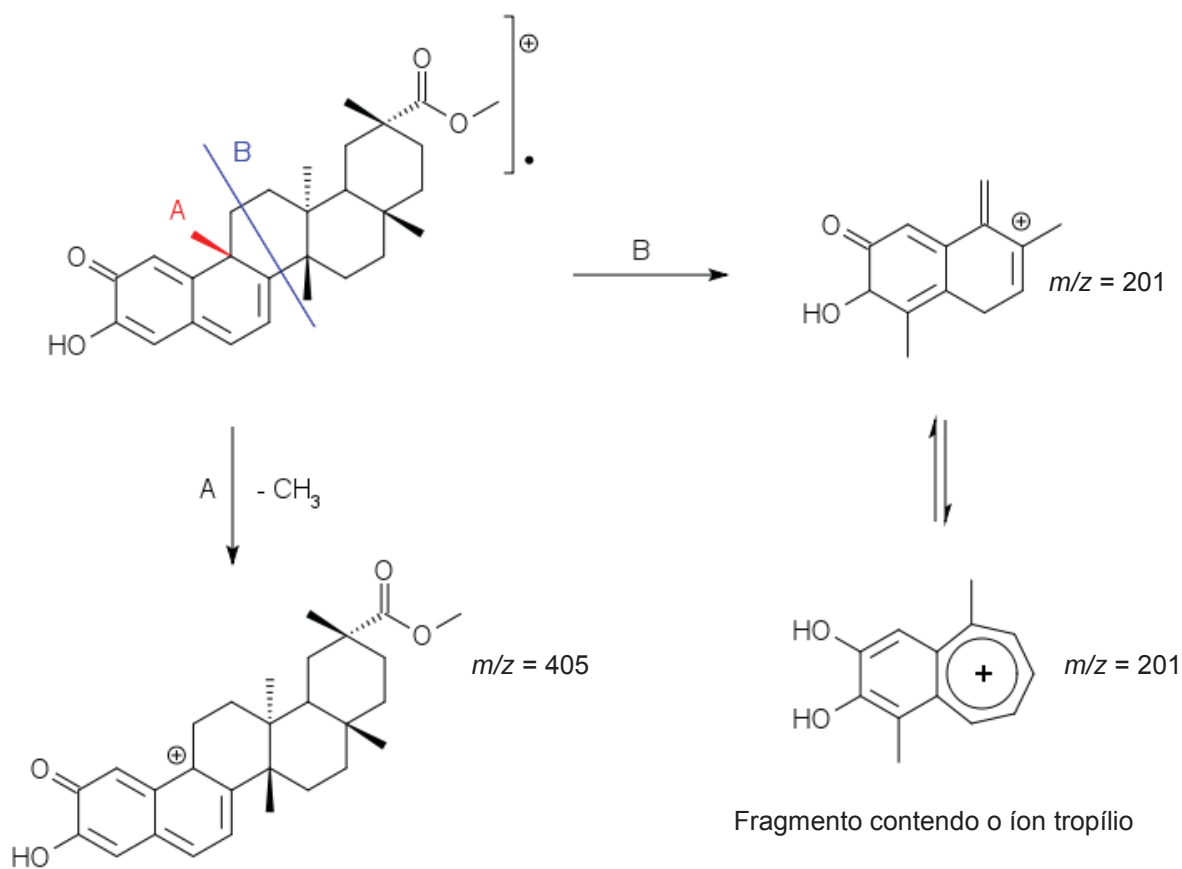
**Figura 33:** Espectro de massas do íon  $m/z$  465.30.

Na figura 34, p. 66 é observado a presença do pico base  $m/z$  201, mostrando o padrão de fragmentação comum a essa classe de metabólito especial. Também foi possível observar a presença do fragmento em  $m/z$  405, proveniente da perda de

um grupo metila a partir da molécula intacta. O padrão de fragmentação que leva a esses dois íons é demonstrado na figura 35 p.67.



**Figura 34:** Espectro de massas do pico base  $m/z$  201.



**Figura 35:** Principais fragmentações observadas no espectro de massas da pristimerina.

### 5.5 Otimização das condições cromatográficas utilizadas na análise dos metabólitos constitutivos do extrato de raiz da planta jovem de *M. ilicifolia*.

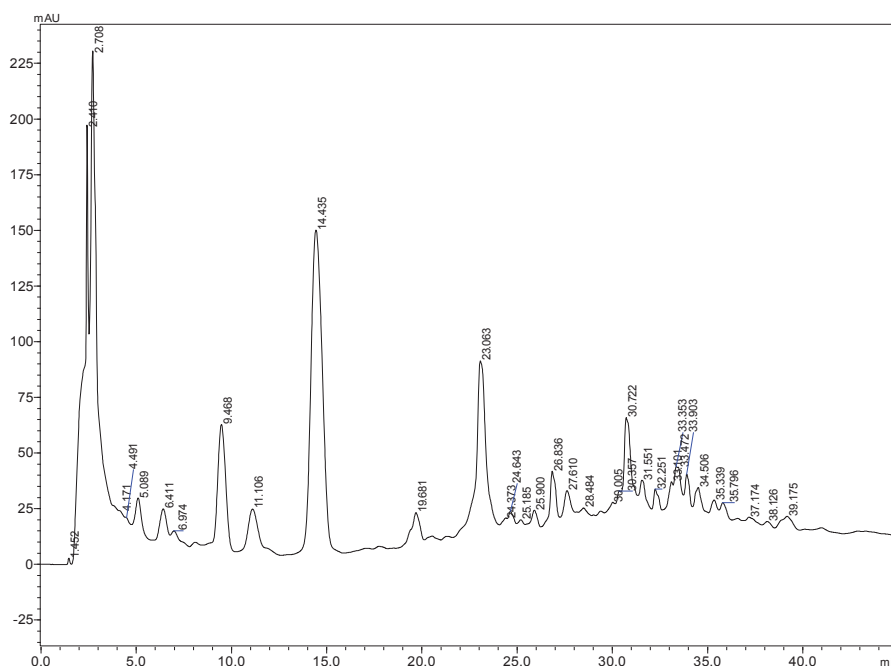
A análise por CLAE-DAD do extrato das raízes da planta jovem de *M. ilicifolia* mostrou o acúmulo de dois marcadores quimiotaxonômicos da família em estudo, os triterpenos quinonametídeos e os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos.

A otimização das condições cromatográficas tem como objetivo futuro, a quantificação simultânea dessas duas diferentes classes de metabólitos especiais na raiz da planta jovem.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica foi escolhido o sistema MeOH:H<sub>2</sub>O, por ser um sistema menos agressivo ambientalmente, ser um sistema amplamente utilizado nas técnicas CLAE e ainda apresentar custo reduzido em relação a sistemas envolvendo ACN.

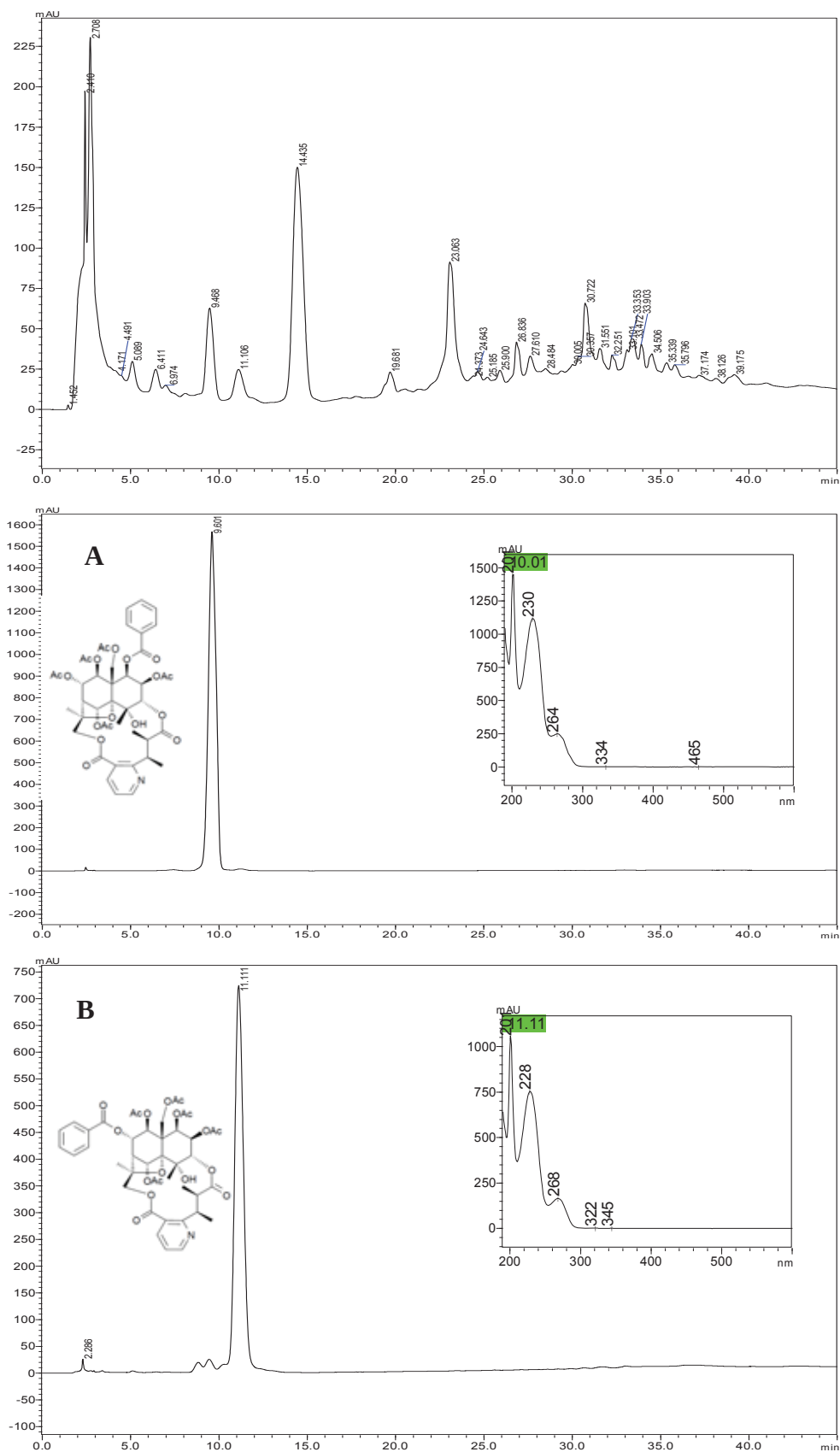
Foram estudadas várias condições cromatográficas em modo isocrático, porém os cromatogramas obtidos não apresentaram picos com boas resoluções, fator determinante para as quantificações posterior. Utilizou-se de uma rampa em gradiente, a qual encontra-se descrita em materiais e métodos, item 4.6. A análise foi conduzida sob as mesmas condições experimentais.

Na figura 36, p. 68, é apresentado o cromatograma, o qual foi possível observar a obtenção de uma boa resolução cromatográfica dos picos, garantindo a identificação das substâncias presentes no extrato.

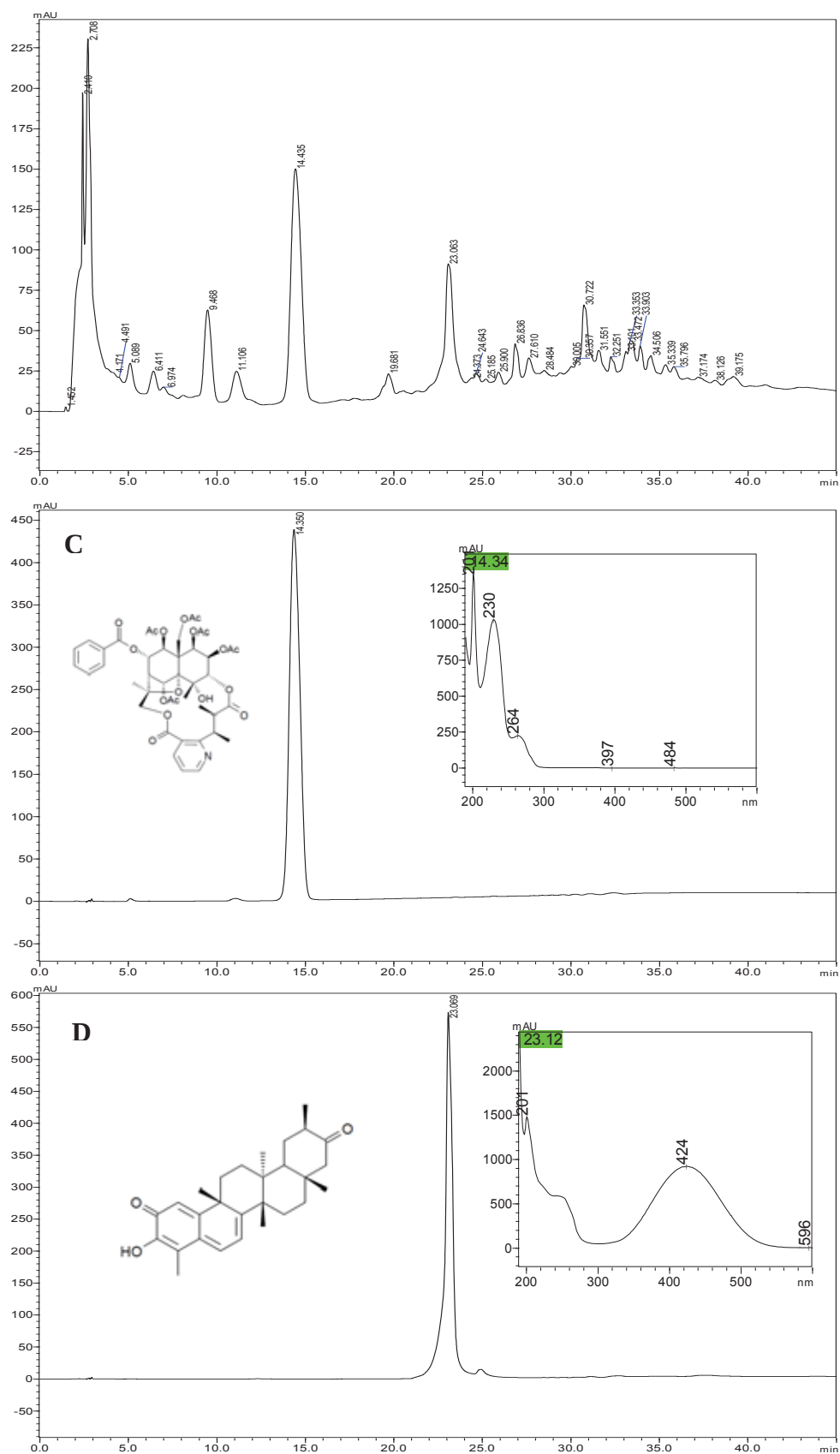


**Figura 36:** Cromatograma obtido por análise CLAE-DAD em rampa gradiente, a partir do extrato de raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*

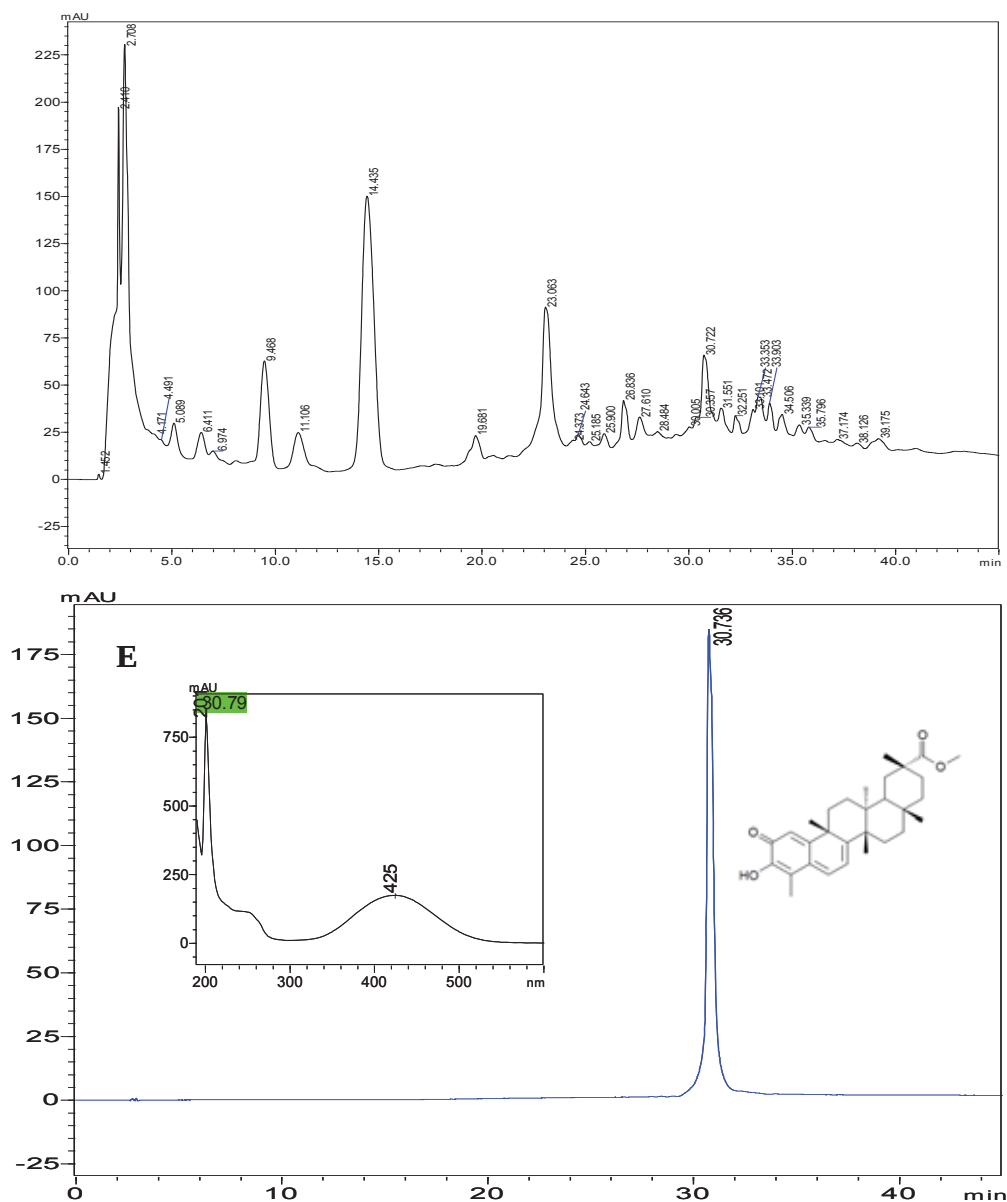
As identificações das substâncias isoladas foram feitas por comparação do tempo de retenção dos padrões isolados: maiteína (**A**), maitenol (**B**), aquifoliunina E-1 (**C**), maitenina (**D**) e pristimerina (**E**), além das bandas de absorção no UV características dos alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e dos triterpenos quinonametídeos, corroborados pelo máximo de absorção em 231 nm e 420 nm, respectivamente. A identificação dessas duas classes de metabólitos especiais é mostrada nos cromatogramas apresentados nas figuras 37-39, p. 69-71. Também foi possível identificar o alcalóide piridínico sesquiterpênico, maitenol, com atividade antiprotozoária (SANTOS *et al.*; 2012).



**Figura 37:** Cromatograma mostrando identificação das substâncias maiteina (A), maitenol (B) nas raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*.



**Figura 38:** Cromatograma mostrando identificação das substâncias aquifoliunina E-I (C) e maitenina (D) nas raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*.



**Figura 39:** Cromatograma mostrando identificação da substância pristimerina (E) nas raízes da planta jovem de *M. ilicifolia*.

## 6. Conclusão

A espécie *Maytenus ilicifolia* apresentou uma grande diversidade de metabólitos especiais. O trabalho veio a corroborar com dados encontrados na literatura sobre a presença e produção de alcalóides piridínicos sesquiterpênicos e triterpenos quinonametídeos.

A fração de partição DCM das cascas das raízes da planta adulta apresentou como metabólito majoritário e exclusivo os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Já



o estudo fitoquímico utilizando raízes da planta jovem permitiu identificar os triterpenos quinonametídeos como metabólito majoritário e como metabólito minoritário os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos. Essa análise permite inferir que a produção dessas duas classes de metabólitos especiais é dependente do ciclo de vida da planta.

A análise por CLAE-DAD mostrou ser uma técnica útil e versátil na identificação das duas classes de metabólitos especiais nas raízes da planta jovem, a qual permitirá o desenvolvimento da otimização das condições cromatográficas para uma futura análise quantitativa.

Muitos são os desafios e perspectivas para as substâncias provenientes de *M. ilicifolia*. O estudo desenvolvido neste trabalho vem acrescentar uma técnica de análise das classes de compostos mais promissores presentes no espécime, onde o uso e as aplicações na terapêutica dessas substâncias, e até mesmo do próprio fitoterápico, são uma alternativa viável como arsenal no tratamento de diversas enfermidades.

## 7. REFERÊNCIAS

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OUTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A; VELA, S. M. A 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.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 367-372, 2005.

CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*, **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 361-363, 2009.

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

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.

CRESTANI, S.; RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; KASSUYA, C. A. L.; MARQUES, C. A.; SANTOS, E. S. A potent and nitric oxide dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*, **Vascular Pharmacology**, v. 51, p. 57-63, 2009.

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

DI STASI, L. C. Aspectos químicos e farmacológicos da espinheira-santa: uma análise da utilidade dos dados. In: REIS, M. S.; SILVA, S. R. (Org). **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus spp.*; espinheira-santa**. Brasília: IBAMA, 2004, p. 204.

DUAN, H.; KAWAZOE, K.; TAKASAISHI, Y.; IMAKURA, Y.; JIA, Y.; LI, D.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum* and *Tripterygium wilfordii*: a new class of potent anti-HIV agents. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 357-361, 2000.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Steam and Leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*, **Fitoterapia**, v. 76, p. 43-49, 2004.

FARIA, M. F; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F; State-of-the-Art in Immobilized Polymer Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography, **Journal of the Brazilian Chemical de Química Society**, v. 8, p. 1385 – 1398, 2009.

GONZÁLEZ, F. G.; PORTELLA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of three *Maytenus ilicifolia* (“espinheira-santa”) adulterants: *Maytenus aquifolium*, *Soracea bomplandii* and *Zollernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.

HIMMELSBACH, M.; 10 years of MS instrumental developments – Impact on LC–MS/MS in clinical chemistry, **Journal of Chromatography B**, v. 3, p. 883 – 884, 2012.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; LITAKA, Y. Isolation, structural elucidation and conformational analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ebenifolia* Reiss. X-ray molecular structure of ebenifoline W-I. **Journal of the Chemical Society**. Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry, v. 11, p. 1247-1254, 1993.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93-100, 2004.

KHALID, S. A.; FRIEDRIEHSSEN, G. M.; CHRISTENSEN, S. B.; TAHIR, A. E.; SATTI, G. M. Isolation and characterization of pristimerin as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalensis* (L.am.) Exell. **Arkivoc**, p. 129-134, 2007.

LACOURSE, W.R. Column Liquid Chromatography: Equipament and Instrumentation. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2813-2832, 2002.

LEITE, J. P.; 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 *Maytenus aquifolium* ). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LI, M.; HOU, X.F.; ZHANG, J.; WANG, S.C; FU, Q.; HE, L.C. Applications of HPLC/MS in the analysis of traditional Chinese medicines. **J Pharma Anal**, v. 1, p. 81-91, 2011.

LIÃO, L. M. Triterpenos quinonametídeos de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae). 1994. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1994.

LIÃO, L. M. Sesquiterpene pyridine alkaloids. In: CORDEL, G.A. (Ed.). **The Alkaloids**: chemistry and biology. Amsterdam: Elsevier, v. 60, p. 1205-1207, 2003.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O.P.; SHARMA, P.K. High Performance Liquid Chromatography : A short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v.2, p. 22-26, 2010.

MOUJIR, L.; GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M.; GONZÁLEZ, A. G.; RAVELO, A. G.; LUIS, J. G. The relationship between structure and antimicrobial activity in Quinones from the Celastraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 18, n. 1, p. 25-28, 1990.

NÚÑEZ, M. J; ARDILES, A. E; MARTÍNEZ, M. L.; ROMERO, D. T; JIMÉREZ, I. A; BAZZOCHI, I. L. Unusual D:B-friedobaccharane and oxygenated friedelane-type triterpenoids from Salvadorean Celastraceae species, **Phytochemistry Letters**, p. 321 – 326, 2012.

RODRIGUES-FILHO, E.; BARROS, F. A. P; FERNANDES, J. B; BRAZ-FILHO, R. Detection and identification of triterpenes in *Peritassa campestris* by mass spectrometry, **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 16, p. 627 – 633, 2002.

RODRIGUES-FILHO, E.; BARROS, F. A. P; FERNANDES, J. B; SILVA, M. F. G. F, Studies Towards the Detection and Identification of Sesquiterpene Pyridine Alkaloids in *Peritassa campestris* by Mass Spectrometry, **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 185 – 193, 2001.

RODRÍGUEZ, F. M.; LÓPEZ, M. R.; JIMÉNEZ, I. A.; MOUJIR, L.; RAVELO, A. G.; BAZZOCCHI, I. L. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. **Tetrahedron**, v. 61, p. 2513-2519, 2005.

SANTOS, V. A. F. F. M.; REGASINI, L. O.; NOGUEIRA, C. R.; PASSERINI, G. D.; MARTINEZ, I.; BOLZANI, V. S.; GRAMINHA, M. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products** (aceito).

SANTOS, V. A. F. F. M.; SANTOS, D. P.; GAMBOA, I. C.; ZANONI, M. V. B.; FURLAN, M. Evaluation of Antioxidant Capacity and Synergistic Associations of Quinonemethide Triterpenes and Phenolic Substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), **Molecules**, v. 15, p. 6956 – 6973, 2010.

SIMMOMS, M. P; CAPP, J. J; ARCHER, R. H.; FORD, A. J; EICHESTED, D.; CLEVINGER, C. C.; Phylogeny of the Celastraceae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 745 – 757, 2008.

SIMMOMS, M. P; SAVOLAINEN, V.; CLEVINGER, C. C; ARCHER, R. H; DAVIS, J. I. Phylogeny of the Celastraceae Inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, *rbcL*, *atpB*, and Morphology, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, p. 353 – 366, 2001.

SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 787-790, 2004.