

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Frederico Nunes Valladão

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS E POLPA DE FRUTO DE
Maytenus salicifolia (Celastraceae) E ANÁLISE
QUIMIOTAXONÔMICA EM *Maytenus* sp.**

Belo Horizonte
2011

UFMG/ICEx/DQ.878^a

T.379

Frederico Nunes Valladão

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE FOLHAS E POLPA DE FRUTO DE
Maytenus salicifolia (Celastraceae) E ANÁLISE
QUIMIOTAXONÔMICA EM *Maytenus* sp.**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte
2011

V136e Valladão, Frederico Nunes
2011 Estudo fitoquímico de folhas e polpa de fruto de
T *Maytenus Salicifolia* (Celastraceae) e análise
quimiotaxonômica em *Maytenus* sp. Frederico Nunes
Valladão. 2011.

XIV, 149 p.: il.

Orientadora: Grácia Divina de Fátima Silva

Co-Orientador: Sidney Augusto Vieira Filho

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais, Departamento de Química.

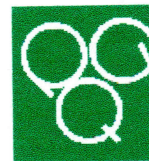
Bibliografia

1. Química orgânica - Teses 2. Quimiotaxonomia-Teses
3. Fitoquímica - Teses 4. Histoquímica - Teses I.
Silva, Grácia Divina de Fátima, Orientadora II. Vieira
Filho, Sidney Augusto Co-Orientador II. Título

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br




**"Estudo Fitoquímico de Folhas e Polpa de Fruto de *Maytenus salicifolia*
(Celastraceae) e Análise Quimiotaxonômica em *Maytenus sp.*"**


Frederico Nunes Valladão

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Grácia Divina de Fátima Silva - Orientadora
UFMG


Prof. Sidney Augusto Vieira Filho - Co-Orientador
UFOP


Prof. Fernando Faustino de Oliveira
UESC


Prof. Marcelo Henrique dos Santos
UNIFAL


Prof. Henriete da Silva Vieira
UFMG


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara
UFMG

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2011.

O trabalho descrito nesta tese foi realizado sob a orientação da Professora Dra Grácia Divina de Fátima Silva e co-orientação do Professor Dr Sidney Augusto Vieira Filho.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, *Iraiz Alves Nunes Valladão* e *Leodegard Ferreira Valladão*, pelo inigualável apoio durante estes seis longos anos. Ao meu irmão *Leonardo* e à *Sara Araújo Valladão* que foi, nesses últimos anos, minha colaboradora, companheira e esposa querida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Professora Dra. Grácia Divina de Fátima Silva por me aceitar no NEPLAM e me permitir escolher qual caminho traçar e aproveitar as oportunidades que este trabalho proporcionou durante os seis anos.

Ao co-orientador Professor Dr. Sidney Augusto Vieira Filho (Bibo) pelas boas idéias, pelo conhecimento compartilhado e pelos diálogos sempre agradáveis.

À Professora Dra. Lucienir Pains Duarte pela sua disposição em ajudar nos momentos mais críticos e pelas sugestões sempre pertinentes.

À “ilustríssima” Dra. Mariem por ceder as instalações do Laboratório de Química Bromatológica da FUNED e aos membros de seu grupo de pesquisa que sempre que possível disponibilizaram um tempo para um bate-papo agradável.

Ao Professor Dr. Fernando, do departamento de Botânica/UFMG, por colaborar ativamente para a concretização deste trabalho, seja disponibilizando a infra-estrutura necessária seja pela transferência de conhecimento teórico/prático.

À professora Dra. Roqueline pelo apoio indiscutível no trabalho fitoquímico, pelas boas conversas e pela companhia.

Às meninas (estagiárias) Isabel, Lorena e Betânia pela preciosa ajuda.

Ao Mário pelo respeito e consideração, por partilhar seu enorme conhecimento científico, pela disposição em promover a realização de uma parte importante do trabalho e em realizar o trabalho com muito capricho.

Ao Pablo agradeço pelo tratamento amistoso, pelos ensinamentos em CG e validação e pela disposição em auxiliar-me num momento crucial do trabalho.

À José Luiz, Maria Gorete (pais da Sara), Raquel e Ana Maria (as irmãs) por me aceitarem como membro oficial da família Araujo e pelo bom convívio familiar.

Ao “Piracema” (Mestre Fernandinho) pelo apoio final, pelos espectros no IV e pela boa conversa que resulta em algo de útil ou divertido.

Ao professor “Dr.” Djalma que sempre contribuiu tanto no campo profissional quanto no pessoal com seu grande conhecimento em diversos campos científicos e não científicos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química.

Ao CNPq pelo apoio financeiro nos primeiros dois anos de trabalho.

Cientista é aquele que guarda para si suas crenças e, após cuidadosas observações, conclui a respeito de um acontecimento baseando-se em evidências.

James W. Ashley

Minor Planet Research Inc

Sumário

Abreviaturas, siglas e símbolos	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	x
Agradecimentos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv

Introdução

Evolução e adaptação das plantas com flores	1
Sistemas de classificação de angiospermas	4
Quimiotaxonomia clássica e moderna	7
Metabolismo secundário, fatores ambientais e adaptação gênica	12
Estudo fitoquímico: desenvolvimento e implicações	16
A família <i>Celastraceae</i> e o gênero <i>Maytenus</i>	17
Evolução das celastráceas	17
Características botânicas da família <i>Celastraceae</i>	18
Características gerais de <i>Maytenus salicifolia</i> Reissek	20

1. Objetivos	22
---------------------	-----------

2. Áreas de estudo	23
---------------------------	-----------

2.1 Localização	23
-----------------	----

2.2 Características gerais	23
----------------------------	----

2.3 Estação Ecológica da UFMG	24
-------------------------------	----

2.4 Complexo do Espinhaço	24
---------------------------	----

2.4.1 Serra de Ouro Branco	25
----------------------------	----

2.4.2 Serra da Piedade	26
------------------------	----

3. Materiais, instrumentos e métodos	28
---	-----------

3.1. Material vegetal	28
-----------------------	----

3.1.1 <i>Maytenus salicifolia</i> (<i>Celastraceae</i>)	28
---	----

3.1.2 <i>Maytenus gonoclada</i> (<i>Celastraceae</i>)	28
---	----

3.2. Padrões, reagentes colorimétricos e testes preliminares	29
3.2.1 Padrões	29
3.2.2 Vanilina perclórica	29
3.2.3 Dragendorff	29
3.2.4 Liebermann-Burchard	29
3.2.5 Lugol	30
3.2.6 Cloreto férrico	30
3.2.7 Floroglucina	30
3.2.8 Vermelho de sudan B	30
3.3. Materiais e equipamentos	31
3.3.1 Misturadores e agitadores	31
3.3.2 Balanças	31
3.3.3 Evaporadores rotativos	31
3.3.4 Estufas	31
3.3.5 Instrumentos para medição de volume	32
3.3.6 Ponto de fusão	32
3.3.7 Instrumentação para análise histoquímica	32
3.3.8 Cromatografia em camada delgada	32
3.3.9 Cromatografia em coluna	32
3.3.10 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	33
3.3.11 Cromatografia líquida acoplada à espectroscopia no ultravioleta	33
3.3.12 Espectroscopia na região do infravermelho	33
3.3.13 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	33
4. Estudo quimiotaxonômico de <i>Maytenus</i> sp.	34
4.1 Protocolos de análise	35
4.1.1 Análise histoquímica	35
4.1.2 Análise de flavonóides	35
4.1.3 Análise de triterpenos	36
4.2 Resultado das análises	39
4.2.1 Análise histoquímica	39
4.2.2 Análise de flavonóides	44
4.2.3 Análise de triterpenos	48
4.3 Discussão dos resultados	58
4.3.1 Análise histoquímica	58
4.3.2 Análise de flavonóides	59
4.3.3 Análise de triterpenos	60

5. Estudo fitoquímico de <i>Maytenus salicifolia</i> Reissek	62
5.1 Preparo do material vegetal	62
5.2 Análise fitoquímica da polpa de fruto	63
5.2.1 Preparo dos extratos da polpa de fruto de <i>Maytenus salicifolia</i>	63
5.2.2 Elaboração do extrato em hexano (EHP)	64
5.2.3 Elaboração do extrato em acetato de etila (EAP)	65
5.2.4 Elaboração do extrato em metanol (EMP)	67
5.3 Análise fitoquímica de folhas	67
5.3.1 Preparo dos extratos das folhas de <i>Maytenus salicifolia</i>	67
5.3.2 Elaboração do extrato em hexano (EHF)	68
5.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas	74
MP9 e MF9: Lupeol	74
MP10: Glutinol	76
MP11 e MP13: Rutina	78
MP12: Epicatequina	87
MF0: Friedelina	91
MF1: Mistura de hidrocarbonetos	94
MF2: Tanaceteno	95
MF3 e MF4: araquidatos de α -amirina, β -amirina e isomultiflorenol	98
MF5: 3β -araquidoiloxi-11-oxo-ursan-12-eno	102
MF6: 3β -esteariloxi-D:C-friedoleanan-7-eno	109
MF7: 3β -esteariloxi-lup-20(29)-eno	117
MF8: epi- α -amirina, epi- β -amirina e epi-multiflorenol	120
MF10: β -amirina e multiflorenol	123
MF11: β -sitosterol	126
MF12: Campesterol	129
MF13: $1\beta,3\alpha$ -dihidroxi-D:C-friedoleanan-7-eno	131
CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	“Adenosine triphosphate”
δ	Deslocamento químico
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
DEPT	“Distortionless enhancement by polarization transfer”
DIC	Detector de ionização em chama
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
EAP	Extrato em acetato de etila de polpa de fruto de <i>Maytenus salicifolia</i>
EHF	Extrato em hexano de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i>
EHP	Extrato em hexano de polpa de fruto de <i>Maytenus salicifolia</i>
EMP	Extrato em metanol de fruto de <i>Maytenus salicifolia</i>
FTIR	“Fourier transform infrared spectroscopy”
HMBC	“Heteronuclear multiple bond coherence”
HSQC	“Heteronuclear single quantum coherence”
Hz	Hertz
Kev	10^3 eletron volts
MF	Substâncias isoladas do extrato de folhas de <i>M. salicifolia</i>
MHz	Megahertz
MP	Substâncias isoladas dos extratos de polpa de fruto de <i>M. salicifolia</i>
NIST	“National Institute of Standards and Technology”
$\bar{\nu}$	Número de onda (cm^{-1})
PA	Para análise
Pág.	Página(s)
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RNA	“Ribonucleic Acid”
TIC	“Total ion chromatogram”
TMS	Tetrametilsilano

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura: 1 Faixas de tempo geológico, do Cretáceo ao Oligoceno (Gradstein, 2009). 2
- Figura: 2 Ciclização do 2,3-oxido-esqualeno em cicloartenol e β -amirina. O número de etapas é indicado pelas setas. 14
- Figura: 3 Alinhamento de parte da seqüência de aminoácidos da β -amirina sintase e da cicloartenol sintase isolados de *Panax ginseng*. As seqüências idênticas são mostradas em negrito e cada letra refere-se a um aminoácido de acordo com a nomenclatura internacional (IUPAC, 1984; Ebizuca, 1998). 15
- Figura: 4 Distribuição geográfica da família *Celastraceae* (Stevens, 2006). 19
- Figura: 5 Foto da lateral da copa (A) e da infrutescência (B) de um exemplar de porte arbóreo da espécie *M. salicifolia* localizada na Estação Ecológica da UFMG (Miranda, 2007). 21
- Figura: 6 Compostos isolados de *M. salicifolia* (*Celastraceae*). Friedelina (1), 3β -friedelinol (2), α -amirina (3), β -amirina (4), lupeol (5) e 3β -sitosterol (6) (Valladão, 2005; Miranda, 2006). 21

2. Áreas de estudo

- Figura: 7 Mapa da região de coleta evidenciando os biomas (cerrado e mata) e as áreas de transição (regiões de tensão ecológica). As letras em maiúsculo (A, B e C) referem-se às populações de Ouro Branco, Belo Horizonte e Caeté, respectivamente. 26
- Figura: 8 Mapa da região de coleta mostrando os tipos climáticos regionais. As letras em maiúsculo (A, B e C) referem-se às populações de Ouro Branco, Belo Horizonte e Caeté, respectivamente. 27
- Figura: 9 Mapa apresentando as variações do solo mineiro na região de coleta. As letras em maiúsculo (A, B e C) referem-se às populações de Ouro Branco, Belo Horizonte e Caeté, respectivamente. 27

4. Estudo quimiotaxonômico de *Maytenus* sp.

- Figura: 10 Fluxograma do protocolo de análise hitoquímica realizada em seguimentos de cortes de folhas de *M. salicifolia* e *M. gonoclada* (Kraus, 1997). 37
- Figura: 11 Fluxograma do protocolo de análise de flavonóides em folhas de *M. salicifolia* e *M. gonoclada*. 38
- Figura: 12 Fluxograma do protocolo de análise de triterpenos em folhas de *M. salicifolia* e *M. gonoclada*. 38

Figura: 13	Cortes transversais das lâminas foliares (aumento de 40X) de <i>M. salicifolia</i> – OB (A) e BH (B), e <i>M. gonoclada</i> (C) corados com “vermelho de sudan B”.	40
Figura: 14	Cortes transversais das nervuras principais (aumento de 4X) de <i>M. salicifolia</i> – OB (A) e BH (B), e <i>M. gonoclada</i> (C) corados com cloreto férrico.	41
Figura: 15	Cortes transversais das nervuras principais (aumento de 10X) de <i>M. salicifolia</i> – OB (A) e BH (B), e <i>M. gonoclada</i> (C) corados com floroglucinol.	42
Figura: 16	Cortes transversais das nervuras principais (aumento de 4X) de <i>M. salicifolia</i> – OB (A) e BH (B), e <i>M. gonoclada</i> (C) corados com lugol.	43
Figura: 17	Cromatograma obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i> , população Ouro Branco (OB).	44
Figura: 18	Cromatograma obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de <i>Maytenus gonoclada</i> , população Caeté (CA).	45
Figura: 19	Cromatograma obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i> , população Belo Horizonte (BH).	45
Figura: 20	Cromatograma obtido por CLAE/UV da amostra padrão de rutina.	46
Figura: 21	Cromatograma obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de <i>M. gonoclada</i> (linha azul) e o padrão de rutina (linha verde) utilizando um sistema de eluição com 100 % de solução B (<i>vide</i> subitem 4.1.2, Análise de flavonóides, pág. 35).	47
Figura: 22	Cromatogramas obtidos por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i> OB (linha marrom), <i>M. salicifolia</i> BH (linha verde) e <i>M. gonoclada</i> CA (linha azul).	47
Figura: 23	Sextuplicatas do extrato em hexano de <i>M. salicifolia</i> OB com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do método de análise de compostos por CG/EM.	48
Figura: 24	Perfil cromatográfico obtido por CG/EM de extrato em hexano de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i> , população Ouro Branco.	49
Figura: 25	Perfil cromatográfico obtido por CG/EM de extrato em hexano de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i> , população Belo Horizonte.	50
Figura: 26	Perfil cromatográfico obtido por CG/EM de extrato em hexano de folhas de <i>Maytenus gonoclada</i> coletada em Caeté.	50

Figura: 27	Perfis cromatográficos obtidos por CG/EM de extrato em hexano de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i> OB (linha azul), <i>M. salicifolia</i> BH (linha vermelha) e <i>M. gonoclada</i> (linha preta).	51
Figura: 28	Espectro de massas relativo ao pico 1 das figuras 24, 25 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como hentriacontano (Valladão, 2005).	51
Figura: 29	Espectro de massas relativo ao pico 2 das figuras 24, 25 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como α -tocoferol ou vitamina E.	52
Figura: 30	Espectro de massas relativo ao pico 3 das figuras 24, 25 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como dotriacontano (Valladão, 2005).	52
Figura: 31	Espectro de massas relativo ao pico 4 das figuras 24, 25 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como tritriacontano (Valladão, 2005).	53
Figura: 32	Espectro de massas relativo ao pico 5 das figuras 24, 25 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como β -sitosterol.	53
Figura: 33	Espectro de massas relativo ao pico 6 das figuras 24, 25 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como β -amirina.	54
Figura: 34	Espectro de massas relativo ao pico 7 da figura 24 (pag. 49) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como tetratriacontano (Valladão, 2005).	54
Figura: 35	Espectro de massas relativo ao pico 8 das figuras 24, 25 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como lupeol.	55
Figura: 36	Espectro de massas relativo ao pico 9 das figuras 24 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como β -friedelinol.	55
Figura: 37	Espectro de massas relativo ao pico 10 das figuras 24 e 26 (pag. 49 e 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como friedelina.	56
Figura: 38	Espectro de massas relativo ao pico 11 da figuras 25 (pag. 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como α -amirina.	56
Figura: 39	Espectro de massas relativo ao pico 12 da figura 25 (pag. 50) obtido por CG/EM. A substância foi identificada como simiarenol (Shiojima, 1999).	57

5. Estudo fitoquímico de *Maytenus salicifolia* Reissek

Figura: 40	Figura 40: Esquema mostrando o isolamento das substâncias de polpa de fruto de <i>Maytenus salicifolia</i> (BH).	63
Figura: 41	Esquema do processo de obtenção dos extratos de polpa de frutos de <i>Maytenus salicifolia</i> Reissek.	64
Figura: 42	Esquema do processo utilizado para obtenção de extrato em hexano de folhas de <i>Maytenus salicifolia</i> .	69
Figura: 43	Esquema mostrando o processo de elaboração de EHF através da coluna C-1.	69
Figura 44	Espectro de RMN de ^1H de MP9 e MF7 (CDCl_3 , 400 MHz).	75
Figura: 45	Espectro de RMN de ^{13}C de MP9 e MF7 (CDCl_3 , 100 MHz).	75
Figura: 46	Espectro de RMN de ^1H de MP10 (CDCl_3 , 400 MHz).	77
Figura: 47	Espectro de RMN de ^{13}C de MP10 (CDCl_3 , 100 MHz).	78
Figura: 48	Espectro na região do infravermelho de MP11 (cm^{-1}).	80
Figura: 49	Espectro de RMN de ^1H de MP11 (D_2O , 400 MHz).	81
Figura: 50	Seção expandida do espectro de RMN de ^1H de MP11 (D_2O , 400 MHz): δ_{H} 3,2 a 3,9.	81
Figura: 51	Espectro de RMN de ^{13}C de MP11 (D_2O , 100 MHz).	82
Figura: 52	Subespectro DEPT-135 de MP11 (D_2O , 100 MHz).	82
Figura: 53	Mapa de contornos HSQC de MP11 (D_2O , 100 MHz).	83
Figura: 54	Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MP11 (D_2O , 100 MHz): δ_{C} 65 a 80.	83
Figura: 55	Mapa de contornos HMBC de MP11 (D_2O , 100 MHz).	84
Figura: 56	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MP11 (D_2O , 100 MHz): δ_{C} 130 a 170.	84

Figura: 57	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MP11 (D ₂ O, 100 MHz): δ_c 90 a 125.	85
Figura: 58	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MP11 (D ₂ O, 100 MHz): δ_c 60 a 80.	85
Figura: 59	Espectro na região do infravermelho de MP11 (KBr, cm ⁻¹).	88
Figura: 60	Espectro de RMN de ¹ H de MP12 (CDCl ₃ , 400 MHz).	88
Figura: 61	Espectro de RMN de ¹³ C de MP12 (CDCl ₃ , 100 MHz).	89
Figura: 62	Subespectro DEPT-135 de MP12 (CDCl ₃ , 100 MHz).	89
Figura: 63	Mapa de contornos HSQC de MP12 (CDCl ₃ , 100 MHz).	90
Figura: 64	Mapa de contornos HMBC de MP12 (CDCl ₃ , 100 MHz).	90
Figura: 65	Seção expandida do espectro de RMN de ¹ H de MF0 (CDCl ₃ , 400 MHz), região entre δ_H 0,20 e 2,50.	92
Figura: 66	Espectro de RMN de ¹³ C de MF0 (CDCl ₃ , 100 MHz).	92
Figura: 67	Subespectro DEPT-135 de MF0 (CDCl ₃ , 100 MHz).	93
Figura: 68	Cromatograma e espectro de massas obtido de MF0 em análise por CG/EM.	93
Figura: 69	Espectro no IV de MF1 (KBr).	94
Figura: 70	Cromatograma obtido por CG – FID para: padrões (linha contínua) e MF1 (linha fragmentada).	94
Figura: 71	Espectro de RMN de ¹ H de MF2 (CDCl ₃ , 400 MHz).	95
Figura: 72	Espectro de RMN de ¹³ C de MF2 (CDCl ₃ , 100 MHz).	96
Figura: 73	Subespectro DEPT-135 de MF2 (CDCl ₃ , 100 MHz).	97

Figura: 74	Compostos identificados em MF3 e MF4 por RMN de H^1 e C^{13} .	99
Figura: 75	Espectro de RMN de H^1 de MF3 e MF4 ($CDCl_3$, 400 MHz).	100
Figura: 76	Espectro de RMN de C^{13} de MF3 e MF4 ($CDCl_3$, 100 MHz).	100
Figura: 77	Subespectro DEPT-135 de MF3 e MF4 ($CDCl_3$, 100 MHz).	100
Figura: 78	Espectro de RMN de H^1 de MF5 ($CDCl_3$; 400 MHz).	104
Figura: 79	Espectro de RMN de C^{13} de MF5 ($CDCl_3$, 100 MHz).	104
Figura: 80	Subespectro DEPT-135 de MF5 ($CDCl_3$, 100 MHz).	105
Figura: 81	Mapa de contornos HSQC de MF5 ($CDCl_3$, 100 MHz).	105
Figura: 82	Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF5 ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_c 12 a 64.	106
Figura: 83	Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF5 ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_c 14 a 36.	106
Figura: 84	Mapa de contornos HMBC de MF5 ($CDCl_3$, 100 MHz).	107
Figura: 85	Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF5 ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_c 10 a 70.	107
Figura: 86	Espectro de RMN de H^1 de MF6 ($CDCl_3$, 400 MHz).	111
Figura: 87	Espectro de RMN de C^{13} quantitativo de MF6 ($CDCl_3$, 100 MHz).	112
Figura: 88	Subespectro DEPT-135 de MF6 ($CDCl_3$, 100 MHz).	112
Figura: 89	Mapa de contornos HSQC de MF6 ($CDCl_3$, 100 MHz).	113
Figura: 90	Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF6 ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_c 10 a 55.	113

Figura: 91	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl ₃ , 100 MHz): δ _c 20 a 150.	114
Figura: 92	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl ₃ , 100 MHz): δ _c 15 a 50.	114
Figura: 93	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl ₃ , 100 MHz): δ _c 10 a 180.	115
Figura: 94	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl ₃ , 100 MHz): δ _c 115 a 175.	115
Figura: 95	Espectro de RMN de ¹ H de MF7 (CDCl ₃ ; 400 MHz).	118
Figura: 96	Espectro de RMN de ¹³ C de MF7 (CDCl ₃ ; 100 MHz).	118
Figura: 97	Compostos identificados em MF8 por RMN de ¹ H e ¹³ C.	120
Figura: 98	Espectro de RMN de ¹ H de MF8 (CDCl ₃ , 400 MHz).	121
Figura: 99	Espectro de RMN de ¹³ C de MF8(CDCl ₃ , 100 MH).	121
Figura: 100	Subespectro DEPT-135 de MF8 (CDCl ₃ , 100 MHz).	121
Figura: 101	Espectro de RMN de ¹ H de MF10 (CDCl ₃ , 400 MHz).	124
Figura: 102	Espectro de RMN de ¹³ C de MF10 (CDCl ₃ , 100 MHz).	124
Figura: 103	Subespectro DEPT-135 de MF10 (CDCl ₃ , 100 MHz).	124
Figura: 104	Espectro de RMN de ¹ H de MF11 (CDCl ₃ , 400 MHz).	127
Figura: 105	Espectro de RMN de ¹³ C de MF11 (CDCl ₃ , 100 MHz).	127
Figura: 106	Subespectro DEPT-135 de MF11 (CDCl ₃ , 100 MHz).	128
Figura: 107	Espectro de massas obtido de MF11 por CG/EM.	129
Figura: 108	Cromatograma obtido de MF12 por CG/EM.	127

Figura: 109	Espectro de massas obtido de MF12 por CG/EM.	130
Figura: 110	Espectro de RMN de ^1H de MF13 (CDCl_3 , 400 MHz).	133
Figura: 111	Espectro de RMN de ^{13}C de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz).	133
Figura: 112	Subespectro DEPT-135 de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz).	134
Figura: 113	Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 0 a 50.	134
Figura: 114	Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 45 a 150.	135
Figura: 115	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 5 a 55.	135
Figura: 116	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 20 a 80.	136
Figura: 117	Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 60 a 150.	136
Figura: 118	Mapa de contornos NOESY de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz).	137
Figura: 119	Cromatograma e espectro de massas obtido de MF13 em análise por CG/EM.	137

LISTA DE TABELAS

4. Estudo quimiotaxonômico de *Maytenus* sp.

Tabela: 1	Compostos identificados por CG/MS na análise de extratos em hexano de <i>M. salicifolia</i> (OB e BH) e <i>M. gonoclada</i> (CA)	57
-----------	--	----

5. Estudo fitoquímico de *Maytenus salicifolia* reissek

Tabela: 2	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MP9 (3 β -hidroxilup-20(29)-eno) com dados da literatura para o Lupeol (Souza, 2001)	76
Tabela: 3	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MP10 (3 β -hidroxid:D:B-friedo-olean-5-eno) com dados da literatura para o Glutinol (Agrawal, 1992)	77
Tabela: 4	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MP11 (quercetina-3- <i>O</i> -rutenosídeo) com dados da literatura para a rutina (Pastene, 2001)	86
Tabela: 5	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MP12 (epicatequina) com dados da literatura (Tanaka, 2005)	91
Tabela: 6	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF2 (Tanaceteno) com dados da literatura (Kaul, 2002)	97
Tabela: 7	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF4 com dados da literatura (Mahato, 1994; Miranda, 2006; SBDS, 2007)	101
Tabela: 8	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF5 com dados da literatura (Miranda, 2006; SBDS, 2007)	108
Tabela: 9	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF6 com dados da literatura (Mahato, 1994; SBDS, 1997)	116
Tabela: 10	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio de MF7 com dados da literatura para o 3 β -esteariloxilup-20(29)-eno (Miranda, 2007)	119
Tabela: 11	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF8 com dados da literatura (Agrawal, 1992; Mahato, 1994; Nakano, 1997)	122
Tabela: 12	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF10 com dados da literatura (Agrawal, 1992; Mahato, 1994; Nakano, 1997)	125
Tabela: 13	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF11 (β -sitosterol) com dados da literatura (Valladão, 2005)	128
Tabela: 14	Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF13 com dados da literatura (Mahato, 1994; Nakano, 1997)	138

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo quimiotaxonômico de *Maytenus salicifolia* e *Maytenus gonoclada*, e o estudo fitoquímico de polpa de fruto e folhas de *Maytenus salicifolia* coletada na Estação Ecológica da UFMG em Belo Horizonte. A partir do estudo quimiotaxonômico (histoquímico e cromatográfico) pôde-se constatar que as duas populações de *M. salicifolia* estudadas apresentaram diferenças entre si e em relação à *Maytenus gonoclada*, resultados que demonstram que os grupos trabalhados apresentam grande capacidade de adaptação, em consequência das diferenças nos *habitats* nos quais estão inseridas as populações coletadas. As informações obtidas nos estudos histoquímicos, por CG/EM e por CLAE/UV são cruciais e determinantes para uma possível revisão na classificação taxonômica das espécies estudadas neste trabalho.

O estudo fitoquímico da polpa do fruto de *Maytenus salicifolia* possibilitou o isolamento e a identificação do triterpeno pentacíclico lupeol e de dois flavonóides, a rutina e a epicatequina. No extrato hexânico das folhas foram identificados α -amirina, β -amirina, isomultiflorenol, multiflorenol, *epi*- α -amirina, *epi*- β -amirina, *epi*-multiflorenol e isolados lupeol, β -sitosterol, tanaceteno e, três compostos inéditos na literatura, 3β -araquidoiloxi-11-oxo-ursan-12-eno, 3β -esteariloxi-D:C-friedoleanan-7-eno e $1\beta,3\alpha$ -dihidroxi-D:C-friedoleanan-7-eno.

ABSTRACT

This work describes the chemotaxonomy study of *Maytenus salicifolia* and *Maytenus gonoclada*, and the phytochemical study of the fruit pulp and leaves of *Maytenus salicifolia* collected in UFMG Ecological Station in Belo Horizonte city.

The chemotaxonomy study (histochemical and chromatography) makes possible to distinguish the two population of *M. salicifolia* analyzed and discerned *M. gonoclada* population from the two groups of *M. salicifolia*. These results demonstrate that groups assayed exhibit a great ability of adaptation like result of the stresses existant in each *habitat* which the population worked are inserted. The informations obtained from histochemical techniques, GC/MS and HPLC/UV are critical and fundamental in an eventual adjustment in the taxonomic classification of the studied species in this work.

The phytochemical study made possible to isolate and to identify from *M. salicifolia* fruit pulp one pentacyclic triterpene lupeol and two flavonoids, rutin and epicatechin. From the leaves of the same plant was possible to identify α -amyrin, β -amyrin, isomultiflorenol, multiflorenol, *epi*- α -amyrin, *epi*- β -amyrin, *epi*-multiflorenol and to isolate the lupeol, β -sitosterol, tanacetene as well as three compounds unpublished in scientific literature: 3 β -araquidoiloxo-11-oxo-ursan-12-ene, 3 β -steariloxo-D:C-friedooleanane-7-ene and 1 β ,3 α -dihydroxy-D:C-friedooleanane-7-ene.

INTRODUÇÃO

Evolução e adaptação das plantas com flores

Em uma carta endereçada a “Sir” Joseph Dalton Hooker, um dos mais importantes botânicos do século XIX, Charles Darwin se referiu à origem das angiospermas como um “abominável mistério”. A resolução desse enigma ignóbil de forma convincente, ou melhor, a determinação do grupo ancestral dos quais as angiospermas se originou é um árduo ofício que demanda um estudo criterioso a fim de evitar equívocos já cometidos. Essa informação ainda permanece obscura, e espera-se que esteja oculta em algum fóssil ainda não descoberto (Savolainen, 2004; Soltis, 2008).

Recentemente, escavações paleontológicas permitiram determinar que os primeiros fósseis deste grupo de plantas datam do cretáceo inferior, há pelo menos 134 milhões de anos (Bell, 2000; Magallón, 2001). Entre estes vestígios iniciais e o acelerado processo de evolução e diversificação, as angiospermas demandaram cerca de 10 milhões de anos que é uma estreita faixa de tempo em comparação com outros grupos vegetais. Este processo de transformação, que afetou de forma direta ou indireta todo o reino vegetal, ocorreu entre o Aptiano e Cenomaniano (Figura 1, pág. 2) em uma escala global (Van de Peer, 2005). Estudos paleobotânicos focados neste período de tempo geológico mostraram a presença de fósseis relacionados a muitos gêneros modernos e vários gêneros extintos relacionados com as famílias de espécies atuais (Knobloch, 1991).

As plantas agrupadas na divisão *Magnoliophyta* ou *Anthophyta* apresentam óvulos e grãos de pólen encerrados em flores, endosperma, elementos de vaso no xilema, elementos de tubo crivado e células companheiras no floema. As flores são providas de um cálice (sépalas) e uma corola (pétalas), com função de proteger os órgãos reprodutivos e atrair animais polinizadores, o que foi sendo alcançado através da coloração, aroma e formas diferenciadas (Cronquist, 1988). Esta combinação de características deve ter proporcionado as condições necessárias para uma rápida diversificação e evolução, especialmente em resposta à seleção de insetos polinizadores e herbívoros (Van de Peer, 2005).

As características que distinguem as angiospermas dos outros grupos vegetais como as briófitas, pteridófitas e gimnospermas, certamente propiciaram uma melhor adaptação ao meio durante milhões de anos (Cronquist, 1988). Entretanto, algumas adaptações certamente facilitaram o espantoso processo adaptativo ocorrido durante o período Cretáceo, permitindo a disseminação e o domínio de várias partes do planeta. Uma dessas “inovações” foi o

desenvolvimento de um sistema de defesa constituído por compostos químicos (moléculas bioativas) produzidas em vias metabólicas, até então, “inéditas” no reino vegetal, levando a uma fantástica diversidade de compostos químicos conhecidos modernamente como compostos secundários (Gottlieb, 1987; Wink, 2003).

Período geológico	Fases	Escala de tempo
Oligoceno	Chatiano	23x10 ⁶ anos
	Rupeliano	
Eoceno	Priaboniano	34x10 ⁶ anos
	Bartoniano	
	Lutetiano	
	Ypresiano	
Paleoceno	Thanetiano	56x10 ⁶ anos
	Selandiano	
	Daniano	
Superior	Maastrichtiano	65x10 ⁶ anos
	Campaniano	
	Santoniano	
	Coniaciano	
	Turoniano	
	Cenomaniano	
Cretácio	Albiano	100x10 ⁶ anos
	Aptiano	
	Barremiano	
	Hauteriviano	
	Valanginiano	
	Berriasiano	

Figura 1: Faixas de tempo geológico, do Cretáceo ao Oligoceno (Gradstein, 2009).

Estudos quimiosistemáticos sugerem que as primeiras plantas terrestres, muito similares às briófitas, produziam substâncias originárias da via do ácido cinâmico (tais como flavonóides) com a finalidade de absorver e diminuir os efeitos prejudiciais da radiação na região do ultravioleta. Estes compostos agem como obstáculo para esta faixa do espectro eletromagnético tanto em *Bryophyta*, quanto para os outros grupos de plantas terrestres (Gottlieb, 1987; Wink, 2003).

A rota do cinamato viabilizou, também, a adaptação a outras pressões ambientais. A lignina, polímero fundamental no processo de endurecimento da parede celulósica de plantas vasculares, é resultado da ativação da carboxila do ácido cinâmico e seus derivados pelo éster tiólico de cinamoil-CoA propiciando condensações a flavonóides e reações de redução. Os álcoois cinamílicos resultantes da redução podem se polimerizar oxidativamente em ligninas. A rota biossintética de flavonóides, por sua vez, pode resultar em catequinas e antocianidinas e a condensação dessas substâncias leva a taninos condensados, que são constituintes importantes na defesa contra diversos agentes agressores, tais como, vírus, bactérias, fungos, insetos e herbívoros (Gottlieb, 1987; Wink, 2003).

Ligninas e taninos condensados exerceram um papel importante na evolução das gimnospermas. Estes compostos fazem parte do principal mecanismo de defesa deste grupo de plantas, que tornam o tecido vegetal, formado por carboidratos e proteínas, mecânica e enzimaticamente indigerível. A presença de taninos condensados ocorre em mais de 70% dos gêneros estudados no qual a lignificação do tecido atinge altos níveis. Outros constituintes, tais como terpenos e flavonóides são encontrados com certa frequência nas gimnospermas, desempenhando várias funções importantes, tais como, proteção contra microrganismos e herbívoros. Apesar da diversidade de compostos, considerando a sua vasta distribuição geográfica, o longo período de seu domínio sobre a flora terrestre, ainda é muito pequeno o número de metabólitos secundários isolados de gimnospermas em comparação com as plantas com flores (Gottlieb, 1987; Gottlieb, 1995; Wink, 2003).

Nas angiospermas, a adaptação química se tornou especializada. “Substâncias ativas” (aleloquímicos) gradualmente ocuparam a função outrora dos taninos condensados e das ligninas. Existem fortes indícios de que um processo de indução de mecanismos de resistência por animais e vegetais, e a produção de um composto em detrimento de outro, dentro de uma mesma rota anabólica ou através de uma nova rota, levou a uma espantosa diversidade de substâncias produzidas pelas angiospermas. Assim, o efeito da associação de plantas floríferas com outras plantas, fungos, insetos e animais vertebrados, permitiram a biossíntese de produtos naturais que, possivelmente, teve um papel extraordinário na consolidação do domínio terrestre pelas plantas com flores nos últimos 100 milhões de anos (Gottlieb, 1987; Pichersky, 2000; Lerda, 2003; Wink, 2003).

A capacidade adaptativa dos organismos pertencentes ao Reino Plantae é notória. Essa habilidade de amoldamento ao ambiente, que culminou com um alto nível de complexidade, permitiu a colonização do planeta por diversos grupos vegetais, dos quais se destaca o grupo das angiospermas (Raven, 2001; Barroso, 2002, Valladão, 2005).

Sistemas de classificação de angiospermas

A diversidade de espécies que compartilham a biosfera terrestre é exuberante! Estima-se que cerca de 14 milhões de diferentes tipos de organismos vivos compartilham a biosfera terrestre. Entretanto, estima-se que, até o momento foi nomeada e catalogada apenas uma fração deste, abrangendo cerca de 1,75 milhão de organismos. Dentre os seres vivos existentes estima-se que haja mais de 420.000 espécies no reino *Plantae*, sendo que, deste total, aproximadamente 40% não foram descritas e nem catalogadas (Raven, 2001; GBO, 2002; Baillie, 2004; Valladão, 2005).

Compreendendo cerca de 90% das espécies de plantas conhecidas, as angiospermas, ou plantas com flores, apresentam uma extraordinária riqueza taxonômica e ocupam os mais diversos *habitats* terrestres, com exceção das grandes cordilheiras (Himalaia e Andes), dos pólos e regiões circunvizinhas, e das regiões abissais de mares e oceanos. Consideradas o maior grupo de organismos fotossintetizantes, as angiospermas variam de pequenas ervas a árvores de grande porte ou plantas adaptadas a viver sobre troncos de outras plantas, como as epífitas. Com cerca de 260.000 espécies, esta divisão tem dominado o planeta por mais de 90 milhões de anos (Raven, 2001; Barroso, 2002; GBO, 2002; Seberg, 2004; Baillie, 2004).

A existência dessa espantosa diversidade de espécies nas angiospermas tornou necessária uma sistematização com base em critérios de fácil utilização, agrupando os indivíduos com maior similaridade morfológica e anatômica em níveis hierárquicos, dependentes do grau de uniformidade das características analisadas. A hierarquização e caracterização dos diferentes grupos de vegetais levaram uma das atividades antigas e intrínsecas do ser humano e conhecida desde o século XVII como taxonomia, a se estabelecer como uma das mais importantes áreas das ciências naturais (Keogh, 1995; Poser, 2001; Raven, 2001; Klinkenberg, 2008).

O mais antigo sistema de classificação taxonômica foi proposto por Teofrasto de Ereso, considerado o pai da botânica. O brilhante discípulo de Aristóteles classificou aproximadamente 500 plantas em um sistema rudimentar constituído por três grupos, árvores, arbustos e ervas, separando ou agrupando-os através das características foliares. Este sistema prevaleceu por quase 2000 anos até ser substituído por preceitos mais elaborados em consequência da agregação de novas informações e de modernos conceitos (Fralish, 2001; Raven, 2001; Singh, 2004).

O ressurgimento da taxonomia ocorreu em meados do século XIV como uma consequência da renovação do interesse pelas plantas e extensa exploração tanto no velho

mundo quanto no continente recém descoberto. O número de plantas aumentou enormemente e a necessidade de formalizar uma classificação desse material, possibilitou a consolidação da botânica, outrora à margem de outras áreas (Fralish, 2001; Raven, 2001; Singh, 2004).

A partir deste período, foram propostos conceitos inovadores que são utilizados até hoje. O moderno conceito de *genus* e vários nomes de gêneros validados pelas recentes regras de nomenclatura foram sugeridos por Joseph Pitton de Tournefort. Outro botânico, John Ray, propôs um sistema baseado em estruturas morfológicas grosseiras, de fácil distinção. As subdivisões eram baseadas no tipo de fruto e características das folhas e flores. Esta abordagem, posteriormente, tornou-se as bases da moderna classificação taxonômica proposta por Linné e Jussieu (Fralish, 2001; Raven, 2001; Singh, 2004).

Em uma de suas primeiras publicações intitulada *Hortus Uplandicus, Caroli a Linné* ou *Carolus Linnaeus*, propôs um sistema de classificação de plantas denominado de “Sistema Sexual”. Mais tarde, em sua publicação mais notável, “*Species Plantarum*”, sugeriu a atribuição de dois nomes, um binômio latino, para todas as plantas conhecidas. O sistema binomial é referendado pelas atuais regras de nomenclatura botânica e muitos nomes atribuídos por Linné são válidos até hoje (Linné, 1766; Fralish, 2001; Raven, 2001; Barroso, 2002; Singh, 2004).

As limitações do sistema sexual impulsionaram a pesquisa de novas formas de classificação que culminaram com o desenvolvimento do sistema natural. Um destes sistemas foi publicado por Antoine Laurent de Jussieu que, dando continuidade aos trabalhos de seu tio Bernard, organizou as plantas levando em consideração um número maior de características morfológicas, tais como o número de cotilédones, a estrutura da semente e outra série de caracteres vegetativos e reprodutivos. Seu sistema serviu, posteriormente, de base para o desenvolvimento de diversos sistemas modernos de classificação (Raven, 2001; Fralish, 2002; Stern, 2003; Singh, 2004).

Em meados do século 19, a proposta de Charles Darwin e Alfred Wallace iniciou um novo período de investigação botânica e classificação taxonômica que revolucionou pensamento biológico. Considerando a espécie como uma entidade dinâmica, que se modifica no decorrer do tempo, o princípio filogenético, desde então, tornou-se a base dos sistemas modernos de classificação, relacionando as plantas atuais com espécies extintas (Beaman, 1986; Raven, 2001; Fralish, 2002; Barroso, 2002; Singh, 2004).

Em conseqüência do número limitado de dados fósseis de plantas, tornou-se quase improvável a concepção de um sistema filogenético definitivo. Mesmo com várias propostas de classificação utilizando-se informações de diversas áreas do conhecimento, tais como,

bioquímica, fitoquímica, anatomia, morfologia, genética, citologia e paleontologia, ainda não foi possível conceber um sistema que persuadissem toda a comunidade científica. Assim, foram propostos vários sistemas no decorrer do século XX destacando-se as classificações de Cronquist, casal Dahlgren, Thorne e Takhtajan (Beaman, 1986; Singh, 2004).

Os trabalhos de Arthur Cronquist é um dos mais aceitos pela comunidade científica ocidental, e, talvez, o mais difundido. É um sistema extremamente simples em sua organização e muito didático. Utiliza-se de caracteres anatômicos, presença ou ausência de endosperma, composição química, morfologia dos órgãos reprodutores, entre outras características para alocar os diversos grupos de angiospermas ou *Magnoliophyta* (Barroso, 2002).

O início e o fim da década de 80 foram marcados por duas publicações do casal Rolf e Gertrud Dahlgren. Sua proposta era um sistema de classificação de angiospermas baseado, principalmente, na morfologia, embriologia, citologia e na distribuição de metabólitos secundários, por considerarem que não havia conhecimento do curso evolucionário das angiospermas suficientes para se classificar corretamente esse grupo de plantas (Barroso, 2002).

Na década subsequente, Thorne, em seu artigo intitulado *The classification and geography of the flowering plants*, além de propor um sistema com maior detalhamento na classificação de subfamílias para família com grande número de espécies, contribuiu, também, com informações valiosas quanto à distribuição geográfica deste grupo de plantas (Singh, 2004).

A classificação para as angiospermas, nos fins do século XX, foi enriquecida pelas contribuições de Takhtajan que organizou os grupos baseado em características e aspectos vegetais aos moldes de Cronquist e Thorne, acrescentando uma complexidade dos níveis hierárquicos inferiores (Singh, 2004).

Durante a década de 90, a reconstrução da árvore filogenética das angiospermas deu um enorme passo. O acúmulo de dados relacionados com as análises genéticas, principalmente a seqüência genética do *locus* da ribulose 1,6 bifosfato carboxilase (*rbcL*), forneceu informações de suma importância para a estruturação de um novo sistema de classificação taxonômica. A análise cladística desses dados permitiu, em muitas situações, a resolução de conflitos existentes em modernos sistemas de classificação fundamentados principalmente na anatomia e morfologia. Com base nestas análises foi possível organizar este extraordinário grupo vegetal em 457 famílias, reunindo-as em seis grupos superiores:

monocotiledôneas, eudicotiledôneas, magnolídeas, angiospermas basais, Chloranthaceae, Ceratophyllum (Magallón, 2001; APG II, 2003; Soltis, 2004; Soltis, 2008).

Todas as propostas de sistemas para classificar esse e outros grupos de plantas são de grande valia, mas não há um consenso entre os botânicos com relação a um sistema de classificação único e definitivo, devido à grande diversidade biológica que um mesmo grupo de plantas, por menor que seja, pode apresentar. A definição de um sistema unificado de classificação, para alocar as várias formas de vida em suas reais posições hierárquicas na natureza, é um desafio. A solução desse desafio não envolve somente a responsabilidade de botânicos, mas também, de bioquímicos, com suas técnicas de seqüenciamento de material genético (DNA e RNA) e de fitoquímicos, através de estudos da presença e distribuição de metabólitos secundários nos diversos grupos de plantas (Valladão, 2005).

Quimiotaxonomia clássica e moderna

Em uma carta ao editor publicada na “Nature” em 1946 intitulada “Chemical Taxonomy”, Harold Munro Fox relatou diferenças químicas entre animais marinhos do Reino Unido e empregou estas características para classificá-los. Em 1951, A. R. Trim se utilizou desta mesma expressão para relatar um estudo químico comparativo realizado entre duas espécies de famílias distintas que, por coincidência, também fôra publicado na “Nature”. Estas foram as primeiras citações do termo “taxonomia química” que, nos fins da década de 50, se aglutinaram para dar origem ao vocábulo “chemotaxonomy” ou quimiotaxonomia utilizado em dois artigos consecutivos de fitoquímica comparativa de autoria de Robert Hegnauer. No Brasil, a palavra quimiotaxonomia foi utilizada pioneiramente em um trabalho (tese) por Braga, Eyton e Gottlieb em 1967 (Fox, 1946; Trim, 1951; Hegnauer, 1956; Hegnauer, 1958; Braga, 1967).

Mas a questão é: que ciência é a quimiotaxonomia? E qual o seu âmbito?

Apesar de não ser fácil delimitar e definir este área de pesquisa de forma didática, é possível dizer que, em sentido amplo (*lato senso*), a quimiotaxonomia é:

Uma ciência na interface da química com a biologia, inserida no contexto da sistemática vegetal que estuda a constituição/composição química à nível micro e macromolecular com a finalidade de confirmar, re-ordenar e/ou reclassificar os organismos vivos nos níveis hierárquicos definidos pelos métodos tradicionais de classificação (Hegnauer, 1967; Brondz, 1986; Hristozov, 2007; Frisvald, 2008).

Com a possibilidade de se aplicar a todos os seis reinos, com diversos trabalhos publicados focados na análise química de fungos, bactérias, algas, plantas e animais, a quimiotaxonomia pode ser dividida em macro e micromolecular. Considerado uma das principais ferramentas da sistemática do século XXI, a subárea macromolecular é assim nomeada em consequência das substâncias objetos de estudo, na sua maioria macromoléculas. Pode-se dizer que é o estudo do genoma e do proteoma, ou melhor, das proteínas, do RNA e DNA, trabalhos focados nesses biopolímeros vem permitindo aos taxonomistas proporem um novo sistema de classificação botânica baseado principalmente na análise dos genes que codificam a ribulose 1,6 bifosfato carboxilase (rbcL) e a subunidade beta da ATP sintase (atpB) presentes no genoma plastidial. A outra subárea da quimiotaxonomia é a micromolecular que de forma simplista pode ser considerada como o “estudo do metaboloma” que com o desenvolvimento das técnicas analíticas vem ganhando espaço nos últimos 60 anos, tanto em pesquisas de base nas universidades e centros de pesquisas (taxonomia e sistemática) quanto no setor industrial, principalmente na análise química de fitoterápicos (Beaman, 1986; APG II, 2003; Singh, 2004; Reynolds, 2007).

Entretanto, a história da taxonomia química e sua utilização na diferenciação de plantas não se tratam de uma área de estudo com pouco mais de meio século de idade, é uma ciência antiquíssima e está intimamente relacionada com a própria história da humanidade. Principiando uma rudimentar quimiotaxonomia aplicada, os ancestrais do homem moderno já organizavam as plantas de acordo com o uso, nutricional ou medicinal, propriedades que estão relacionadas à constituição química da espécie ou gênero em questão. Porém, o despertar desta área dentro das diretrizes científicas modernas somente ocorreu centenas de anos depois com os delineamentos de Nehemia Grew (1673), James Petiver (1699) e William Withering (1785) (Naik, 1985).

No início do século XIX, a composição química de espécies vegetais já intrigava e despertava um maior interesse dos pesquisadores, dentre os quais se destaca o botânico suíço Augustin Pyramus De Candolle. Em sua obra intitulada *Essai sur les propriétés médicales des Plantes, compares avec leurs formes extérieures et leur classification naturelle*, de 1816, DeCandolle relatou suas observações relativas à composição química de plantas e a influência do solo como descrito explicitamente neste trecho:

“C’est un phéromène continuellement présent a notre examen, que de voir diverse plantes nées dans um sol parfaitement semblable, produire dès matieres très-differentes, tandes que dès vegetaux analoguer, nées dasns lès sols differents, y forment des produits semblables” (Gibbs, 1963).

Assim, DeCandolle concluiu que plantas diferentes nascidas em solos análogos continham substâncias diferentes e que plantas idênticas em solos diferentes apresentavam produtos idênticos. Apesar de uma conclusão simplista, foi o primeiro a considerar características químicas como um parâmetro taxonômico. No final do mesmo século, vários pesquisadores seguiram a direção iniciada por DeCandolle, e deram sua contribuição para o desenvolvimento de uma área de pesquisa ainda anônima, destacando-se o farmacêutico Johan Fredrik Eijkman (Eykman) que relatou a ocorrência de alcalóides em certas famílias de plantas, a médica Helen Cecília De Silver Abbott Michael através de trabalhos relacionados à evolução, química e taxonomia vegetal, o botânico Maurice Greshoff que apresentou estudos comparando características taxonômicas e químicas de espécies vegetais e o botânico James Birtley McNair, por meio de vários trabalhos aplicando a química comparativa à taxonomia, especialmente através do artigo intitulado *A study of some characteristics of vegetable oils* de 1930, onde descreveu as características de aproximadamente 318 substâncias divididas em óleos, gorduras e graxas (McNair, 1930; Gibbs, 1963; Naik, 1985).

A necessidade de classificar corretamente os diversos grupos de plantas levou os taxonomistas a utilizarem parâmetros químicos para a classificação das espécies. As características químicas como a presença ou ausência de pigmentos e a ocorrência de cristais de natureza orgânica e inorgânica foram e ainda são usados como critério na identificação de várias famílias, visto que algumas plantas as apresentam e, em outras espécies, essas substâncias, são completamente ausentes (Gibbs, 1963).

A presença de cristais, como de oxalato de cálcio em forma de agulhas conhecidas como ráfides, foi citada pela primeira vez como característica taxonômica por Robert Brown num trabalho publicado em 1833. Outros trabalhos, relacionando a presença desse composto de formas diversas em grupos de plantas e sua importância taxonômica, foram publicados no início do século XX (Gibbs, 1963) e mais recentemente por William Louis Stern e Walter S. Judd (1999), Christina J. Prychid; Paula J. Rudall (1999) e Scott Zona (2004).

Substâncias de reserva, como o amido, podem ser identificadas na célula vegetal por reações de coloração e servirem como parâmetro de classificação e identificação de grupos vegetais, pois apresentam grãos de diversas formas que variam de um grupo para outro. Os

grãos de amido foram estudados inicialmente por Fritzsche em 1834. Em seu trabalho, este autor descreve grãos de diversas espécies. Outros pesquisadores utilizaram esta característica para classificar grupos de plantas, mas foi Reichert que, em 1913, publicou um trabalho relatando um estudo detalhado sobre o amido e a relação entre as características de material de reserva e a classificação taxonômica. Estes estudos revelaram que os diversos tipos de grãos de amido presentes nos diferentes grupos de plantas podem ser de grande valia para se classificar corretamente uma determinada espécie (Gibbs, 1963).

A presença ou ausência de inclusões sólidas e substâncias de reserva se mostraram de grande importância para a classificação taxonômica, tornando-se uma característica ainda utilizada para tal finalidade. Atualmente, no entanto, com o aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas analíticas, houve um maior interesse no intuito de utilizar a distribuição de compostos químicos, em particular, de metabólitos secundários como uma característica auxiliar para a adequada classificação das espécies de plantas (Valladão, 2005).

Em meados do século XX, os botânicos consideravam os compostos originados do metabolismo secundário de plantas superiores como resíduo de produtos do metabolismo primário, e que a grande diversidade e complexidade estrutural apresentada era nada mais que uma 'brincadeira da natureza'. Hoje, a justificativa mais aceita para a existência destes compostos é que a produção está intimamente relacionada com a adaptação das espécies ao meio ambiente (Wink, 2003).

Como uma regra, esses metabólitos secundários estão distribuídos em um dado táxon e uma pequena quantidade de compostos pode ser encontrada em maior concentração em meio a uma série de constituintes existentes em menor concentração. Além disso, o padrão dessa distribuição em uma espécie vegetal é muito complexo e variável nos diferentes órgãos da planta, nos estágios de desenvolvimento e entre indivíduos e populações (Wink, 2003). Esses produtos do metabolismo secundário apresentam várias características como estrutura química diversa, função metabólica não definida em certos casos, ocorrência limitada dentro dos grupos vegetais que mostra correlação com outras características como morfologia e fisiologia vegetal (Cronquist, 1980).

Nesse contexto, a quimiotaxonomia baseada na distribuição de compostos secundários e apoiada por estudos fitoquímicos, provocou um considerável impacto na evolução dos sistemas de classificação existentes. A prospecção fitoquímica em várias famílias de plantas, em particular, da subclasse *Magnoliopsida* tem fornecido subsídios para estudo da relação entre a evolução química e a distribuição de compostos secundários em diversos grupos de vegetais superiores. Como exemplos, citam-se o padrão sistemático de distribuição de alguns

metabólitos nas classes *Rosidae* e *Asteridae*; uma grande evidência coevolucionária nas dicotiledôneas, que se reflete principalmente na distribuição de taninos e o constante isolamento de substâncias de extratos de folhas, caules e raízes em espécies da família *Celastraceae* como a β -amirina, quinonametídeos e dulcitol, sendo, portanto, constituintes característicos deste grupo de plantas (Dharmassree, 1982).

Analisando o perfil de distribuição de metabólitos secundários nas dicotiledôneas, observa-se que, algumas vezes, quase todos os membros de um grupo de plantas partilham um mesmo padrão químico; isso justificaria o uso de marcadores químicos em taxonomia como a budleína A, uma lactona sesquiterpênica derivada do caurano, e alcalóides pirrolizidínicos para a família *Asteraceae* (Costa, 1999; Trigo, 1999), cumarinas como a xantiletina, o limonóide perforatina e alcalóides 4-quinolonas, para a família *Rutaceae* (Lima, 1999). São relatados, também, na literatura os triterpenos friedelina e β -friedelinol como marcadores químicos de espécies do gênero *Maytenus*, em especial de *M. ilicifolia* (Alberton, 2002). Por outro lado, vários compostos secundários podem ocorrer em famílias não relacionadas, devido à evolução convergente na qual, genes codificadores de uma determinada via biossintética ocorrem, independentemente, em vários ramos da árvore evolutiva das angiospermas.

A utilização de dados obtidos da prospecção fitoquímica em classificação taxonômica enfrenta outros problemas. Um deles é que, apesar do aumento das pesquisas, o número de espécies de plantas investigadas quimicamente é muito pequeno, levando à insuficiência de dados disponíveis. Há, também, a tendência (talvez viciosa) de se buscar determinados compostos em *taxa* que têm a maior chance de serem encontrados, deixando de investigar a ocorrência desses produtos em outras famílias nas quais teriam grande relevância em taxonomia. O fenômeno chamado de convergência química pode ocorrer, muitas vezes, em plantas não relacionadas que produzem as mesmas substâncias mostrando que tais produtos não devem ser usados como marcadores químicos. Variações entre uma mesma espécie podem ocorrer em função das condições edáficas, climáticas, estágio de crescimento e interações com outros organismos, causando alterações metabólicas e, conseqüentemente, químicas. Os custos nos processos de fracionamento e identificação, bem como as dificuldades no isolamento de substâncias presentes em pequenas concentrações tornam esse procedimento, às vezes, inviável. Mesmo com limitações, o conhecimento da composição química se mostra de grande valor para a reestruturação dos sistemas de classificação taxonômica (Falkenberg, 2001).

Recentemente, técnicas de análise utilizadas para o isolamento e caracterização de metabólitos secundários passaram a ser empregadas diretamente na identificação de espécies.

A impressão digital resultante da análise do extrato bruto ou de frações de métodos analíticos, tais como cromatografia gasosa ou líquida, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e outros, estão sendo utilizadas como métodos auxiliares à anatomia e morfologia aplicada à classificação taxonômica de diversos grupos de seres vivos.

As análises cromatográficas (Rogers, 2000; Hillig, 2004; Chen, 2006; Shao, 2007; Dixit, 2008), espectroscópicas (Schrader, 1999; Zodrow, 2003) e espectrométricas (Smedsgaard, 1996) de extratos e órgãos vegetais se revelaram métodos rápidos e eficientes na identificação e classificação de espécies. A utilização de perfil cromatográfico (*fingerprint*) em controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos foi recentemente referendada por diversos órgãos oficiais, tais como, Organização Mundial de Saúde (OMS), *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA), *Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte* (BfArM), *British Herbal Medicine Association* (BHMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apesar de serem necessárias pesquisas mais profundas com intuito de validar os métodos propostos e provar sua eficácia, não há dúvidas sobre as contribuições neste campo de estudo tão vasto e complexo que é a sistemática vegetal (WHO, 2000; Brasil, 2004; Cheng, 2006; Dixit, 2008).

Metabolismo secundário, fatores ambientais e adaptação gênica

Acredita-se que existam mais de 200.000 compostos secundários produzidos pelo reino vegetal. São chamados assim por não participarem diretamente do processo básico de crescimento e desenvolvimento das espécies que os produzem. Esses compostos representam um incrível potencial a ser explorado com a finalidade de gerar novos agentes farmacologicamente ativos (Benderoth, 2006).

A hipótese clássica, que procura explicar esta enorme diversidade metabólica, sugere que um processo recíproco de interação de plantas com agentes polinizadores e inimigos naturais culminou com uma seleção mútua (Benderoth, 2006). A capacidade de biossíntese desses compostos se moldou através do processo de evolução ocorrido em diferentes linhagens de plantas em função das necessidades impostas pelos vários *habitats*. Além da utilidade como defesa contra patógenos e herbívoros ou para impedir o crescimento de outras plantas, substâncias odoríferas foram produzidas para atrair insetos, aves e mamíferos polinizadores e assim aumentar as taxas de fertilização. Compostos químicos presentes em frutos impedem a deterioração e agem como sinal (coloração e aroma) sugerindo recompensa em caso de seu uso como alimento, indicando a presença de aminoácidos, vitaminas e

açúcares, auxiliando na dispersão de sementes ou podem, também, ter a função de prover resistência contra a alta salinidade do solo, seca prolongada e desidratação (Pichersky, 2000).

Portanto, diversos estímulos, oriundos do ambiente circunvizinho, constituídos pelos fatores bióticos, supracitados, e os abióticos, levaram à produção de inúmeros compostos secundários. As variáveis ambientais que afetam de forma profunda a anatomia e o metabolismo vegetal compreendem, principalmente, temperatura, disponibilidade de água, luminosidade, composição e constituição do solo, altitude e poluentes (Evans, 1996; Blatt, 1998; Lima, 2003). A interação entre vegetais superiores e o meio ambiente interferiu na produção de determinados compostos em prejuízo de outros devido à influência direta na via metabólica a nível transcricional, no sistema de ativação/desativação da expressão gênica (*Operon*) ou em nível pós-transcricional, em alguma etapa posterior, como por exemplo, na tradução e modificações pós-traducionais (Lehninger, 2002).

A natureza, entretanto, em sua caminhada evolutiva adotou mecanismos mais radicais de adaptação que alteraram e aperfeiçoaram várias rotas de produção de compostos secundários e suas respectivas enzimas, modificando diretamente o conteúdo genético através do aumento ou diminuição do número de cromossomos (aneuploidia ou poliploidia) ou por pequenas mutações em regiões específicas do DNA cromossomal (Evans, 1996).

A aneuploidia é conceituada como sendo uma alteração do cariótipo (conjunto de características dos cromossomos formados durante a metáfase) através da perda ou ganho de um ou alguns cromossomos. Esse processo de modificação do número 'n' de cromossomos de uma determinada espécie teve e ainda tem um papel importante no processo de adaptação, devido ao surgimento ou intensificação de determinadas características importantes à sobrevivência em consequência deste evento gênico. Outro fenômeno, que desempenhou um papel até mais importante na evolução das plantas superiores que o citado anteriormente, é a poliploidia. É, provavelmente, a alteração citogenética mais importante na especiação e evolução vegetal. Estima-se que 80% das espécies com flores se originaram por este processo. Este dispositivo celular restaura a fertilidade de híbridos regularizando o pareamento meiótico e apresentam também um efeito tamponante maior em relação à capacidade de adaptação, pois por possuírem mais cópias genômicas dos que os diplóides, podem acumular mais variabilidades encobertas. Ambos os processos de modificação no número de cromossomos interferem na produção de compostos secundários, diminuindo, aumentando ou inibindo a síntese destes metabólitos (Forni-Martins, 2000; Schifino-Wittmann, 2004; Schifino-Wittmann, 2005).

A intervenção mais drástica ocorreu no processo de mutação, através do qual ocorreu não somente atenuação, intensificação e inibição de rotas metabólicas, como também a formação de novas vias biossintéticas pela alteração do sítio ativo de enzimas e, conseqüentemente, de seu substrato e o respectivo produto da via. Esta hipótese é a explicação mais plausível para a diversificação das vias biossintéticas de diversos compostos, tais como os triterpenos. Conseqüentemente, a partir de um único substrato, o 2,3-oxido-esqualeno, é possível sintetizar diferentes compostos como o cicloartenol e a β -amirina (Figura 2). As mutações podem variar da substituição de uma base por outra, até a adição ou deleção de um ou mais pares de bases, mas sempre alterando, nestes casos, a característica mais importante da enzima: sua especificidade catalítica (Pichersky, 2000).

Evidências da origem de um novo gene que codifica uma enzima, em conseqüência do processo de mutação, são raras. A obtenção desses indícios é conseguida através da análise de um determinado gene e seu produto (proteína) numa espécie e em plantas relacionadas, bem como, da comparação dos dados obtidos com dados relacionados descritos em outros trabalhos ou banco de dados genéticos e de proteínas (Pichersky, 2000).

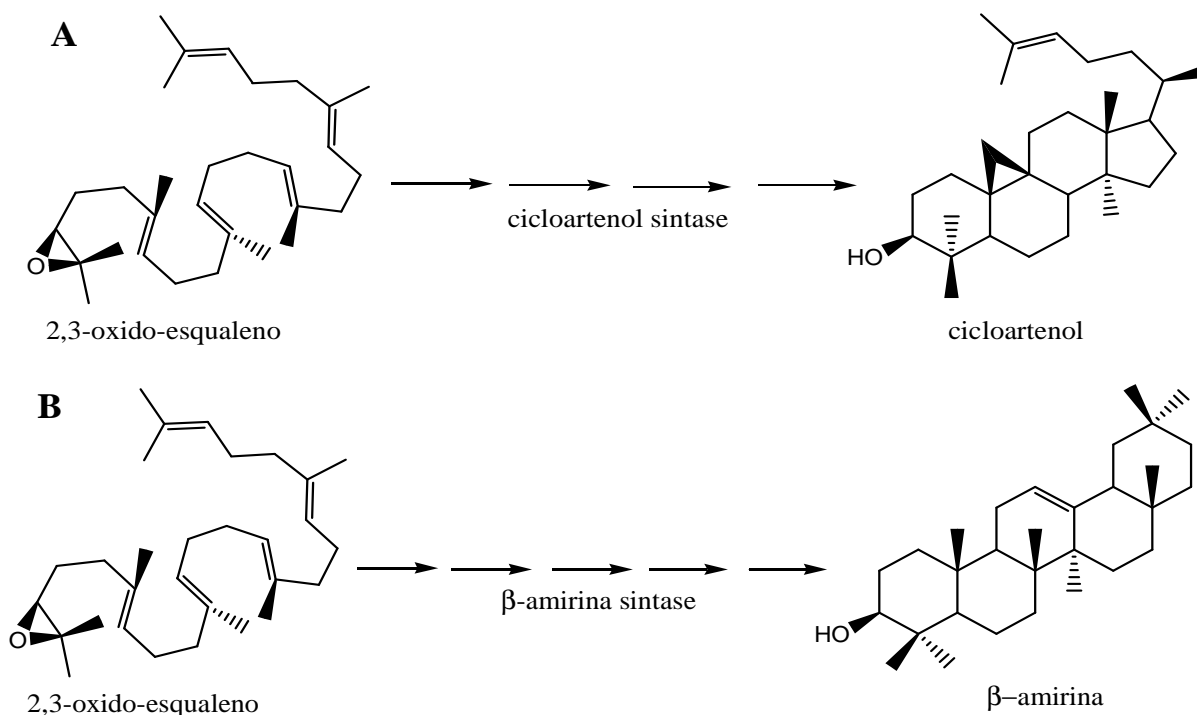


Figura 2: Ciclização do 2,3-oxido-esqualeno em cicloartenol e β -amirina. O número de etapas é indicado pelas setas.

Muitas das vias biossintéticas atuais podem ter se originado de mutações localizadas na região do sítio ativo de uma enzima ancestral. Essa possibilidade pode esclarecer a enorme similaridade das “triterpeno sintases” (Figura 3, pág. 15), que sugere uma diversificação

através de mutações. A β -amirina sintase (bAS), enzima responsável pela catálise da reação do 2,3-oxido-esqualeno em β -amirina, apresenta uma enorme similaridade com a cicloartenol sintase (CAS) que catalisa a conversão do 2,3-oxido-esqualeno em cicloartenol, precursor de esteróides em plantas. A bAS apresenta cerca de 60% de similaridade em relação à seqüência de aminoácidos com a CAS, o que corresponde a quase 460 de um total de aproximadamente 760 aminoácidos (Ebizuca, 1998; Ebizuca, 1999; Ebizuca, 2000; Qi, 2004; Abe, 2007).

β -amirina sintase	N-MWKLKIAEGN	KNDPYLYSTN	NFVGRQITWEE	DPDYVASPGE	LEBEVEQVRRO	FWDNRYQVKP	60		
Cicloartenol sintase	N-MWKLKIAEG-	GN-PWLRTLN	DHVGRQITWEE	DP-NIGSPEE	LAEVEKVRREN	ERNHRFEKKH	57		
	SCDLLWRMOF	LREKNFRQTI	POVKVGDDEA	VTYEAATTTL	RRAVHFFSAL	OASDGHWP	AE NSGPLFFLPP	LVMCVYITGH	140
	SADLLMRIQF	ANENPGSVVL	POVKVNDGED	ISEDKVTVTL	KRAMSFYSIL	QAHDGHWP	GD YGGPMFLMPG	LVITLSITGV	137
	LDTVFPAEHR	KEILRYIYCH	ONEDCGWGLH	IEGHSTMFCT	TLSYICMRIL	GEGPDGGVNN	ACARGRKWIL	DHGSVTATPS	220
	LNVVLSKEHK	REICRYLYNH	QNRDGGWGLH	IEGPSTMFCT	VLNYVTLRIL	GEGANDG-QG	AMEKGRQWIL	DHGSATATPS	216
	WGTWLSILG	VYEWIGSNPM	PPEFWILPSF	LPMHPAKMWC	YCRMVMPMS	YLYGKRFVGP	ITPLILQLRE	ELYGOPYNEI	300
	WGMWLSVLG	VFEWSGNPL	PPETWLLPYI	LEIHPGRMWC	HRRMVYLPMS	YLYGKRFVGP	ITPTVLSLRK	EVFSVPYHEI	296
	NWRKTRRVCA	KEDIYYPHPL	IODLLWDSLY	VLTEPLLTRW	PFNKLREKAL	QTTMKHHIHYE	DENSRYITIG	CVEKVLQMLV	380
	DWNQARNLCA	KEDLYYPHPL	IQDILWASLD	KVWEPIFMHW	BAKKLREKSL	RTVMEHITHYE	DENTRYICIG	PVNVKVLNMLC	376
	CWVEDPNGDY	FRKHLARIPD	YIWAEDGMK	MQ-SFGSOEW	DTGFSTOALL	DSDLTHEIGP	TLMKGHDFIK	KSOVKDNPSG	459
	CWVEDPNSEA	EKLHLPRLHD	FLWLAEDGMK	MQGYNGSQLW	DTAFAVQAIT	STNLAEYGP	TLRKAHIFMK	NSQVLDDCPG	456
	DFKSMYRHIS	KGSWTFSDOD	HGWQVSDCTA	EGLKCCILFS	TMPEEIVGKK	IKPERLYDSV	NVLLSLQRKN	GGLSAWEPAG	539
	DLDAWYRHVS	KGAWPFSTAD	HGWPISDCTA	EGEKAVLQLS	KLPESELVGP	LDARKLYDAV	NVLLSLQNSD	GGYATYELTR	536
	AQEWLELLNP	TEFFADIVIE	HEYVECTSSA	IQALVLFKKL	YPGHRKKEID	NFITNAVRYL	EDTOMP DGSW	YGNWGVCFY	619
	SYSWLELVNP	AETFCDIVID	YPYVECTSA	IQALTAFFKL	EPGHRREEIQ	HSIEKAALFI	EKIQSSDGSW	YGSWGVCFY	616
	GSWFALGGLA	AAGKTYYNCA	AVRKAVEFLL	KSOMDDGGWG	ESYLSCP KKV	YVPLEGNRSN	LVHTGWALMG	LIHSEQAERD	699
	GIWFGIKGLV	TAGRTFSSCA	SIRKACDFLL	SKQVASGGWG	ESYLSCQNKV	YTNLEGNRSH	VVNTGWAMLA	LIIDAGQAERD	696
	PTPLHRAAKL	LINSOMEDGD	FPOQETSQVF	MKNCMLHYAA	YRNITYPLWAL	AEYRRRVPLP	SLGT*-C	763	
	ATPLHRAAKL	LINSQOMEND	FPOQEIIMGVF	DKNCMITYAA	YRNIFPIWAL	GEYRCRVLQG	PS* -C	758	

Figura 3: Alinhamento de parte da seqüência de aminoácidos da β -amirina sintase e da cicloartenol sintase isolados de *Panax ginseng*. As seqüências idênticas são mostradas em negrito e cada letra refere-se a um aminoácido de acordo com a nomenclatura internacional (IUPAC, 1984; Ebizuca, 1998).

Todos os fenômenos relacionados a alteração e a criação de rotas de formação de compostos do metabolismo secundário podem conduzir à gênese das chamadas “raças” químicas ou, até mesmo, de novas espécies. Estas “raças” ou novas espécies estão habilitadas à sobreviverem em determinadas condições nos quais seus antecessores apresentaram dificuldades ao se adaptarem. Portanto, o ambiente, além de causar modificações gênicas de forma direta ou indireta, promove, também, a pressão necessária para que o mais capacitado sobreviva e passe adiante suas características, seu código genético, caminhando para obter o máximo de adaptação possível em um determinado *habitat* (Evans, 1996).

Estudo fitoquímico: desenvolvimento e implicações

Citações a respeito da utilização de plantas medicinais foram encontradas em diversos documentos antigos de várias culturas, tais como: sumérios, chineses e egípcios. Posteriormente, na Grécia antiga, vários estudiosos também contribuíram para a consolidação do estudo de plantas. Hipócrates, considerado como pai da medicina moderna, caracterizou-se por adotar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto, discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas, dissertou sobre as aplicações da *Papaver somniferum* (Bolzano, 2002; David, 2004).

A era moderna e a química de produtos naturais iniciou-se no século XVIII com o isolamento dos primeiros compostos de origem vegetal: a morfina (1803), a quinina (1819) e a atropina (1831) (Nascimento, 2006). No Brasil, a comitiva da grã-duquesa austríaca Maria Leopoldina Josefa Carolina de Habsburgo (primeira Imperatriz do Brasil) contribuiu decisivamente para o desenvolvimento científico nacional.

O médico e botânico Carl Friederich Von Martius e o zoólogo Johann Baptist Spix, membros da comitiva real, iniciaram uma expedição científica de quatro anos que resultou no primeiro estudo sistemático da flora e da fauna brasileira (Bolzano, 2002). Martius ainda teve influência direta na concepção da fitoquímica no Brasil. Martius sugeriu a um jovem farmacêutico alemão, Theodoro Peckolt, que viesse ao Brasil para estudar a flora. Atracando no porto brasileiro em 1847, T. Peckolt se tornou o pai da fitoquímica brasileira e constituiu uma família de cientistas notáveis dedicados profundamente ao estudo químico de plantas brasileiras. O início dos estudos de Química de Produtos Naturais numa instituição pública brasileira foi em 1874, considerado o ano do nascimento da fitoquímica no país (Santos, 1998; Santos, 2005).

Em mais de 130 anos de história da química de produtos naturais no país, os estudos com plantas medicinais ainda não receberam das agências financiadoras a atenção que o tema merece (Bolzano, 2002). O mercado mundial para venda de produtos derivados de plantas movimentou, em 1997, U\$ 22,6 bilhões. Cerca da metade destas vendas vem de substâncias puras e a outra metade de fitoterápicos. Estima-se que este mercado caminha numa taxa de crescimento médio anual de 6,3%, alcançando mais de 30,0 bilhões de dólares em 2004. Terpenos, incluindo taxóides e esteróides, estão em torno de U\$ 15,0 bilhões em vendas mundiais (David, 2004). Mesmo com esse mercado em plena expansão, as plantas medicinais endêmicas no Brasil ainda são pouco conhecidas, constituindo-se num vasto e rentável campo

de pesquisa e desenvolvimento para cientistas estrangeiros que dão mais importância para tais estudos (Bolzani, 2002).

Neste contexto, o estudo químico de plantas vem se tornando cada vez mais essencial em diversas áreas de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. O estudo fitoquímico, dentre outras funções, possibilita a validação de plantas medicinais consagradas pela medicina popular e contribui para a determinação de alvos biológicos de importância farmacológica. Estudos fitoquímicos contribuem para o esclarecimento de rotas biossintéticas de diversos constituintes, com a finalidade de aperfeiçoar a produção de metabólitos secundários de interesse industrial e aprimorar as técnicas de controle de qualidade de fitoterápicos. Também fornecem novos compostos com atividade biológica ou protótipos para novos fármacos (Yunes, 2001; Bolzani, 2002).

Constata-se que, o estudo químico de plantas, tanto os clássicos quanto os aplicados, têm seu espaço dentro do universo da gênese de novas tecnologias na área medicinal, seja de base ou de ponta, não deixa de ser uma etapa de menor importância. Portanto, com a necessidade do estudo fitoquímico exigido pela legislação brasileira no âmbito dos fitoterápicos e fitofármacos, essa área de pesquisa tornou-se mais valorizada e vista como uma geradora de conhecimento aplicável e indispensável para diversos setores da indústria e ramos da ciência (Yunes, 2001; Brasil, 2004).

A família *Celastraceae* e o gênero *Maytenus*

Evolução das celastráceas

O período Cretáceo foi marcado pelo domínio de um novo grupo de plantas dotadas de uma estrutura inovadora, a flor, e de outras características que permitiram superar as diversas modificações de um planeta em desenvolvimento (Gingerich, 1990; Magallón, 2001; Van de Peer, 2005). Havia uma riqueza de espécies habitando os mais diversos ambientes e muitas das famílias atuais mostram similaridades com gêneros existentes no Cretáceo, tais com, as famílias *Clethraceae*, *Hamamelidaceae* e *Celastraceae* que apresentam características do gênero extinto *Discoclethra* (Knobloch, 1991). Entretanto, o final deste período foi marcado por um acontecimento cataclísmico, ocorrido há 65 milhões de anos, que devastou mais de 70% de todas as espécies que habitavam o planeta (McLoughlin, 2006). Os sobreviventes imediatos à catástrofe ainda tiveram que se adaptar a um ambiente extremamente hostil e a outras alterações que ocorreriam na Terra nos períodos subsequentes (Gingerich, 1990).

A era Cenozóica, então, iniciou-se com um mundo devastado e o primeiro período desta era, o Paleoceno, foi marcado pelo isolamento de continentes, formação e estruturação dos mares e oceanos e por uma mudança química da atmosfera que determinaram uma profunda alteração do gradiente de temperatura do equador aos pólos (Gingerich, 1990). Num contexto de grandes mudanças, é concebido um novo espécime com flor designada hoje de *Wuyunanthus hexapetalus*, dando início à história de adaptação e evolução de uma das mais de 450 famílias de angiospermas descritas atualmente: a família *Celastraceae*. Os fósseis desta nova espécie, elo entre as atuais e as “pré-celastráceas”, foram encontrados em solo datado de 60 milhões de anos, no condado de Jianyin, província de Heilongjiang, a noroeste da China (Li, 2001). Pode-se sugerir, portanto, com essa descoberta que as celastráceas surgiram definitivamente na fronteira entre o período Cretáceo superior e o Paleoceno, fase sombria para vida na Terra (McLoughlin, 2006). Certamente isso implicou na sobrevivência das espécies com maior capacidade adaptativa, indivíduos que tinham melhores condições de alterarem rapidamente seus genes, metabolismo e anatomia, ou seja, melhor plasticidade fenotípica e genotípica, mostrando que esse grupo de plantas desenvolveu uma grande capacidade adaptativa.

Os gêneros atuais das Celastráceas provavelmente apareceram alguns milhões de anos depois, no período Eoceno, onde há indícios da existência de espécies similares às conhecidas hoje. Neste período foram encontrados fósseis de várias espécies em diversas partes do mundo, tais como, *Goupioxylon stutzeri* (Colômbia) e *Celastrinoxylon ramunculiformis* (Grã-Bretanha), que apresentaram características similares aos modernos gêneros *Goupia*, *Maytenus* e *Catha*. Portanto, o atual grupo das Celastráceas e, conseqüentemente, gêneros recentes, como *Maytenus*, iniciaram sua gênese há mais ou menos 40 milhões de anos, se adaptando e espalhando por vários ecossistemas tropicais existentes no globo terrestre (Poole, 1999).

Características botânicas da família *Celastraceae*

A atual família celastrácea, constituída por mais de 90 gêneros e 1300 espécies, é um grupo muito diversificado constituído por trepadeiras lenhosas, arbustos e árvores, encontradas em todas as regiões tropicais e temperadas do planeta (Figura 4, pág. 19), com exceção das regiões desérticas do Oriente Médio e do continente Africano e as áreas gélidas da Sibéria (Simmons, 2001a; Simmons, 2001b; Stevens, 2001).

Os membros da família *Celastraceae* apresentam folhas simples, alternas ou opostas; coriácea ou membranosa; pecioladas; com lâmina inteira; estipuladas inconspícuas ou sem estípulas, e sem meristema basal persistente. Em geral os membros deste grupo de plantas apresentam folhas resinosas com epiderme mucilagínosa, lâmina com cavidades secretoras; mesófilos com idioblasto esclerenquimatoso e ductos menores sem floema. Geralmente o caule apresenta cavidades secretoras, com córtex contendo células cristárgicas e nódulos unicelulares.



Figura 4: Distribuição geográfica da família *Celastraceae* (Stevens, 2006).

Algumas espécies não apresentam floema interno; xilemas com ou sem traqueídeos, fibras traqueídicas e fibras libriformes. Os vasos das paredes terminais em geral são simples ou escalariformes, apresentando madeira contendo parênquima apotraqueal ou paratraqueal. As flores são dispostas em cimeiras ou fascículos, geralmente pequenas e regulares, em geral pentâmeras e radialmente simétricas. O disco hipogínoso é normalmente encontrado em posição intraestaminal e anular. A placentação é axilar e apresenta perianto com cálice e corola distintos. O ovário é desde súbero a parcialmente ínfero (mais ou menos mergulhado no receptáculo), com 2 a 5 carpelos e outros tantos lóculos, cada lóculo com um só óvulo. Os frutos são carnudos, capsulares, capsulares indeiscentes, bagas, aquenóides ou sâmaras e as sementes são comumente endospermicas. Quando presente nos frutos, o endosperma contém quantidade considerável de óleos fixos e em geral as sementes são aladas ou foliáceas e contém um embrião bem diferenciado, clorofiloso e estreito e apresentam dois cotilédones; largos, foliáceos, com germinação fanerocotilar ou criptocotilar (Cronquist, 1988; Joly, 1998).

Características gerais de *Maytenus salicifolia* Reissek

Maytenus sp. Molina é um dos maiores gêneros da família *Celastraceae*, compreendendo 200 espécies de distribuição tropical. É comumente encontrada no continente sul-americano, sendo que o maior número de espécies está localizado no Brasil (Carvalho-Okano, 2005).

A cultura popular utiliza-se de algumas espécies deste grupo de plantas com finalidades terapêuticas. Uma destas espécies é a *Maytenus salicifolia*, conhecida popularmente como “cafezinho” (Figura 5, pág. 21), cujas folhas são utilizadas, sob a forma de decocto, para alívio de pruridos e alergias (Grandi, 1989).

É uma espécie arbórea, polimórfica, encontrada em diversos *habitats* no estado de Minas Gerais e pode alcançar cerca de 20 metros de altura. Caracterizam-se por ramos novos achatados, folhas membranáceas com ápice acuminado, margem dentado-serrada, nervuras primárias salientes em ambas as superfícies e suas inflorescências plurirramosas, multifloras (Carvalho-Okano, 1992). Apresenta uma grande plasticidade fenotípica em relação à anatomia foliar, modificando a estrutura e composição celular da folha em resposta ao ambiente onde os indivíduos estão inseridos. A espessura foliar, número de células epidérmicas (células/mm²), espessura da lâmina foliar, espessura da cutícula, células do mesófilo, número de esclereides na nervura central e a presença de cristais estilóides são variáveis nesta espécie, e, portanto, dependente do *habitat* onde são encontradas (Valladão, 2005).

A via metabólica priorizada por esta espécie, e vários outros membros da família *celastraceae*, é a via dos terpenos. A composição química caracteriza-se, principalmente, pela presença do esteróide 3 β -sitosterol e de triterpenos pentacíclicos, tais como, friedelina, β -friedelinol, α -amirina, β -amirina e lupeol (Figura 6, pág. 21). Foram relatados, ainda, compostos como o dulcitol, hidrocarbonetos de cadeia longa e ésteres graxos da população coletada em Ouro Branco, MG (Valladão, 2005; Miranda, 2006; Miranda, 2007).

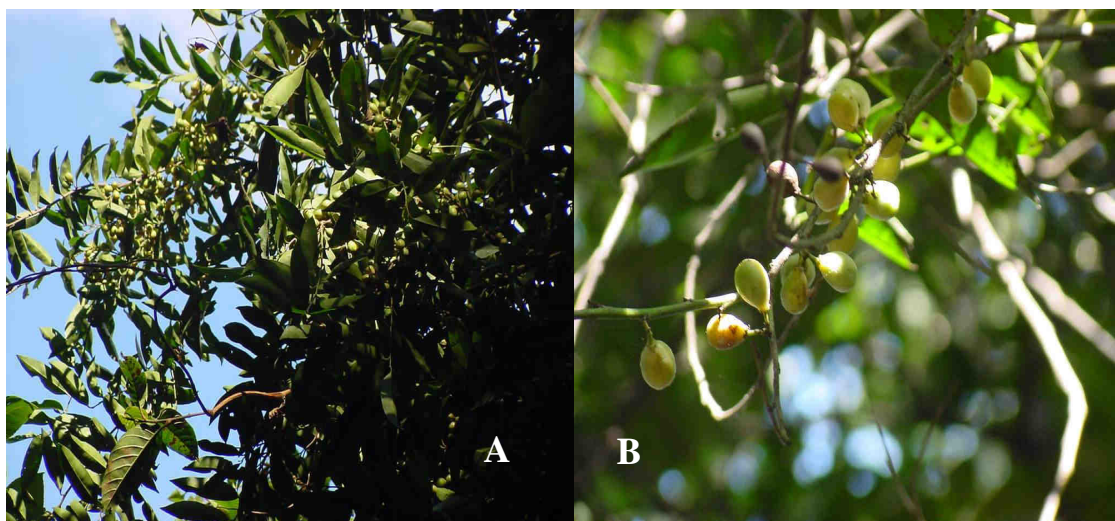


Figura 5: Foto da lateral da copa (A) e da infrutescência (B) de um exemplar de porte arbóreo da espécie *M. salicifolia* localizada na Estação Ecológica da UFMG (Miranda, 2007).

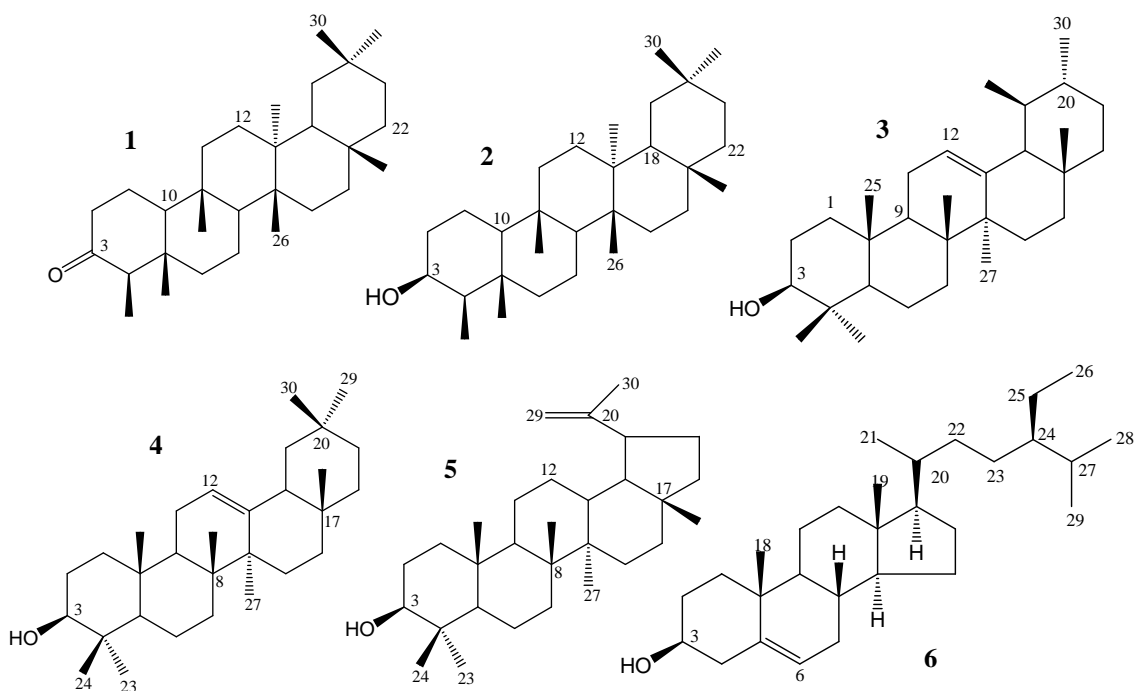


Figura 6: Compostos isolados de *M. salicifolia* (*Celastraceae*). Friedelina (1), β -friedelinol (2), α -amirina (3), β -amirina (4), lupeol (5) e β -sitosterol (6) (Valladão, 2005; Miranda, 2006).

1. OBJETIVOS

A diversidade de características distintas entre as espécies de uma mesma família de plantas pode gerar grandes dificuldades na tentativa de organizá-la nos níveis de gênero e espécie. A atividade de classificar um determinado organismo vegetal é uma tarefa árdua e dependente de um estudo interdisciplinar que pode envolver diversas áreas da ciência, tais como, a botânica, a genética e química. Portanto, mesmo a taxonomia atual baseada na análise morfológica pode se apoiar em um ou mais dados relativos à ausência ou presença de determinadas substâncias química para definir corretamente a classificação de uma determinada espécie. Assim, a utilização de dados quimiotaxonômicos, apesar de modesta, tem proporcionado importantes subsídios à taxonomia clássica corroborando para uma correta classificação das centenas de espécies vegetais que compõem o grupo das angiospermas.

As espécies objetos de estudo deste trabalho, *Maytenus salicifolia* e *Maytenus gonoclada*, apresentam características morfo-anatômicas com tamanha similaridade que se levantou a hipótese de que tratava de uma única espécie. A possibilidade de unificar ou separar as duas espécies e, posteriormente identificar de forma correta, especificamente, uma população coletada em Ouro Branco (MG), na qual, estudos fitoquímicos estão sendo realizados, despertou o interesse no estudo quimiotaxonômico destas espécies. Assim, com o presente trabalho pretende-se:

1) propor um protocolo de análise quimiotaxonômico, utilizando-se de técnicas histoquímicas e cromatográficas, com a finalidade de aprimorar a identificação e caracterização das populações *M. salicifolia*, coletadas em Ouro Branco e Belo Horizonte, e a população de *M. gonoclada*, coletada em Caeté;

2) utilizar-se de métodos químicos de análise com o intuito de auxiliar os métodos clássicos de classificação botânica na identificação inequívoca das populações trabalhadas;

3) dar continuidade ao estudo fitoquímico de casca/polpa de frutos e, também, desenvolver o estudo fitoquímico do extrato hexânico de folhas de *M. salicifolia* coletada na Estação Ecológica da UFMG, em Minas Gerais.

2. ÁREAS DE ESTUDO

2.1 Localização

As áreas de coleta localizam-se nos municípios de Ouro Branco, Caeté e Belo Horizonte, Minas Gerais, entre as coordenadas 19° 50' - 22° 30' latitude sul e 43° 40' - 44° 00' longitude oeste (Google Earth, 2009).

2.2 Características gerais

O estado de Minas Gerais exibe uma extraordinária riqueza biológica e geomorfológica, ocupando posição privilegiada no território brasileiro quanto à diversidade ambiental. Localizado em uma área de complexas paisagens em transição que resultam em regiões de alta biodiversidade com a ocorrência de espécies endêmicas e de distribuição restrita (Filho, 2002; Drummond, 2005; Meira-Neto, 2007).

Em Minas ocorrem quatro grandes domínios morfoestruturais: as escarpas e maciços do complexo cristalino onde se encontram a Serra da Mantiqueira e planalto sul de Minas; os relevos da bacia sedimentar da depressão do São Francisco e os Chapadões da Vertente Ocidental do São Francisco; os relevos da bacia do Paraná, com coberturas Mesozóicas e sedimentos Paleozóicos do triângulo mineiro e as altas superfícies modeladas em rochas do Proterozóico (pré-cambriano médio e superior), como a Serra do Espinhaço, Serra Geral e Quadrilátero Ferrífero (Filho, 2002; Drummond, 2005).

Estas diferentes formas de relevo, somadas às características do solo e aos aspectos dinâmicos da atmosfera, tais como, a Zona de Convergência do Atlântico Sul (ZCAS), as Frentes Frias, principais responsáveis pela precipitação pluvial, o Anticiclone Subtropical do Atlântico Sul e o Vórtice Ciclônico de Ar Superior podem ocasionar grandes períodos de estiagens. Esses processos meteorológicos propiciam paisagens muito variadas, recobertas por vegetações singulares, adaptadas aos inúmeros *habitats* existentes inseridos em dois grandes biomas brasileiros: as savanas (cerrados e campos) e as florestas estacionais semidecíduais, conhecidas como mata atlântica (Drummond, 2005; Minuzzi, 2007).

O domínio do cerrado, localizado na porção centro-ocidental, ocupava cerca de 60% da extensão territorial do Estado, o domínio da Mata Atlântica, localizado na porção oriental, perfazia mais de 40% da área de Minas Gerais. De modo geral, a paisagem transita para o cerrado ao sul e a oeste, para a região dos campos rupestres ao centro e para a floresta

atlântica a leste, exibindo regiões de difícil caracterização, ou como manchas inclusas em outras formas de vegetação (Drummond, 2005). No entanto, em consequência do desmatamento a cobertura nativa foi drasticamente reduzida a remanescentes esparsos que não deve ultrapassar 2% do território mineiro, e em decorrência disto todos os três locais de coleta mencionados neste trabalho sofreram algum tipo de ação antrópica (Motta, 1996; Mantovani, 1998; Sano, 2001; Godoy, 2003; Machado, 2004; Meyer, 2004).

Segundo a classificação de Köppen, os dois principais climas do estado de Minas Gerais são do tipo “As” (equatorial com verão seco, regiões norte e nordeste) e o “Cwa” (temperado com inverno seco e verão quente, regiões sul, sudeste, leste e central), sendo este último, o clima característico da região metropolitana de Belo Horizonte, Ouro Branco e Caeté (Rubel, 2006; Minuzzi, 2007). Dentro dessa região, os três locais escolhidos para efetuar o estudo foram a Estação Ecológica da UFMG, a Serra de Ouro Branco e a Serra da Piedade.

2.3 Estação Ecológica da UFMG

O trecho de mata estudado, localizado nas coordenadas geográficas 19° 52' 30" S e 43° 58' 24" W, pertence a uma unidade de conservação urbana de cento e quatorze hectares da Universidade Federal de Minas Gerais. Região outrora coberta pela floresta estacional semidecidual submontana (Figura 7, pág. 26), nas proximidades de uma região de tensão ecológica. O clima é subquente semi-úmido (Figura 8, pág. 27) com temperatura média anual de 21,1°C e índice pluviométrico anual médio de 1491,3 mm, sendo junho, julho e agosto os meses mais secos e novembro, dezembro e janeiro os mais chuvosos. O relevo é ligeiramente ondulado com altitude em torno de 850 m (Meyer, 2004; ALMG, 2009; Google Earth, 2009). Segundo dados do IBGE (2005), o solo da região enquadra-se na classe PVA – Argilossolo Vermelho Amarelo (Figura 9, pág. 27) que são solos minerais, não-hidromórficos, com horizonte A ou E (horizonte de perda de argila, ferro ou matéria orgânica, de coloração clara) seguido de horizonte B textural, com nítida diferença entre os horizontes. (Santos, 2003; Sousa, 2007; Marques, 2009).

2.4 Complexo do Espinhaço

O Espinhaço possui aproximadamente 1.100 km de extensão na direção norte-sul e varia de 50 a 100 km na direção leste-oste, com altitudes médias entre 800 e 1.200 m e

máximas entre 1800 – 2000 m. Em Minas Gerais, é dividida em seis grandes áreas: Serra do Caraça, Serra do Cipó, Serra do Cabral e Serra de Grão-Mogol, e na Bahia, Serra do Rio de Contas, Serra do Sincorá, Serra do Tombador e de Jacobina, Serra do Ouro Branco e Serra da Piedade (Melo, 2000; Araujo, 2005; Ruchkys, 2007).

Nestas porções do relevo mineiro encontramos diversos tipos fitofisionômicos diferentes, permutando ora para os domínios da Mata Atlântica e ora para o Cerrado, exibindo graduais zonas de transição. A vegetação típica predominante são os campos rupestres, no entanto, outros tipos de vegetação são encontrados, tais como as matas de neblina (estrato mais alto), cerrados e campos (estrato intermediário) e as matas de galeria e florestas de brejo (estrato inferior). As vegetações mais densas, em geral, não são contínuas, e apresentam-se como ilhas, manchas ou bosques rodeados por campos rupestres ou em longas cadeias florestais margeando os riachos (Melo, 2000; Araujo, 2005).

A flora destas terras altas, apesar de exuberante, se desenvolvem em solos rasos, arenosos ou pedregosos, ou mesmo fixando-se por entre as fendas nas rochas. Solos pobres em nutrientes, com alta acidez e baixa capacidade de retenção de água, formado principalmente por rochas do tipo itabirito, quartzo, gnaiss e canga laterítica (Araujo, 2005; Ruchkys, 2007).

2.4.1 Serra de Ouro Branco

No limite sul do Complexo do Espinhaço, no platô da Serra de Ouro Branco (20° 29' 20" S e 43° 41' 59" W) em uma altitude de 1400 m, localiza-se a faixa de floresta semidecidual montana a beira de um curso d'água (mata ciliar) e circundada por campos rupestres, objeto de estudos neste trabalho.

É uma região de domínio da floresta estacional semidecidual (Figura 7, pág. 26), mas observa-se também a ocorrência de ecótonos como consequência das características geomorfológicas e edáficas peculiares à região. O clima é classificado como tropical mesotérmico semi-úmido (Figura 8, pág. 27) com temperatura média anual de 19,4 °C e índice pluviométrico anual médio de 1474,9 mm. (IBGE, 2002; Melo, 2000; ALMG, 2009; Google Earth, 2009).

O solo raso e arenoso, de acordo com o IBGE (2005), é classificado como cambisso háplico (Figura 9, pág. 27) que apresenta como característica a pouca profundidade, altos teores de silte e baixa permeabilidade (Santos, 2003; Moreira, 2007; Sousa, 2007; Marques, 2009).

2.4.2 Serra da Piedade

Localizada pouco mais ao norte ($19^{\circ} 49' 00''$ S e $43^{\circ} 40' 30''$ W), a Serra da Piedade é uma área com cerca de 2000 hectares considerada monumento natural, arqueológico, etnográfico e paisagístico de Minas Gerais, tombamento concedido pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico (IEPHA-MG) em 2005 (Ruchkys, 2007; Google Earth, 2009).

A Serra da Piedade está inserida em uma região de tensão ecológica (Figura 7) que exhibe paisagens dotadas de riqueza florística extraordinária com um elevado grau de endemismos. As coletas foram realizadas em um ecótono (mata e campo rupestre) a uma altitude de 1425m. O clima é classificado como tropical mesotérmico semi-úmido (Figura 8, pág. 27) com temperatura média anual de $21,1^{\circ}\text{C}$ e índice pluviométrico anual médio de 1491,3 mm (IBGE, 2002; Melo, 2000; ALMG, 2009; Google Earth, 2009).

O solo, *lato sensu*, é do tipo PVA – Argilossolo Vermelho Amarelo (Figura 9, pág. 27) que são solos minerais, não-hidromórficos similar ao encontrado na Estação Ecológica – UFMG (IBGE, 2005; Moreira, 2007; Sousa, 2007; Marques, 2009), entretanto, nos locais de coleta, o solo é raso e pedregoso constituído principalmente por canga laterítica, material resultante do intemperismo do mineral itabirito agregados a hidróxidos de ferro (Santos, 2003; Ruchkys, 2007).

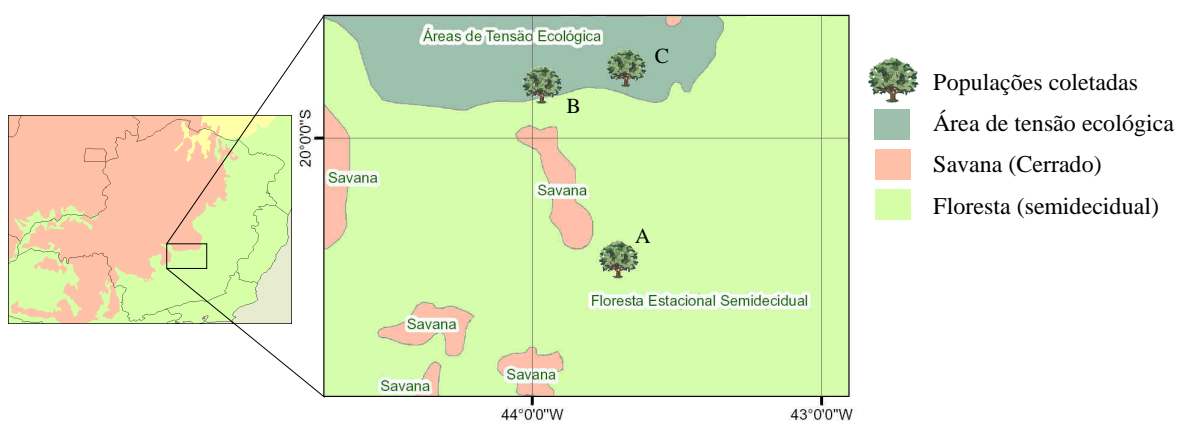


Figura 7: Mapa da região de coleta evidenciando os biomas (cerrado e mata) e as áreas de transição (regiões de tensão ecológica). As letras A, B e C referem-se às populações de Ouro Branco, Belo Horizonte e Caeté, respectivamente.

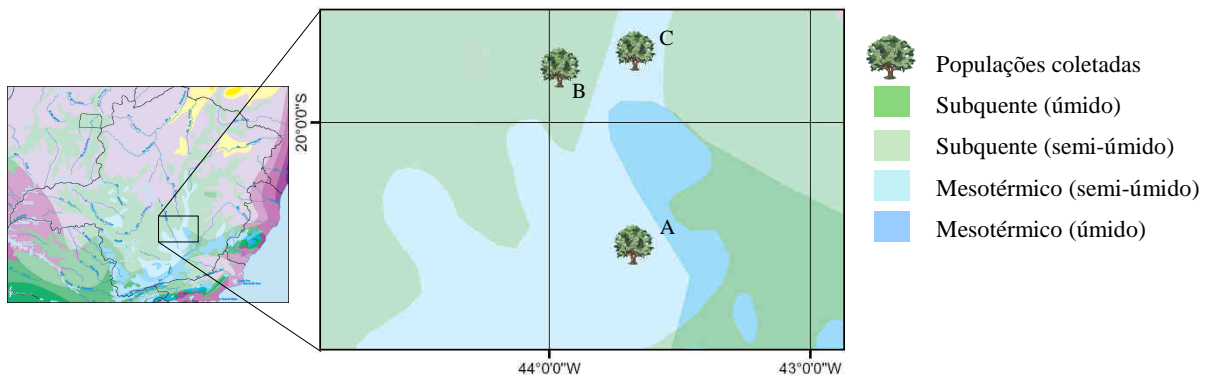


Figura 8: Mapa da região de coleta mostrando os tipos climáticos regionais. As letras em A, B e C referem-se às populações de Ouro Branco, Belo Horizonte e Caeté, respectivamente.

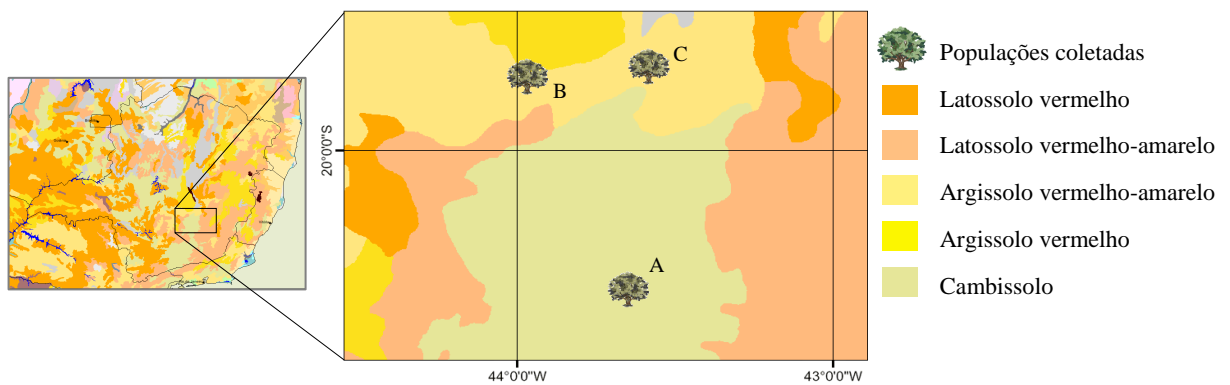


Figura 9: Mapa apresentando as variações do solo mineiro na região de coleta. As letras A, B e C referem-se às populações de Ouro Branco, Belo Horizonte e Caeté, respectivamente.

3. MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS

3.1 Material vegetal

3.1.1 *Maytenus salicifolia* (Celastraceae)

As coletas dos frutos e folhas de *Maytenus salicifolia* para o estudo fitoquímico foram realizadas na Estação Ecológica da UFMG, Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, em maio de 2004 e 2005, respectivamente. Os espécimes coletados foram identificados pela Prof^a. Dra. Rita Maria Carvalho-Okano, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com a colaboração da Prof^a. Maria Cristina Teixeira, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Uma exsicata do material se encontra depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFMG sob o código BHC B 22856.

Para realização dos estudos quimiotaxonômicos (análise de rutina e de triterpenos), optou-se por coletar preferencialmente folhas plenamente desenvolvidas de seis indivíduos diferentes de cada população. A coleta foi realizada em dois locais, Serra de Ouro Branco e na Estação Ecológica da UFMG, todas no início do mês de outubro de 2008. A localização exata, características edáficas e morfoclimáticas estão descritas em detalhes no item 2 deste trabalho, intitulado “Áreas de estudo”. O material coletado em cada uma das localidades receberam uma codificação com o intuito de designar o local de coleta de cada uma das populações, a sigla OB identifica o grupo coletado em Ouro Branco e BH, o grupo coletado no município de Belo Horizonte.

3.1.2 *Maytenus gonoclada* (Celastraceae)

Folhas de *M. gonoclada* foram coletadas na Serra da Piedade, município de Caeté (MG), no início do mês de outubro de 2008. O material foi identificado pela professora da UFV, Dra. Rita Maria Carvalho-Okano e comparado com exsicatas depositadas no herbário do Departamento de Botânica da UFMG com número de registro BHC B 22635 (Mendonça, 1997). Designou-se o código CA para a identificação desta população.

3.2. Padrões, reagentes colorimétricos e testes preliminares

3.2.1 Padrões

Os compostos utilizados como padrões, tais como os triterpenos friedelina, friedelinol, lupeol, α -amirina, β -amirina, o esteróide β -sitosterol, mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa e o flavonóide rutina, foram isolados, purificados e elucidados com o auxílio de técnicas analíticas, tais como IV, CG/DIC, CG/EM e RMN, em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do NEPLAM (Valladão, 2005; Miranda, 2006; Oliveira, 2007).

3.2.2 Vanilina perclórica

Consiste de uma solução (1:1) de vanilina a 1% p/V em etanol e uma solução aquosa de ácido perclórico a 3%. A solução é comumente utilizada em cromatografia em camada delgada como revelador geral e não específico, mas revela preferencialmente compostos apolares (hidrocarbonetos, esteróides e terpenóides). Cada cromatoplaça, após ser borrifada com a vanilina perclórica, deve ser aquecida em estufa a 100 °C por 5 a 10 minutos (Ugaz, 1988, Waksmundzka-Hajnos, 2008).

3.2.3 Dragendorff

Reagente para detecção de alcalóides, é constituído de uma solução de nitrato de bismuto (0,85 g) dissolvido em 40 mL de água e 10 mL de ácido acético glacial seguido pela adição de 50 mL de uma solução aquosa de iodeto de potássio com concentração de 0,40 g/mL (Ugaz, 1988, Waksmundzka-Hajnos, 2008).

3.2.4 Liebermann-Burchard (LB)

Este reagente é preparado com anidrido acético concentrado (A) e ácido sulfúrico concentrado (B). Este teste, utilizado para indicar a presença de triterpeno pentacíclico ou esteróide, consiste na dissolução da amostra em 1mL de clorofórmio, 0,2 mL de A e uma 1

gota de B. No teste positivo para triterpenos pentacíclicos (LB positivo), observa-se o desenvolvimento de coloração violeta passando ao azul permanecendo, assim, por algum tempo. Para esteróides a cor formada é azul, que converte-se rapidamente para o verde (Ugaz, 1988, Waksmundzka-Hajnos, 2008).

3.2.5 Lugol

Utilizado para detecção de amido, consiste na dissolução de 10 g de iodeto de potássio e 5 g de iodo em 20 mL de água destilada. Com agitação mecânica, transfere-se a solução para balão volumétrico de 100 mL e completa-se o volume com água destilada (Kraus, 1997).

3.2.6 Cloreto férrico

Reagente usado na detecção de compostos fenólicos, consiste em uma solução de cloreto férrico a 5% p/V em solução aquosa (Kraus, 1997).

3.2.7 Floroglucinol

Utilizada na identificação de lignina, consiste na dissolução de 1 g de floroglucinol em 100 mL de etanol PA (Kraus, 1997).

3.2.8 Vermelho de sudan B (III)

Este reagente é preparado dissolvendo-se 0,5 g de Sudam III em 100 mL de etanol 80% em aquecimento a 60 °C, após a o arrefecimento, a mistura é filtrada. É utilizado para a determinação da presença de lipídios (Kraus, 1997).

3.3. Materiais e equipamentos

3.3.1 Misturadores e agitadores

Para a homogeneização das amostras, foram utilizados o “Sharker Bath - Orbit” da “Lab-Line” dotado de banho com aquecimento, e o misturador “Minishaker” modelo IKA-MS2, pertencentes ao Laboratório de Química Bromatológica e Cromatografia (QBC) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e agitador magnéticos com aquecimento modelo IKA RH-KT/C da Divisão de Laboratório, Seção de Física e Química Legal do Instituto de Criminalística do Estado de Minas Gerais.

3.3.2 Balanças

As pesagens foram realizadas utilizando a balança semi-analítica ($d = 0,01$ g e $0,001$ g, respectivamente) modelo TE612 da “Sartorius” (NEPLAM-UFMG) e a balança “Marte” modelo AL 500C (QBC-FUNED). As medições de pequenas massas foram realizadas em balanças analíticas ($d = 0,0001$ g) da “Bel Engineering” “UMark” 210A (NEPLAM-UFMG) e “Mettler-Toledo” AB104 (QBC-FUNED).

3.3.3 Evaporadores rotativos

Os solventes utilizados foram recuperados em evaporadores rotativos “Jouan” RC10.10 (QBC-FUNED), rotavapor “Laboreta 4000” (Heidolph), “Tecnal” TE-120 e TE-210 (NEPLAM-UFMG).

3.3.4 Estufas

A desidratação do material vegetal, a ativação e revelação das cromatoplacas foram realizadas em estufas disponíveis NEPLAM-UFMG, todas modelo “Retilínea”, marca “Fanen Ltda”.

3.3.5 Instrumentos para medição de volume

Todas as medições foram realizadas com vidrarias verificadas (*Pirex*®) e pipetas automáticas calibradas marca “Brand” (100 µL, 1000 µL e 10 mL) .

3.3.6 Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho “FP80HT” e “FISHER” do Departamento de Química da UFMG.

3.3.7 Instrumentação para análise histoquímica

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo manual de deslizamento tipo “Ranvier” e as fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus equipado com sistema fotográfico AD e câmera fotográfica digital marca “Canon”, modelo “Power Shot” A630.

3.3.8 Cromatografia em camada delgada

Foram utilizadas placas de sílica gel 60G de 0,25 (analítica) e 0,50 mm (preparativa) de espessura, em suporte de vidro, ativadas a 100 °C e, quando necessário, com adição de 2% p/p de nitrato de prata. Os reveladores utilizados foram uma câmara dotada de lâmpada de emissão de luz ultravioleta (compostos fenólicos), vanilina perclórica (terpenos, esteróides e graxas) e Dragendorff (alcalóides).

3.3.9 Cromatografia em coluna

Utilizou-se sílica gel 60 (70-230 Mesh) e *Florisil*® em proporção variando de 1:30 a 1:100 de amostra para a fase estacionária. Os solventes utilizados na cromatografia em coluna foram todos grau P.A, destilados e redestilados, quando necessário. Frações e sub-frações obtidas no processo cromatográfico foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, de acordo com a necessidade.

3.3.10 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso equipado com espectrômetro de massas (CG/EM) dotado de ionizador por impacto de elétrons (70 keV) de marca *Shimadzu*, modelo GC-17A/GCMS-QP5050A, utilizando-se coluna da “Agilent Technologies” DB-1 de dimensões 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme de 100% de dimetilpolisiloxano. Todos os cromatogramas foram obtidos no modo de análises de íons totais (TIC).

3.3.11 Cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria no ultravioleta

A análise por cromatografia líquida (de alta eficiência) com detector na faixa do ultravioleta (CLAE/UV) foi realizada em equipamento *Shimadzu*, modelo LC-10AD, classe VP, acoplado a detector de foto-diodo SPD-10AV e controladora SCL-10A, utilizando uma coluna *Chromolith Performance* RP-18 (100 x 4,8 mm) da Merck, da Divisão de Laboratório, Seção de Física e Química Legal do Instituto de Criminalística/MG.

3.3.12 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um dos espectrômetros a seguir: modelo Spectrum 2000, FT-IR da *Perkin Elmer* pertencente a Faculdade de Farmácia da UFMG e *Shimadzu* IR435 da Divisão de Laboratório, Seção de Física e Química Legal do Instituto de Criminalística do Estado de Minas Gerais.

3.3.13 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em equipamento *Bruker Advance* DRX 400 e DPX 200 com transformada de Fourier, do Departamento de Química da UFMG. Foi utilizado como padrão o TMS (^1H , 400,12 e 200,13 MHz, ^{13}C , 100 e 50,288 MHz, $\delta=0$, interno). Os espectros de hidrogênio e de carbono foram obtidos utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (MeOD) e gotas de piridina, quando necessário.

4. ESTUDO QUIMIOTAXONÔMICO DE *MAYTENUS* SP.

A confirmação da identidade taxonômica de uma determinada espécie utilizada com finalidade terapêutica, na alimentação ou em trabalhos acadêmicos envolve um procedimento complexo, que exige a análise de diferentes partes da planta através de avaliações morfológicas de partes do vegetal, uso de técnicas de microscopia e análises químicas de extratos obtidos dos órgãos vegetais objeto de exames (Farias, 2001; Brasil, 2004).

A expansão do uso de medicamentos fitoterápicos e o aprimoramento das técnicas de análises cromatográficas estimularam órgãos oficiais de controle de medicamentos fitoterápicos, tais como a BHMA e a ANVISA, a inclusão da análise por perfil cromatográfico (*fingerprint*), tanto com a finalidade de substituir o uso de marcadores, quanto em substituição ao estudo fitoquímico (Brasil, 2004; Dixit, 2008).

Observa-se que a quimiotaxonomia moderna, apoiada nas novas tecnologias analíticas está intimamente relacionada com o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos como conseqüência da necessidade da confirmação inequívoca da autenticidade do material vegetal ou do produto acabado que é, também, quase sempre dependente da análise dos constituintes químicos marcadores de uma determinada espécie, gênero ou família (WHO, 2000; Brasil, 2004; Cheng, 2006).

Com relação a outras áreas da ciência (taxonomia, botânica forense, ecologia, toxicologia ambiental), a química taxonômica contemporânea tem sido discretamente utilizada, apesar de suas aplicações na avaliação de níveis de poluição ambiental e na possibilidade de sistematização de um grande número de plantas simultaneamente (Djingovad, 2004; Valladão, 2005).

Este capítulo apresenta a análise histoquímica de *Maytenus* sp., utilizando técnicas clássicas de coloração, a determinação de rutina por cromatografia líquida de alta eficiência e a análise de perfil (*fingerprint*) obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O material vegetal analisado envolveu folhas de três grupos ou populações de *Maytenus*, sendo duas taxonomicamente identificadas como *M. salicifolia* (BH e OB) e a outra como *M. gonoclada* (CA), com o objetivo de evidenciar similaridades e diferenças químicas entre os grupos pesquisados, bem como propor um protocolo de “avaliação preliminar” do potencial fitoquímico de espécies deste gênero e da família Celastraceae.

4.1 Protocolos de análise

Com exceção da histoquímica que se utiliza de material fresco ou em solução conservante constituída por álcool etílico e água na proporção de 7:3, todo o restante do material vegetal utilizado nos experimentos foram submetidos a processo de secagem à temperatura ambiente, pulverizados em moinho de facas e tamisados em 2 peneiras com aberturas de 0,84 e 0,25 mm, respectivamente. O material vegetal de granulometria intermediária foi coletado e acondicionado em frascos de vidro âmbar.

4.1.1 Análise histoquímica

Foram coletadas três folhas plenamente desenvolvidas de três indivíduos diferentes de cada população. As folhas frescas ou recentemente fixadas, em solução de etanol P.A. e água destilada na proporção de 7:3, foram seccionadas transversalmente em seu terço médio utilizando-se um micrótomo manual de deslizamento tipo *Ranvier*. Os cortes histológicos selecionados com auxílio de um pincel nº 2 foram colocados em vidro de relógio com água destilada e, posteriormente, em contato com os reagentes de caracterização histoquímica em placa de vidro (Kraus, 1997) (Figura 10, pág. 37). A análise dos cortes histológicos e as fotomicrografias (Figuras 13, 14, 15 e 16, pag. 40 a 43) foram realizadas em microscópio *Olympus* equipado com sistema fotográfico AD e câmera fotográfica digital da *Canon*.

De acordo com os protocolos de Kraus e Arduin (1997), os seguimentos obtidos de cortes das folhas foram corados com quatro reagentes, cloreto férrico, floroglucinol, lugol e vermelho de sudan B, com a finalidade de revelar a presença de compostos fenólicos (preto azulado ou verde escuro), lignina (vermelha), amido (azul escuro ou marrom escuro) e lipídeos (vermelho), respectivamente (Figuras 13 a 16, pág. 40 a 43).

4.1.2 Análise de flavonóides

Cerca de 5,00 g de folhas moídas das populações de *Maytenus salicifolia* (Ouro Branco e Belo Horizonte) e *M. gonoclada* foram transferidas para béqueres de 50 mL e extraídas com 50,0 mL de água destilada em ebulição e agitação a 1200 rpm (valor aproximado, controle analógico no nível 4) utilizando misturador magnético com aquecimento “IKA” e barra de agitação por 30 minutos (Mendonça, 1997). O material foi filtrado em funil comum e papel de filtro e a torta desprezada. O filtrado foi mantido

em frascos de vidro âmbar e em geladeira por 24 horas. Em seguida, coletou-se uma alíquota da fase aquosa de 200 µL diluída 5 vezes com uma mistura da solução “B” (700,0 mL de água, 200,0 mL de metanol, 100,0 mL de acetonitrila, 1,5 mL de ácido fórmico e 1,0 mL de trimetilamina) e da solução “A” (acetonitrila pura) na proporção de 1:1 para obtenção de uma solução final de 1000 µL. Cerca de 50 µL da alíquota diluída foi injetada em CLAE/UV com sistema isocrático de 50% da solução “A” e 50% da solução “B” (Figura 11, pág. 38), a detecção foi realizada no comprimento de onda de 262 nm e os resultados foram comparados com os dados da análise de uma amostra padrão de rotina referido no subitem 3.2.1, pág. 29 (Figuras 17 a 22, pág. 44 a 47).

4.1.3 Análise de triterpenos

Três amostras de 1,00 g de pó de folhas das populações de *Maytenus salicifolia* (Ouro Branco e Belo Horizonte) e *M. gonoclada* foram transferidas para tubos “falcon” de 50 mL e extraídas com 5,00 mL de hexano P.A. destilado, em agitador tipo *Sharker Bath* a 300 rpm por 1 hora à temperatura de 40°C. A solução obtida em hexano foi separada da torta por filtração em funil e papel de filtro, e transferida para tubos “falcon” de 50 mL. O hexano foi recuperado em evaporador rotatório (“Jouan” RC10.10) à baixa pressão. O extrato obtido foi ressuscitado em clorofórmio ultra puro e alíquotas de 200 µL de cada extrato foram filtradas em filtros de 0,45µm e transferidas para frascos de vidro transparentes de 2,0 mL (*vials* de 2,0 mL e 12 x 32 mm), em seguida o volume foi completado para 1000 µL e cerca de 1,0 µL das soluções resultantes foram injetados em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM) (Figura 12, pág. 38)

A análise por CG/EM foi realizada com injetor em modo *split*, com razão de divisão da amostra de 10 vezes (RDA=10 ou *split*=10), com uma coluna DB-1 e o hélio como gás carreador. Após vários testes, foi possível ajustar as melhores condições de aquecimento do forno do cromatógrafo que consistiu de uma rampa de aquecimento inicial de 290 °C a 300 °C com taxa de 2,5 °C/min, uma isoterma de 7,0 min e uma rampa final de 300 °C a 310 °C com taxa de aquecimento de 5,0 °C/min e uma isoterma final de 5,0 min para limpeza da coluna. A temperatura do injetor foi definida para a mesma do início da corrida (290 °C), da fonte de íons de 310 °C e fluxo de gás hélio de 1,0 mL/min. A janela de análise (tempo de aquisição) foi estabelecida entre o minuto 4,5 e o minuto 11,0 com tempo total de 15,0 min de corrida (Figuras 23 a 27, pág. 48 a 51).

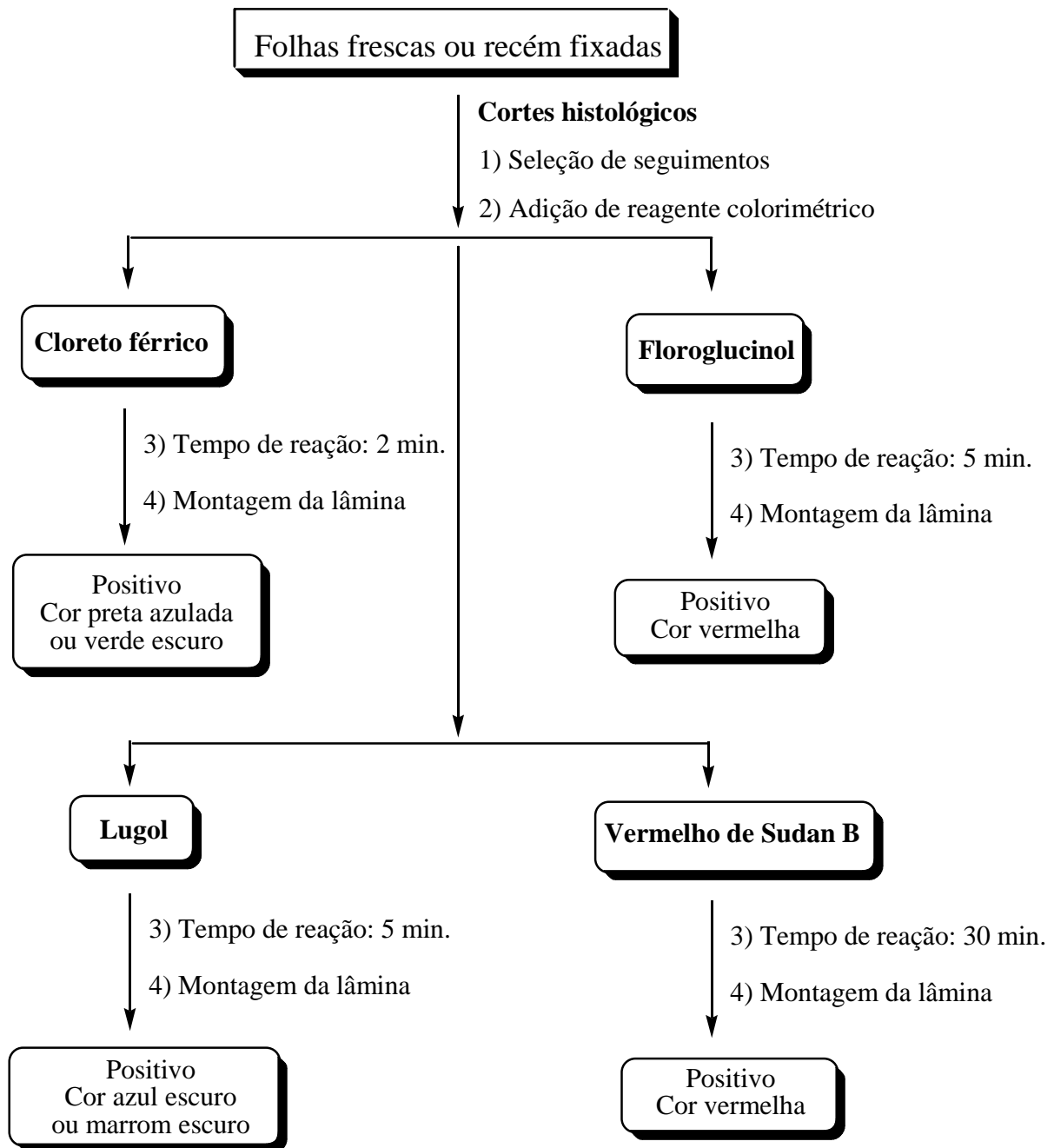


Figura 10: Fluxograma do protocolo de análise histoquímica realizado em seguimentos de cortes de folhas de *M. salicifolia* e *M. gonoclada* (Kraus, 1997).

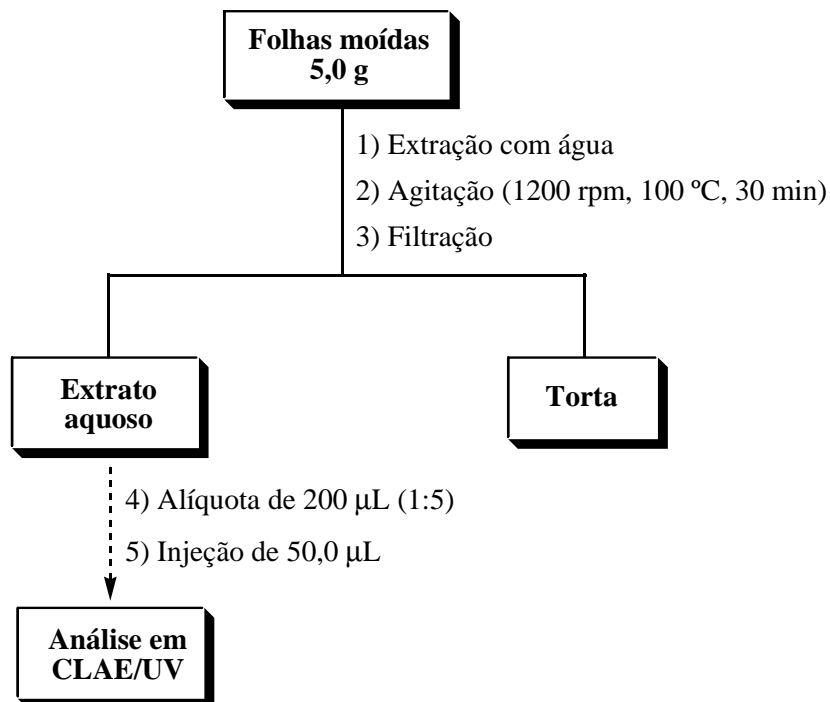


Figura 11: Fluxograma do protocolo de análise de flavonóides em folhas de *M. salicifolia* e *M. gonoclada*.

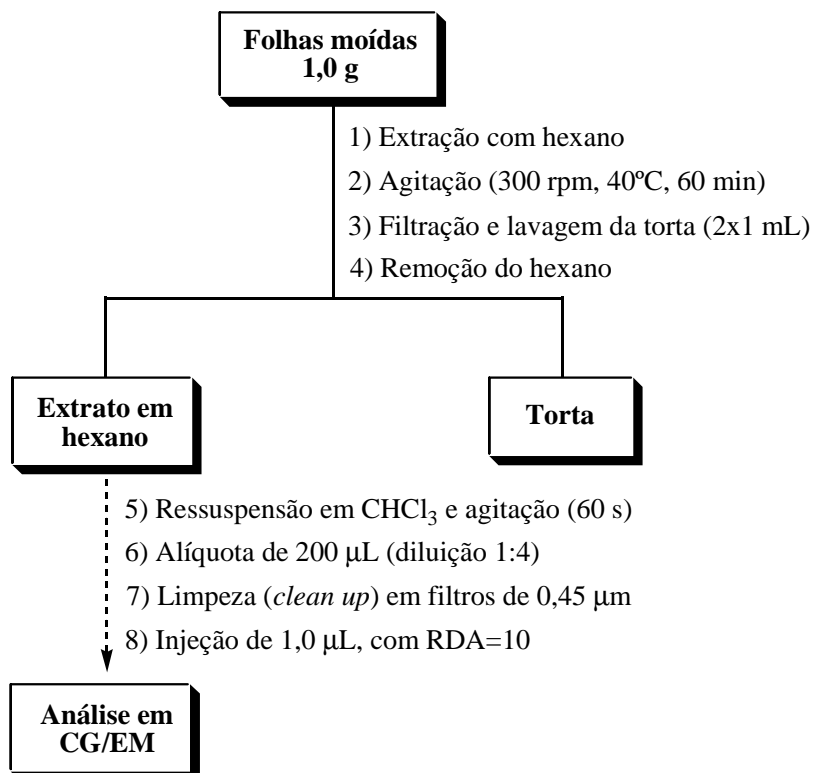


Figura 12: Fluxograma do protocolo de análise de triterpenos em folhas de *M. salicifolia* e *M. gonoclada*.

4.2 Resultado das análises

4.2.1 Análise histoquímica

O estudo histoquímico das folhas das duas populações de *M. salicifolia* Reissek e da população de *M. gonoclada* Martius permitiu visualizar e comparar o conteúdo de substâncias de reserva (lipídios e amido), lignina (substância de sustentação) e de compostos fenólicos (metabólitos secundários).

Os resultados das análises histoquímicas na caracterização de lipídios por sudan B foram positivos, conforme pode ser evidenciado pela presença de uma coloração avermelhada indicada pelas setas na figura a seguir. Observa-se que os lipídios distribuem-se principalmente pela fina cutícula, tanto adaxial quanto abaxial, indicadas pelas setas tracejadas e evidenciadas entre as barras paralelas nas fotomicrografias A, B e C (Figura 13, pág. 40), podem-se visualizar, também, gotículas de gordura no citoplasma das células epiteliais em todos os grupos analisados, algumas foram circulares e são mostradas na figura 13.

A reação com cloreto férrico não revelou a presença de compostos fenólicos que seria visualizado em uma eventual detecção por reação positiva, com uma coloração negra azulada ou verde escuro (Figura 14, pág. 41).

A presença de lignina foi constatada através da reação com o floroglucinol, evidenciada pela presença de coloração avermelhada na nervura principal indicada pelas setas. Pode-se visualizar uma faixa contínua de fibras, em vermelho, acompanhando o floema e o xilema lignificado, também em vermelho, de forma central, com elementos de vasos radialmente dispostos. Um parênquima medular lignificado pode ser observado no centro da nervura principal (Figura 15, pág. 42).

O teste para amido resultou negativo em ambas as populações testadas, constatado pela ausência nas fotomicrografias de uma coloração azul-negra ou uma tonalidade de marrom bem intensa característica dessa substância de reserva exposta ao reagente de lugol (Figura 16, pág. 43).

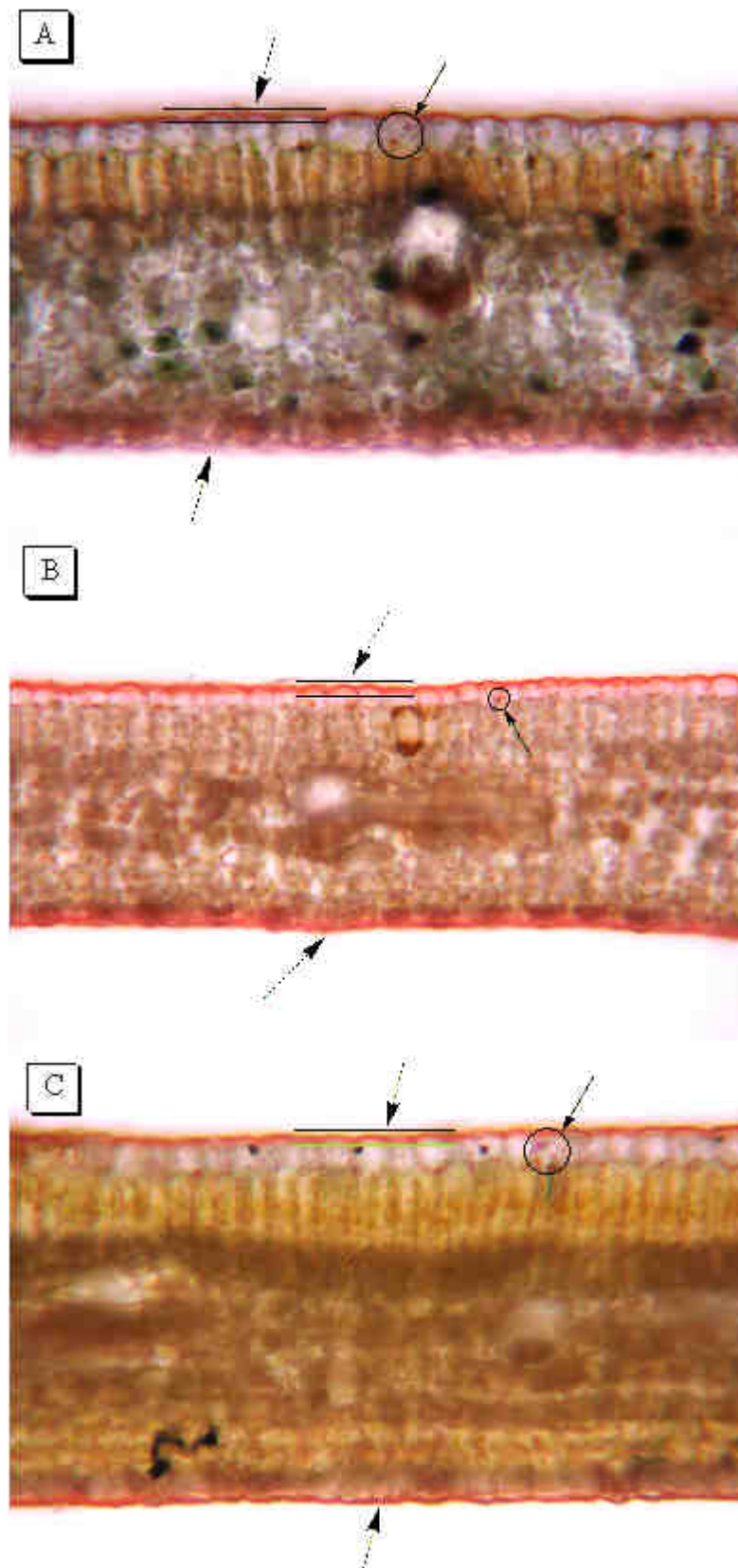


Figura 13: Cortes transversais das lâminas foliares (aumento de 40X) de *M. salicifolia* – OB (A) e BH (B), e *M. gonoclada* (C) corados com “vermelho de sudan B”. Em destaque gotículas de lipídeos.



Figura 14: Cortes transversais das nervuras principais (aumento de 4X) de *M. salicifolia* – OB (A) e BH (B), e *M. gonoclada* (C) corados com cloreto férrico.

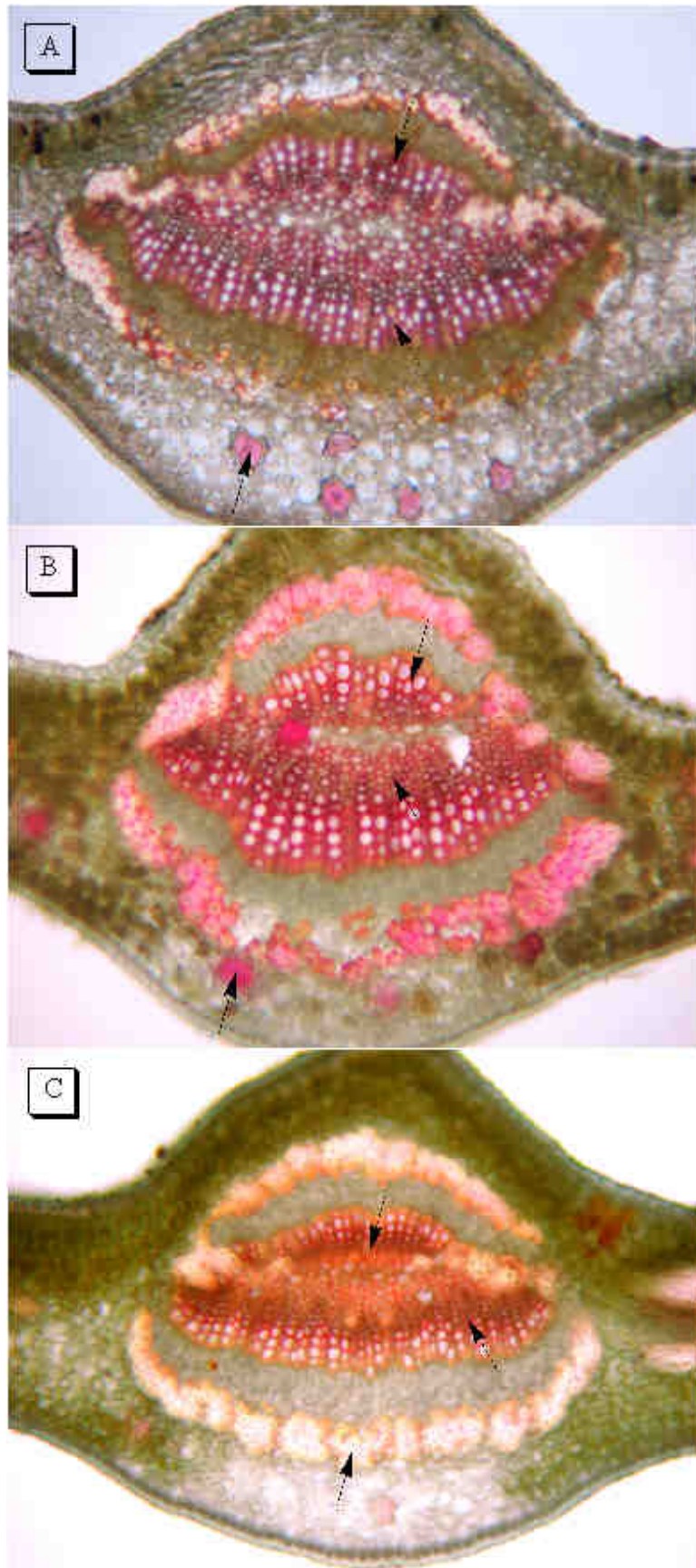


Figura 15: Cortes transversais das nervuras principais (aumento de 10X) de *M. salicifolia* – OB (A) e BH (B), e *M. gonoclada* (C) corados com floroglucinol.

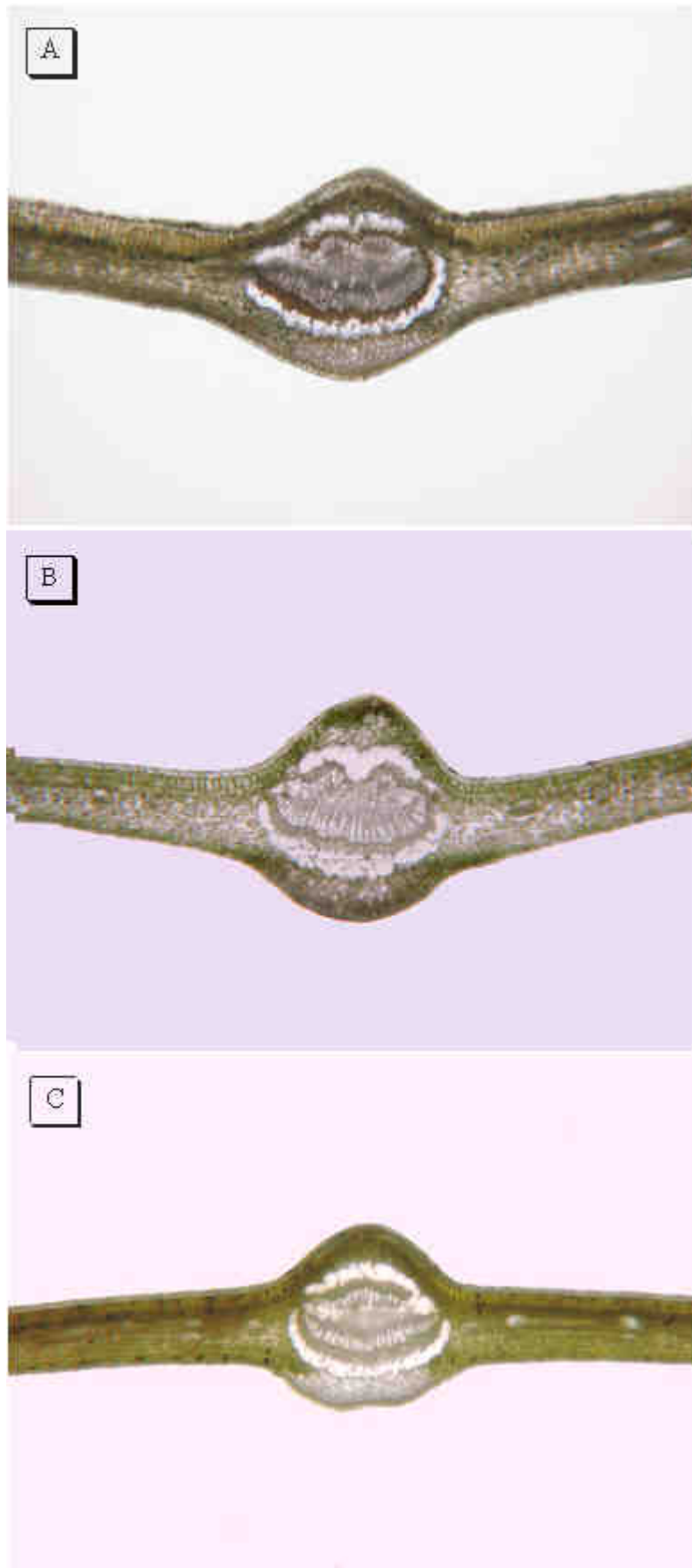


Figura 16: Cortes transversais das nervuras principais (aumento de 4X) de *M. salicifolia* – OB (A) e BH (B), e *M. gonoclada* (C) corados com lugol.

4.2.2 Análise de flavonóides

Num trabalho de mestrado concluído em 1997, Míriam Pimentel Mendonça relatou diferença na constituição química em duas espécies do gênero *Maytenus*, utilizando-se de cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS) associada a lâmpada emissora de ultravioleta em 365 nm (UV₃₆₅) como técnica analítica de identificação. A autora mostrou que *M. gonoclada* coletada na Serra da Piedade, em Caeté, apresentava uma quantidade aparente de rutina menor que a população de *M. salicifolia* coletada na Estação Ecológica da UFMG, através da análise de CCDS do sólido obtido por extração aquosa do pó de folhas de ambas as espécies estudadas.

Incentivado pelas informações supramencionadas, foi sugerido um protocolo similar ao proposto por Mendonça (1997) para extração de flavonóides glicosilados, em especial a rutina, com a finalidade de se verificar a distinção entre os grupos vegetais estudados no presente trabalho. Realizando o protocolo de análise por CLAE/UV para as três populações, constatou-se inicialmente um pico com tempo de retenção (TR) de 4,8 minutos (min) coincidente com a rutina padrão com TR = 4,8 min (figura 20, pág. 46) no extrato aquoso de *M. salicifolia* população OB (Figura 17, pág. 44). Com relação ao perfil cromatográfico, observou-se ainda que nenhuma das populações apresentaram perfil muito similar, revelando uma nítida diferenciação entre ambas as populações. Os cromatogramas a seguir são resultados da análise por CLAE/UV dos extratos aquosos de folhas de *Maytenus salicifolia* (populações OB e BH) e *Maytenus gonoclada* (CA).

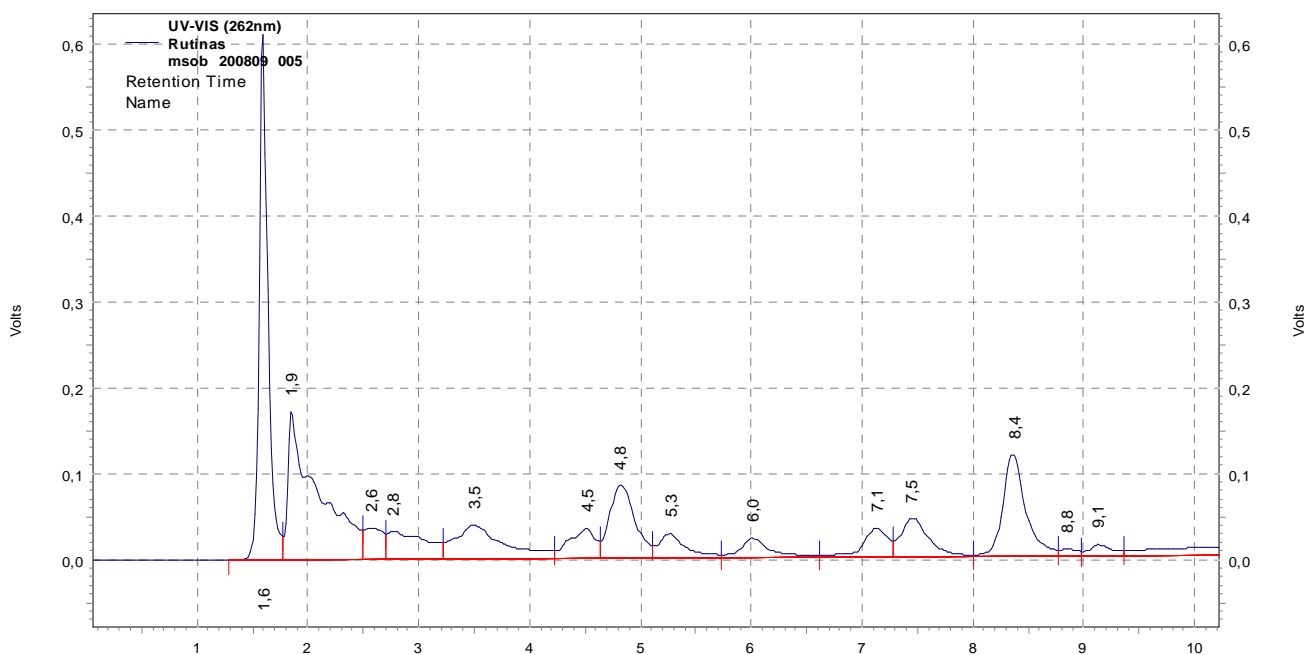


Figura 17: Cromatograma obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de *Maytenus salicifolia*, população Ouro Branco (OB).

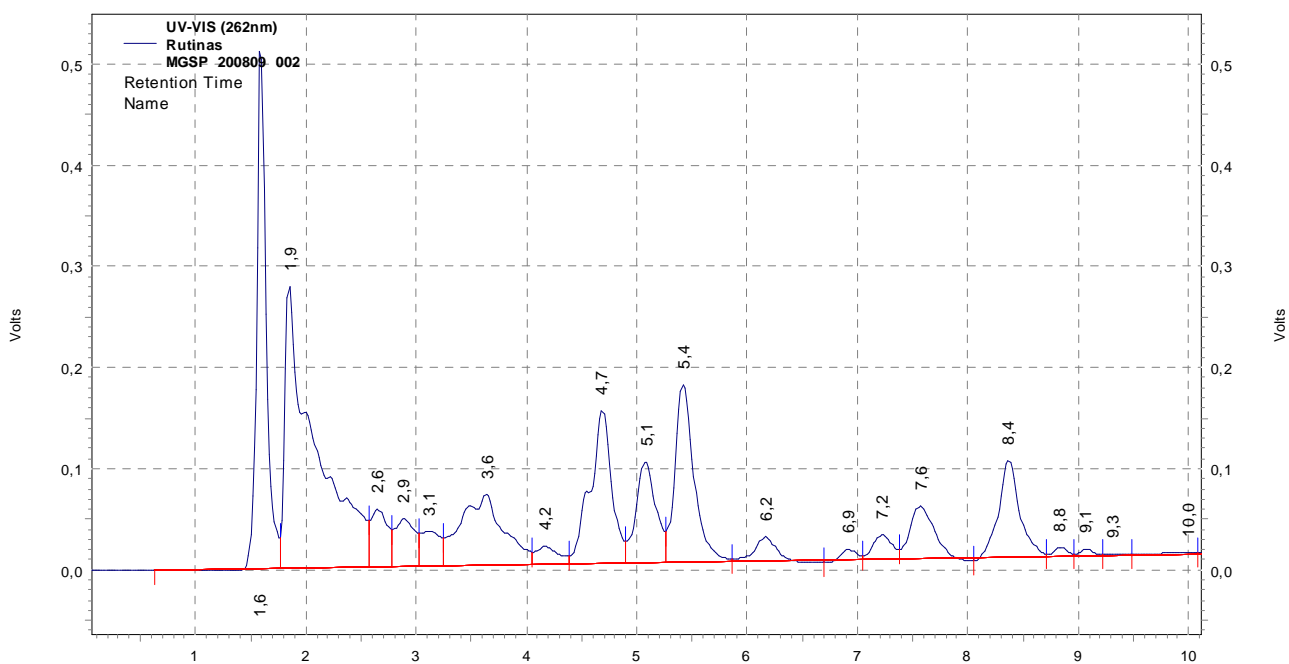


Figura 18: Cromatograma obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de *Maytenus gonoclada*, população Caeté (CA).

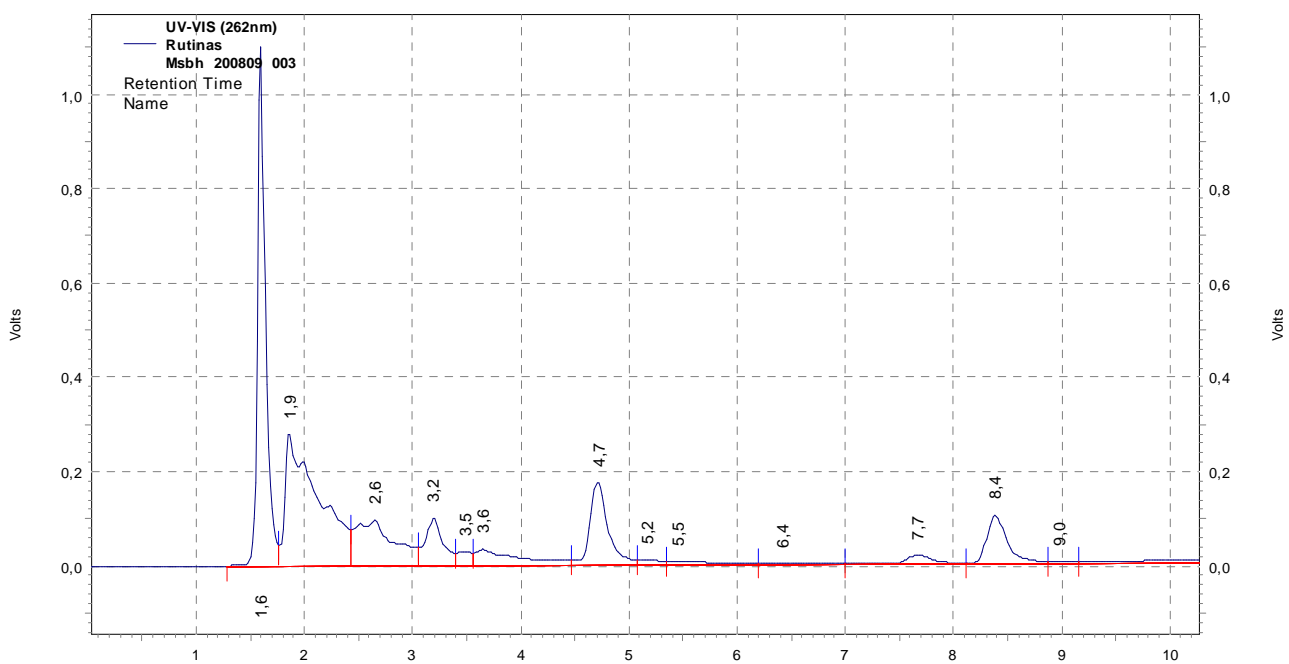


Figura 19: Cromatograma obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de *Maytenus salicifolia*, população Belo Horizonte (BH).

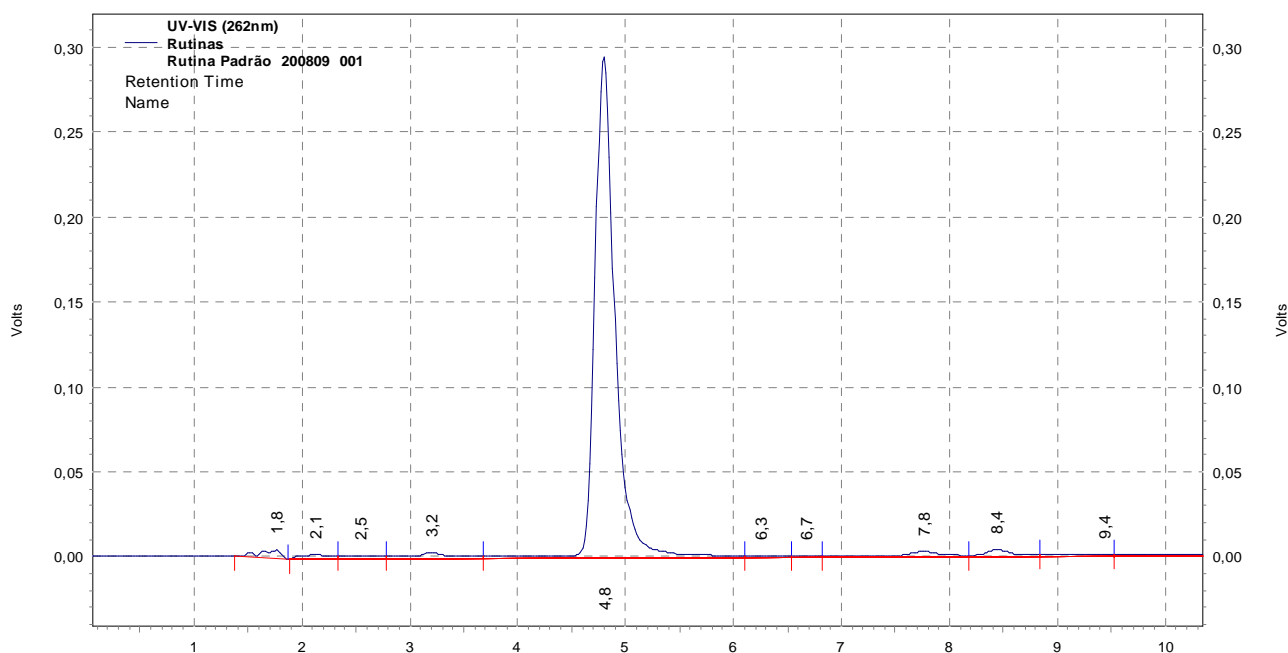


Figura 20: Cromatograma obtido por CLAE/UV da amostra padrão de rutina.

Em uma análise mais minuciosa dos cromatogramas das figuras 18 e 19, suspeitou-se que os picos com tempo de retenção (TR) em 4,7 e 4,7 minutos nos cromatogramas pertencentes aos grupos BH e CA, respectivamente, poderiam ser relativos à presença de rutina. Para confirmar esta suspeita, procedeu-se a uma nova análise por CLAE/UV com o sistema eluente diferente para o extrato aquoso de *M. gonoclada* CA. Foi utilizado um sistema isocrático com 100 % da solução “B” (vide subitem 4.1.2, Análise de flavonóides, pág. 35) com detector de UV ajustado em 262 nm.

O cromatograma obtido com o sistema de eluição isocrático diferente evidenciou um pico que poderia ser relativo à presença do flavonóide glicosilado rutina no extrato analisado. Os picos relativos ao padrão e um pico do extrato aquoso de *M. gonoclada* coincidiriam perfeitamente, ambos com TR igual a 10,08 minutos (figura 21, pág. 47). Portanto, este dado indica que os picos em 4,7 min nos cromatogramas das populações BH e CA, mostrados na figura 22, pág. 47, corresponderem à presença de rutina nos respectivos extratos.

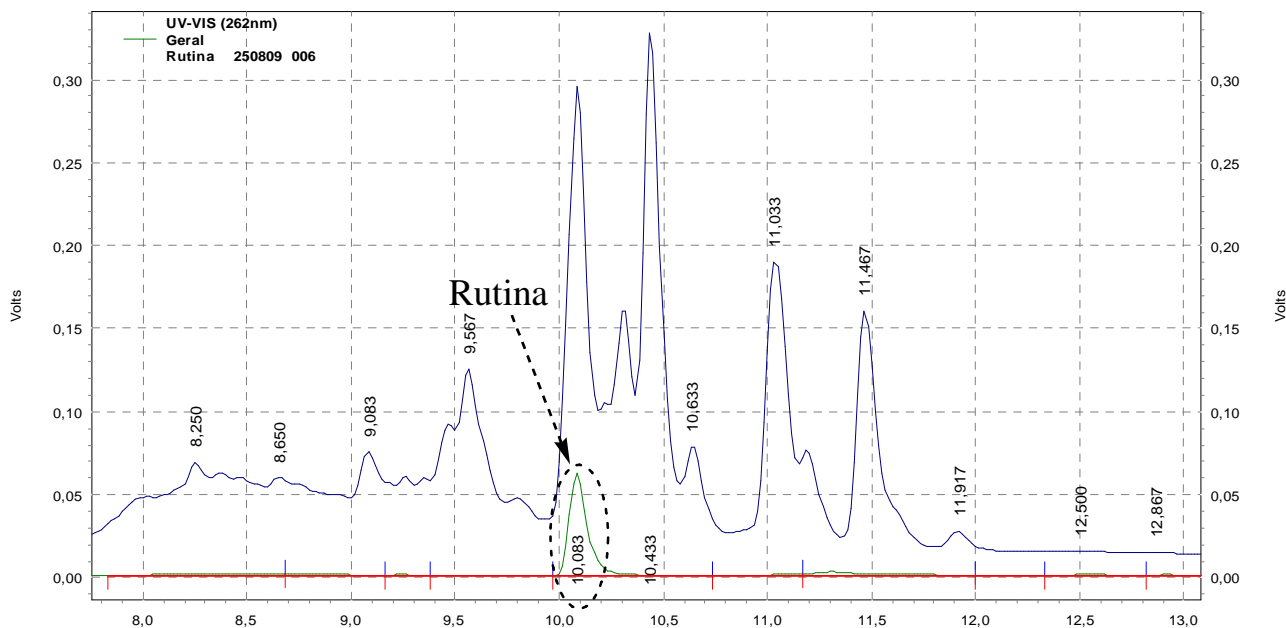


Figura 21: Cromatogramas obtido por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de *gonoclada* (linha azul) e do padrão de rutina (linha verde) utilizando um sistema de eluição com 100 % de solução B (*vide* subitem 4.1.2, Análise de flavonóides, pág. 35).

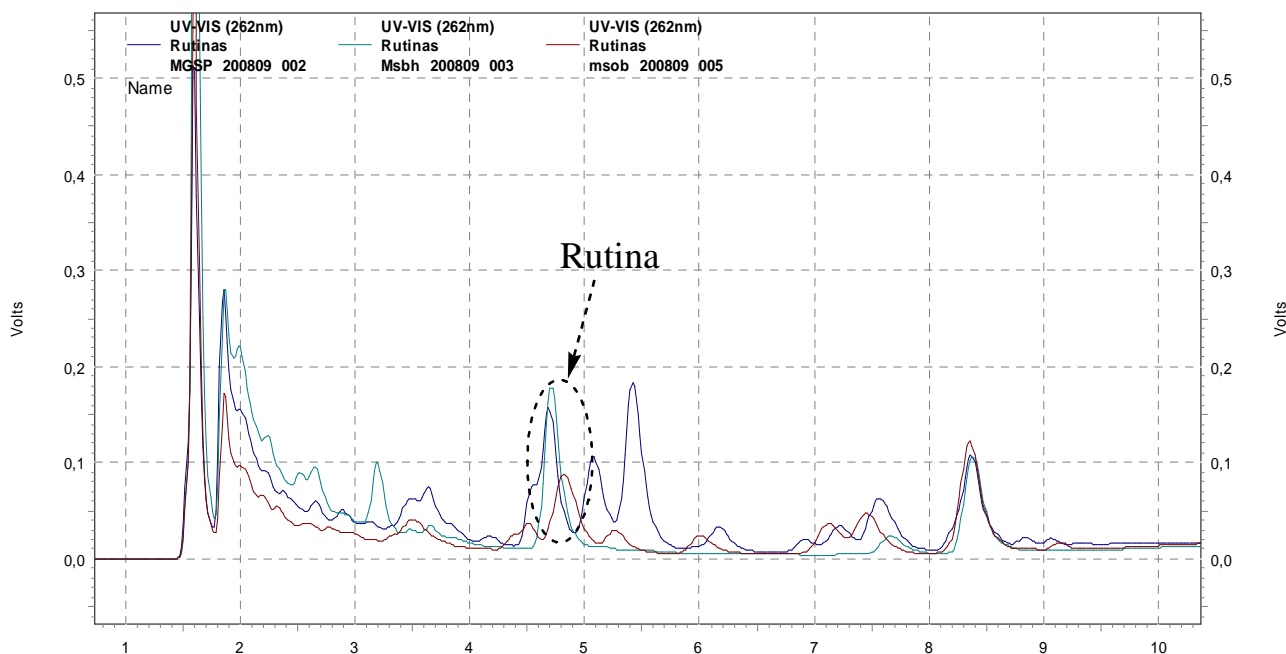


Figura 22: Cromatogramas obtidos por CLAE/UV do extrato aquoso de folhas de *Maytenus salicifolia* OB (linha vermelha), *M. salicifolia* BH (linha azul claro) e *M. gonoclada* CA (linha azul).

2.1.3 Análise de triterpenos

- Método de validação

Um método de validação faz uso de um conjunto de testes que avalia juntamente todos os parâmetros em que se baseia o método analítico, define e documenta suas características de desempenho, demonstrando, assim, se o método considerado adequa-se a uma determinada finalidade analítica (Thompson, 2002). Em consequência desse pressuposto, a validação sugerida para o protocolo de análise de triterpenos em extrato hexânico de *Maytenus* sp. teve como objetivo assegurar a repetitividade e a reprodutibilidade da análise (ABNT-INMETRO, 2003).

A avaliação da reprodutibilidade e da repetitividade foi realizada com a análise em replicata (sextuplicatas) do extrato em hexano de *M. salicifolia* OB. A reprodutibilidade consistiu na injeção de seis amostras de extratos obtidos através do protocolo de extração de seis diferentes amostras da planta moída (Figura 23). A repetitividade foi estimada analisando-se uma mesma amostra de extrato seis vezes (Zhao, 2005; Cheng, 2006; Tao, 2007).

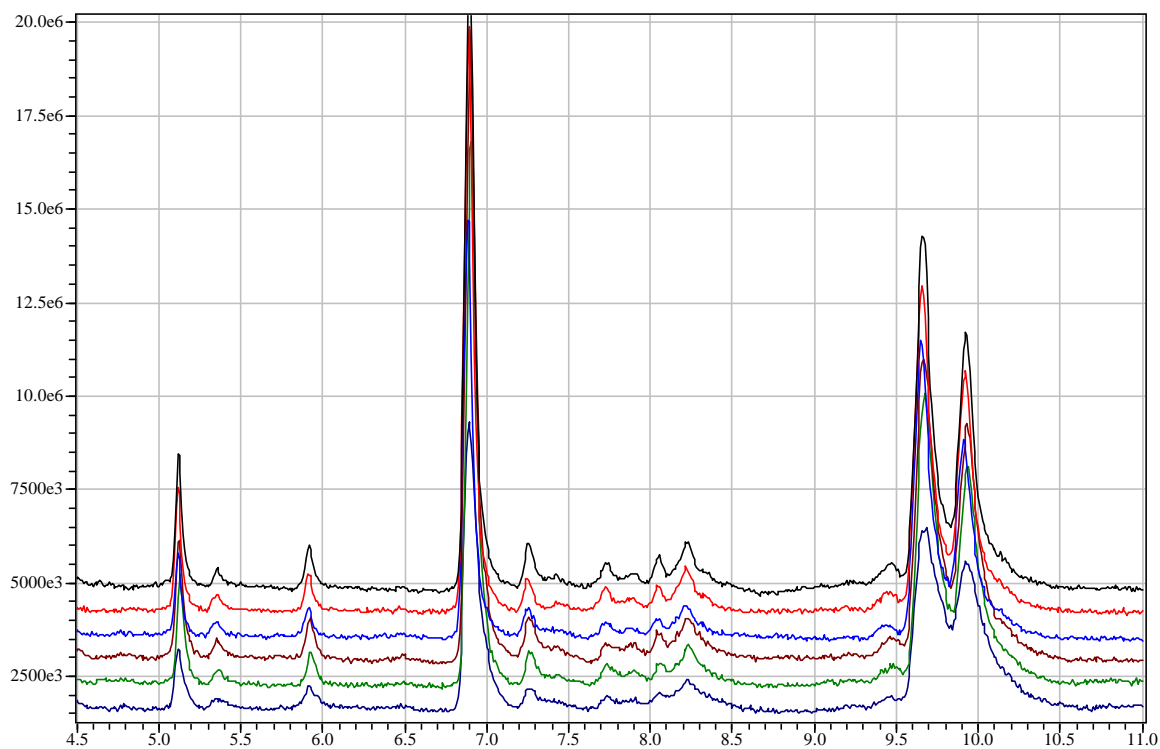


Figura 23: Sextuplicatas do extrato em hexano de *M. salicifolia* OB com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do método de análise de compostos por CG/EM.

Os valores dos coeficientes de variação (CV) ou desvios padrões relativos (DPR) para o TR dos 6 picos mais intensos se mostraram menores que 0,01%, tanto na avaliação da repetitividade quanto na reprodutibilidade. Com relação à intensidade ou área dos seis picos (AP) de maior intensidade o CV se mostrou entre 0,1 e 3,6 %. O CV foi calculado utilizando as seguintes equações (Magalhães, 2007):

$$\bar{X} = \sum x_i/n$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$CV (DPR) = (S/\bar{X}) * 100$$

Onde: \bar{X} : média amostral
 S: desvio padrão da média
 x_i : valor de cada medição
 n: número de replicatas

- Análise do extrato em hexano por CG/EM

Os cromatogramas a seguir foram obtidos pela análise em CG/EM de extratos em hexano de folhas de *Maytenus salicifolia* (duas populações) e *Maytenus gonoclada* (uma população). A numeração indicada nos cromatogramas refere-se aos picos identificados pela comparação com os bancos de dados disponíveis no *software* do equipamento (NIST147 e NIST27), pela confrontação com padrões e com dados da literatura. A tabela 1, pág. 57, resume a identificação das substâncias identificadas nos cromatogramas.

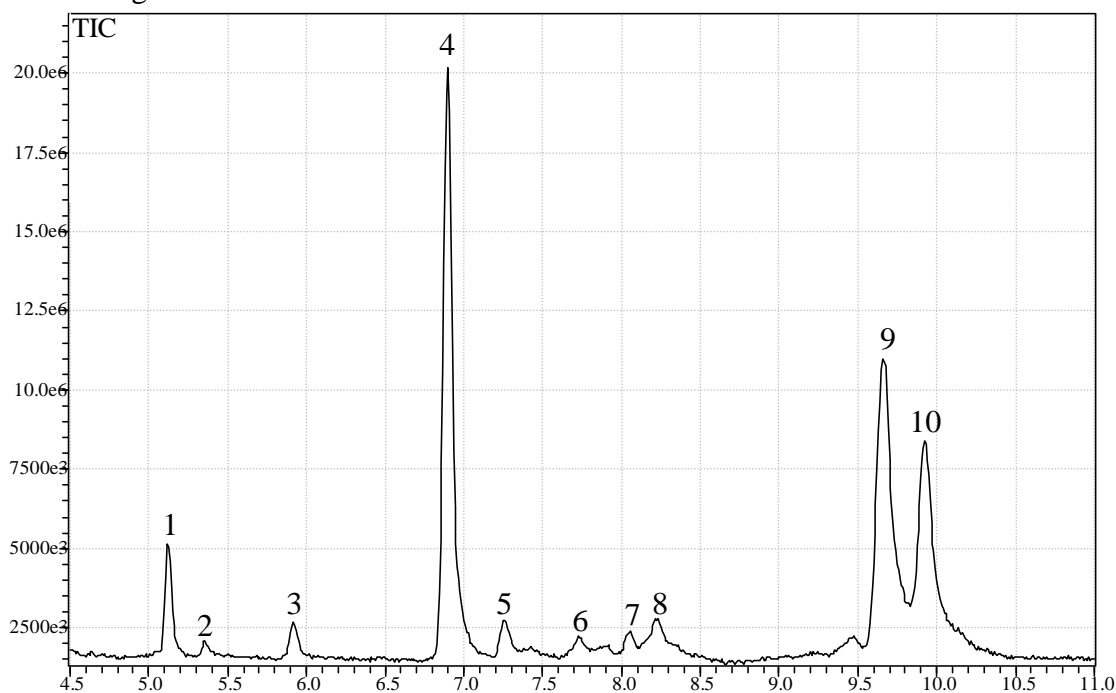


Figura 24: Perfil cromatográfico obtido por CG/EM de extrato em hexano de folhas de *Maytenus salicifolia*, população Ouro Branco.

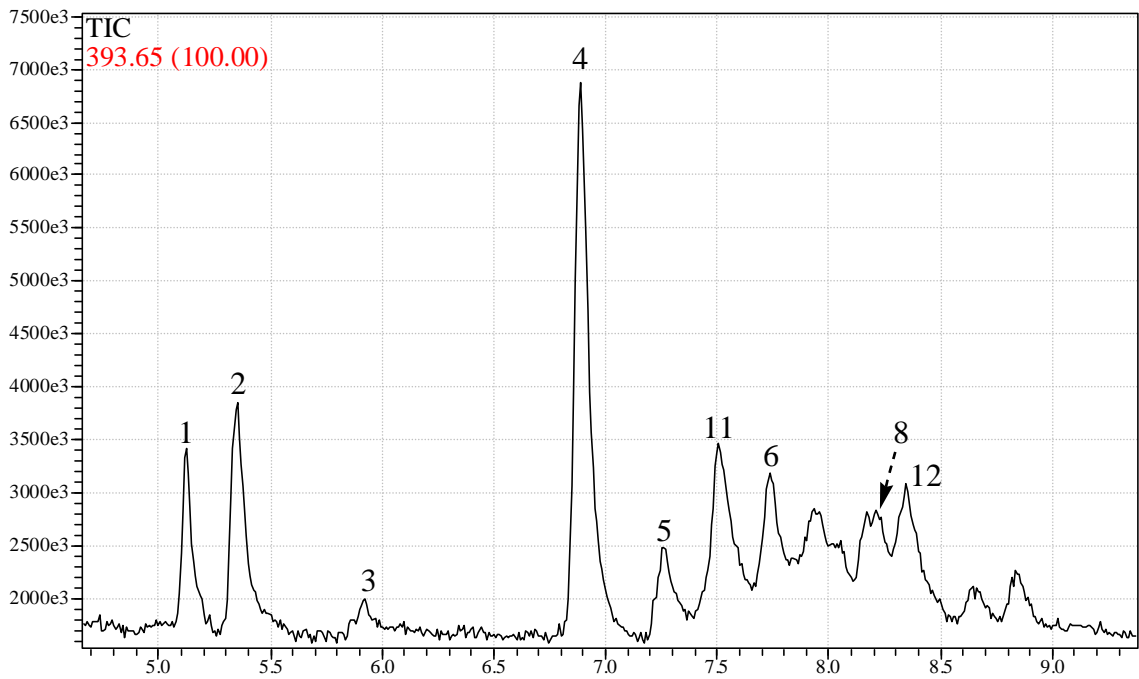


Figura 25: Perfil cromatográfico obtido por CG/EM de extrato em hexano de folhas de *Maytenus salicifolia*, população Belo Horizonte.

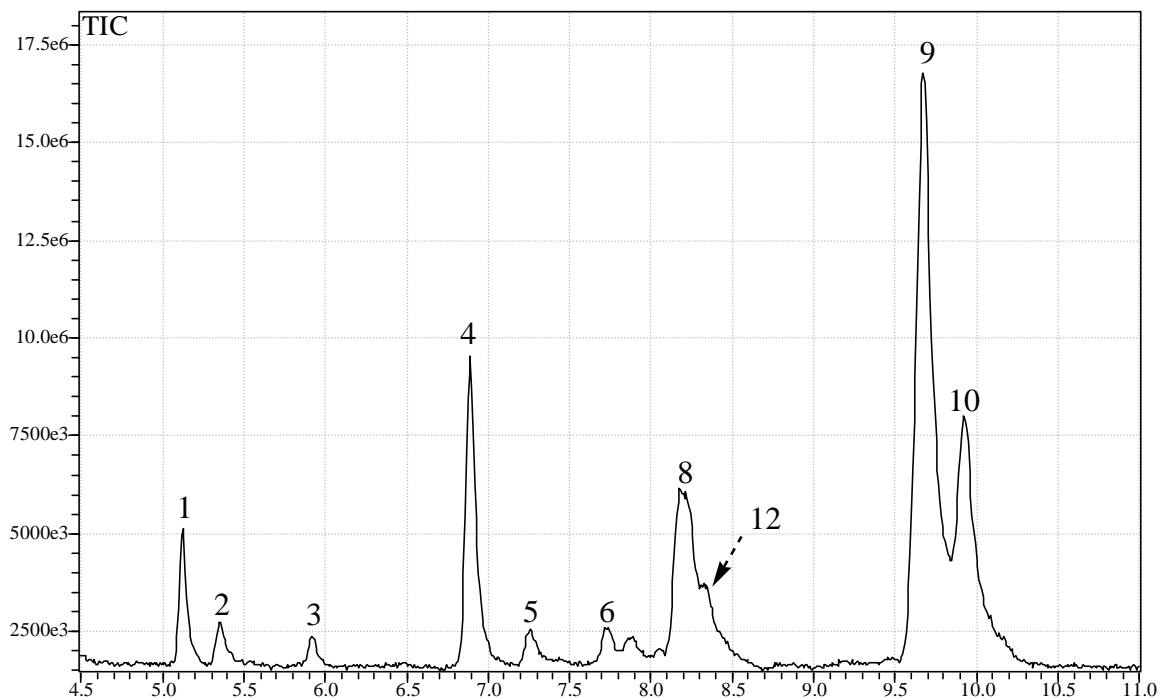


Figura 26: Perfil cromatográfico obtido por CG/EM de extrato em hexano de folhas de *Maytenus gonoclada* coletada em Caeté.

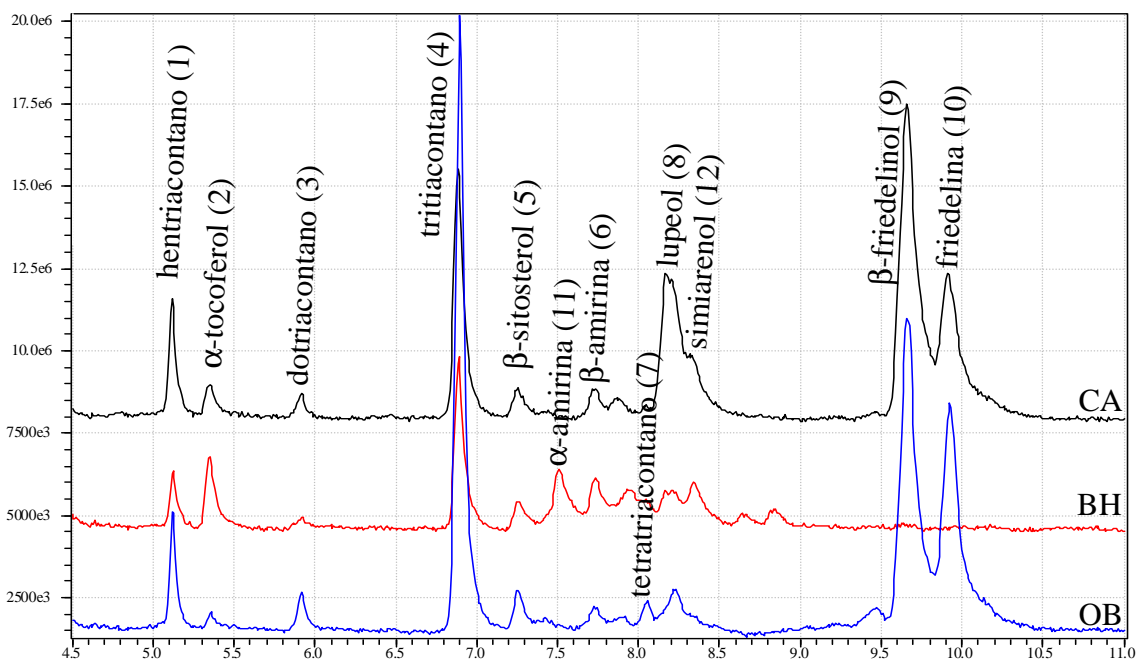


Figura 27: Perfis cromatográficos obtidos por CG/EM de extrato em hexano de folhas de *Maytenus salicifolia* OB (linha azul), *M. salicifolia* BH (linha vermelha) e *M. gonoclada* (linha preta).

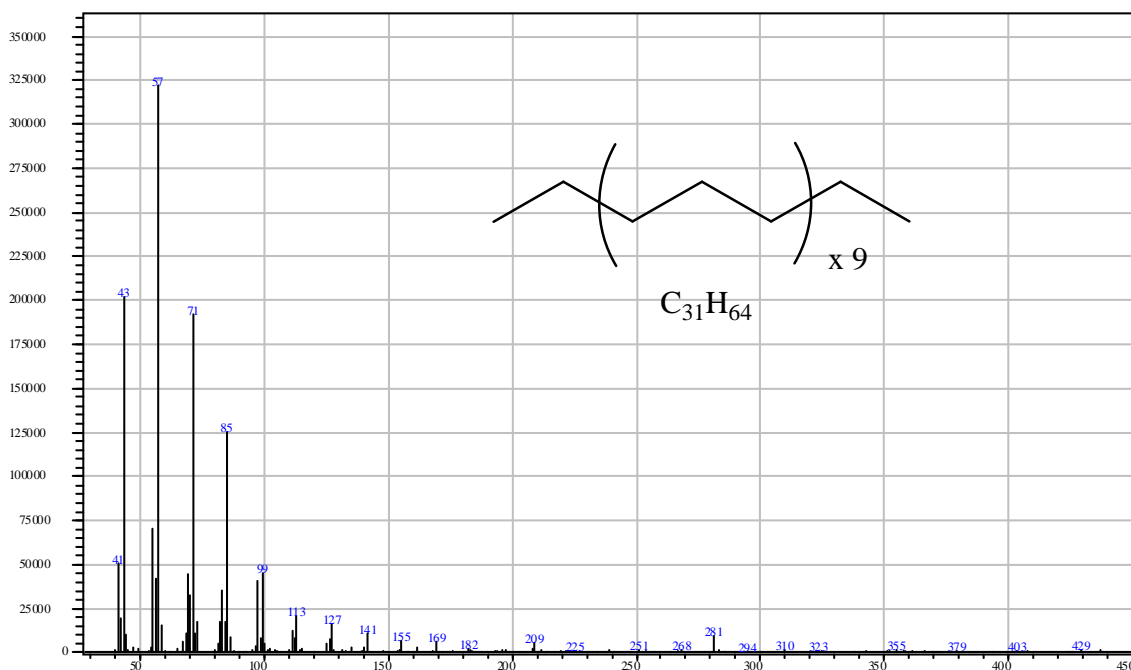


Figura 28: Espectro de massas relativo ao pico 1 das figuras 24, 25 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como hentriacontano (Valladão, 2005).

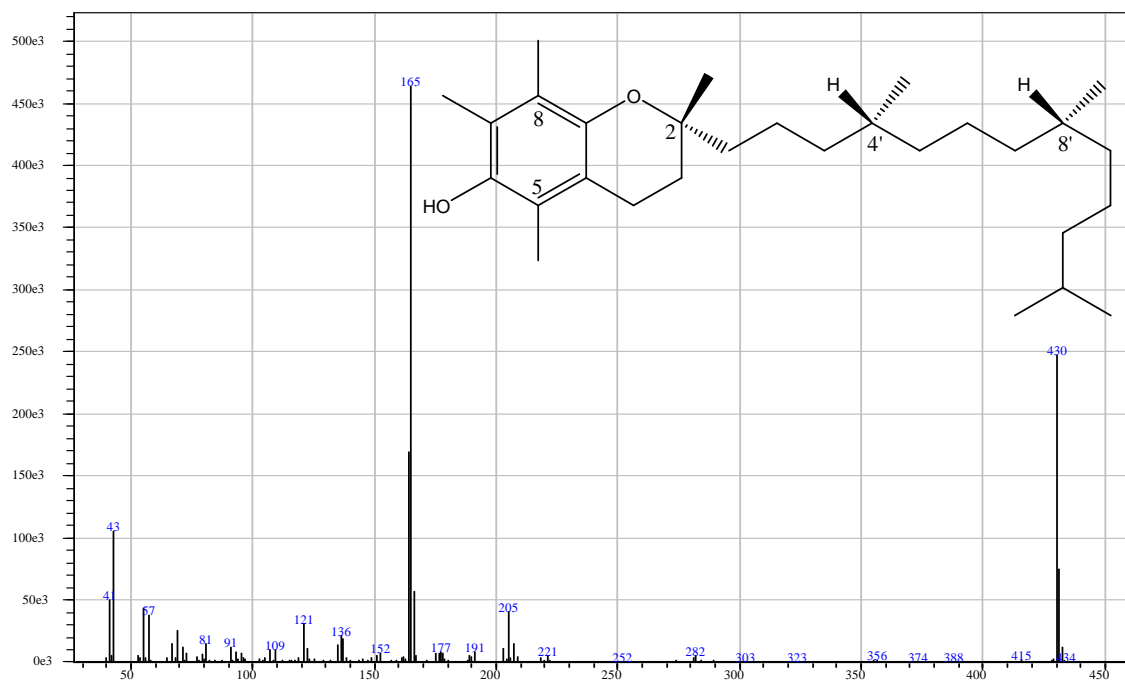


Figura 29: Espectro de massas relativo ao pico 2 das figuras 24, 25 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como α -tocoferol ou vitamina E.

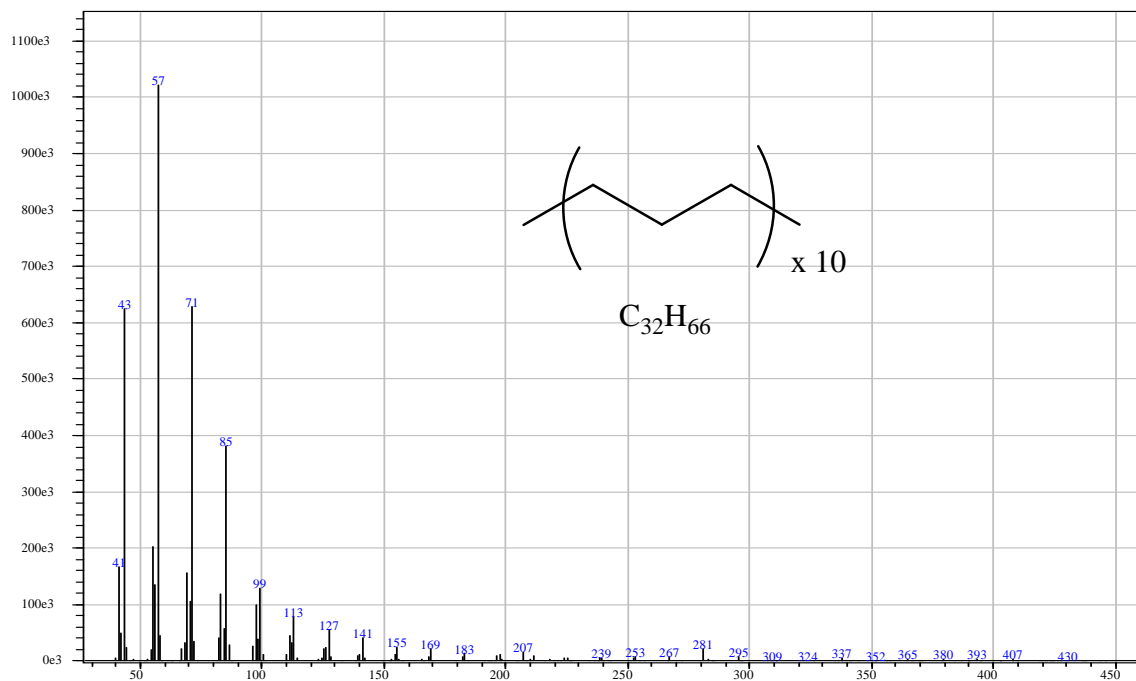


Figura 30: Espectro de massas relativo ao pico 3 das figuras 24, 25 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como dotriacontano (Valladão, 2005).

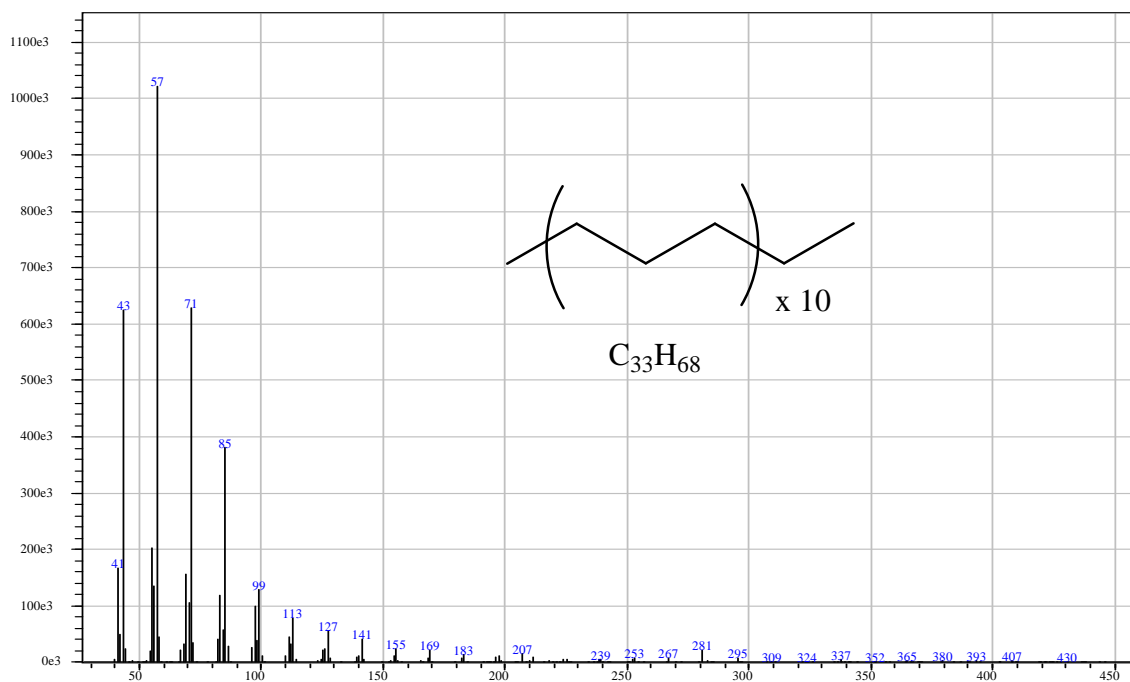


Figura 31: Espectro de massas relativo ao pico 4 das figuras 24, 25 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como tritriacontano (Valladão, 2005).

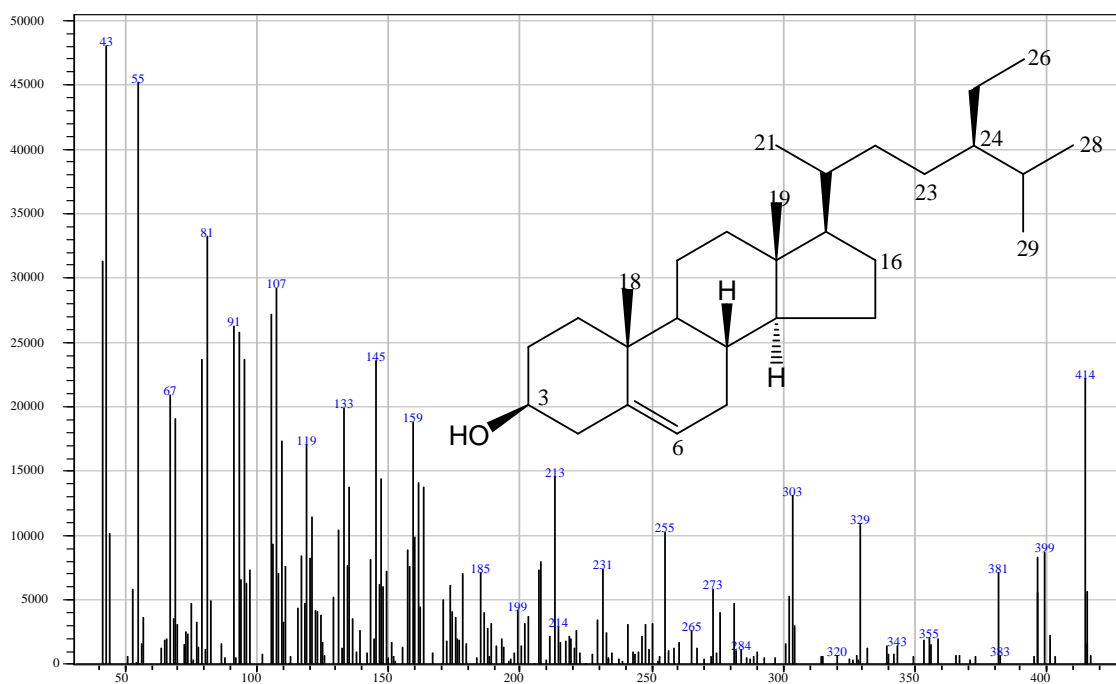


Figura 32: Espectro de massas relativo ao pico 5 das figuras 24, 25 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como β -sitosterol.

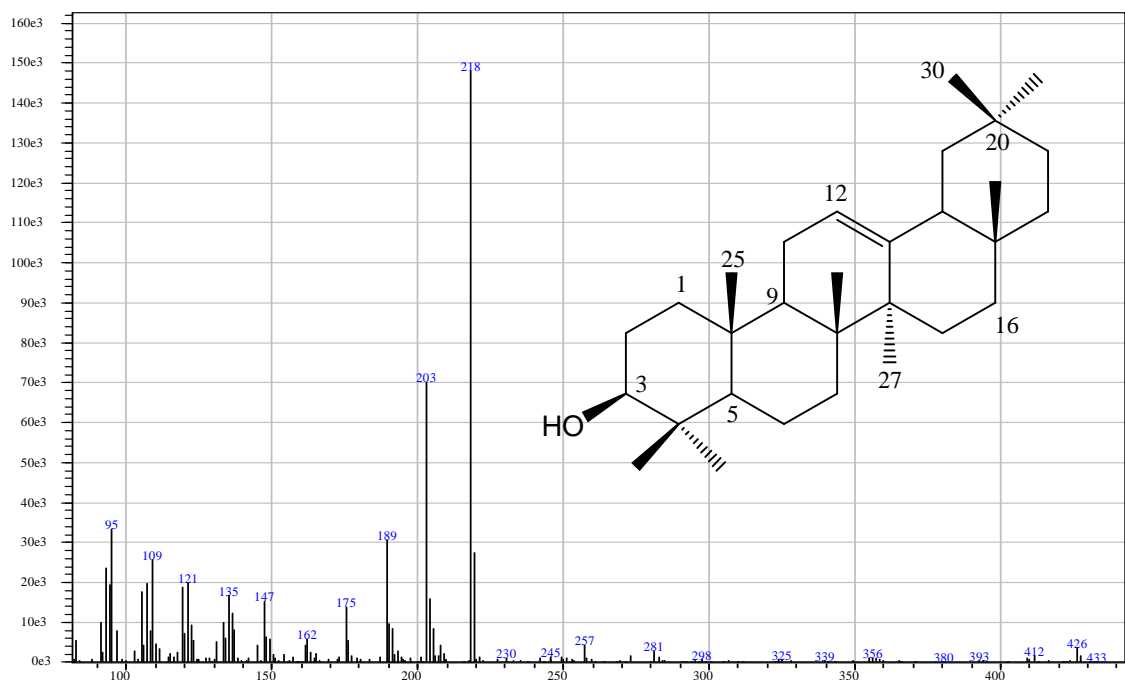


Figura 33: Espectro de massas relativo ao pico 6 das figuras 24, 25 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como β -amirina.

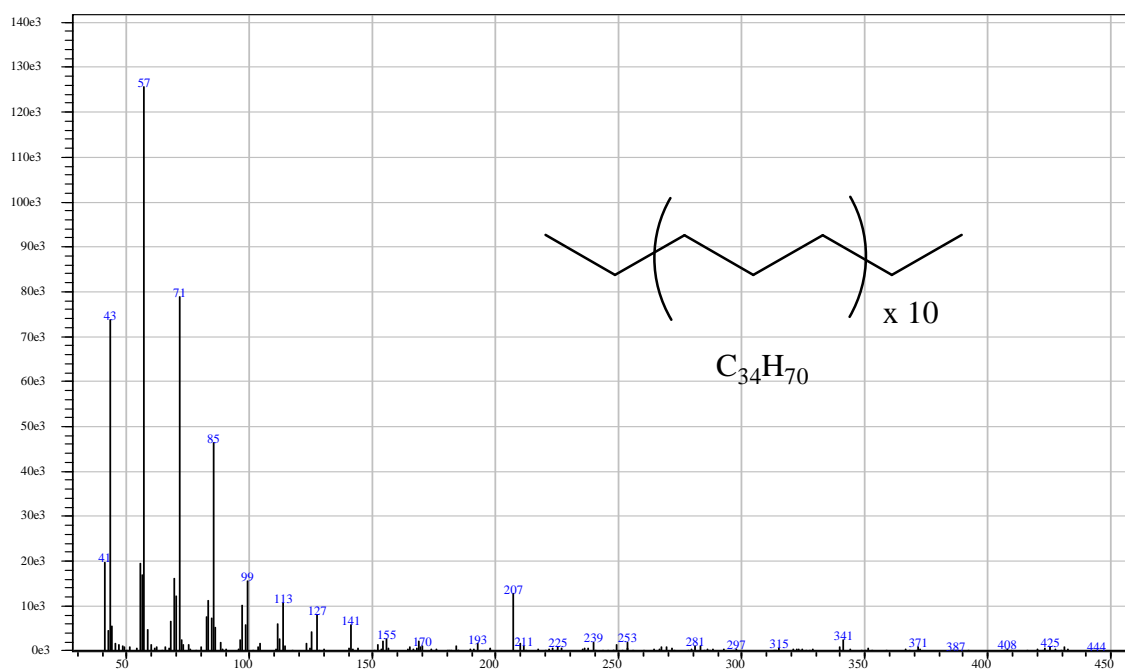


Figura 34: Espectro de massas relativo ao pico 7 da figura 24 (pág. 49) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como tetraatriacontano (Valladão, 2005).

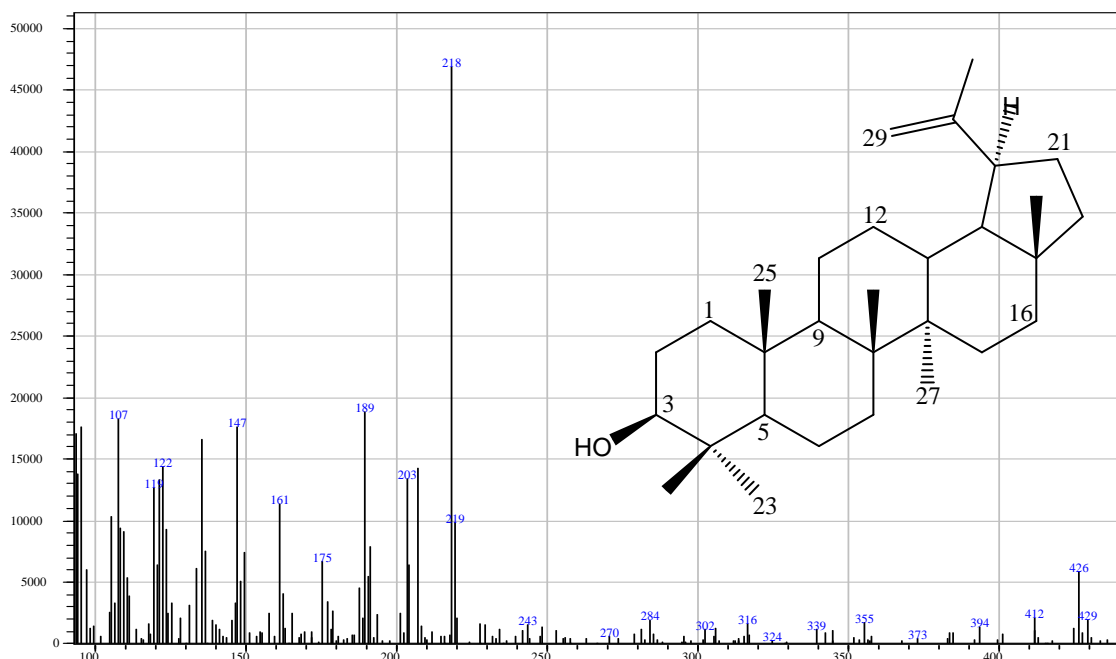


Figura 35: Espectro de massas relativo ao pico 8 das figuras 24, 25 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como lupeol.

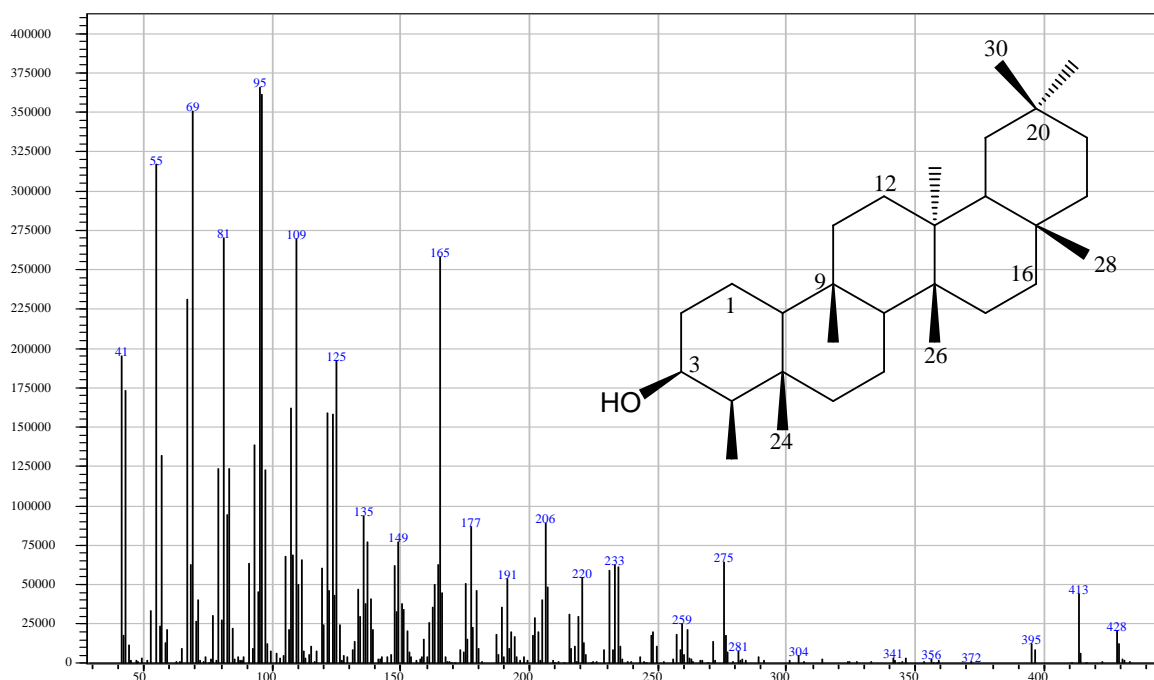


Figura 36: Espectro de massas relativo ao pico 9 das figuras 24 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como β -friedelinol.

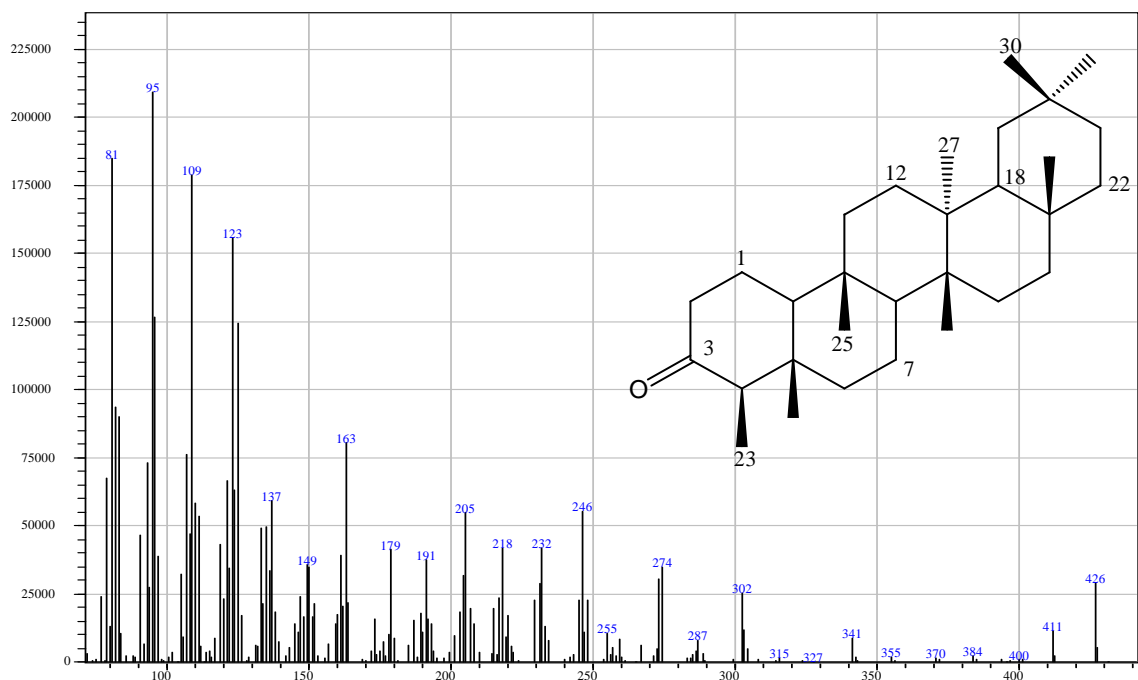


Figura 37: Espectro de massas relativo ao pico 10 das figuras 24 e 26 (pág. 49 e 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como friedelina.

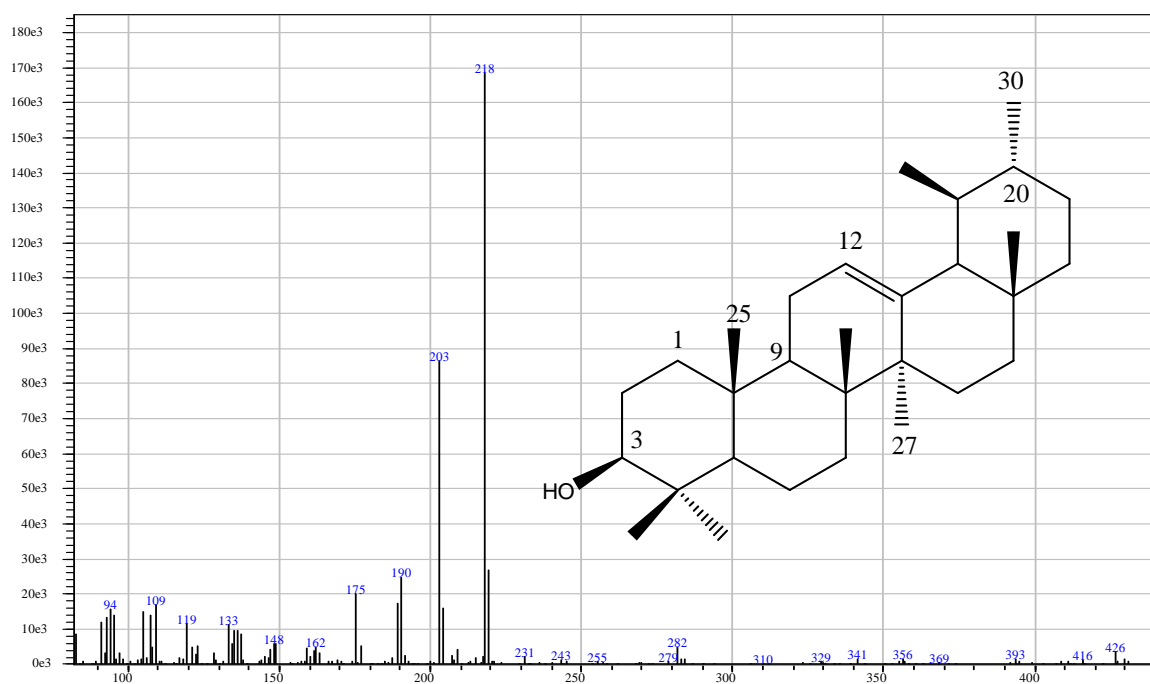


Figura 38: Espectro de massas relativo ao pico 11 da figuras 25 (pág. 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como α -amirina.

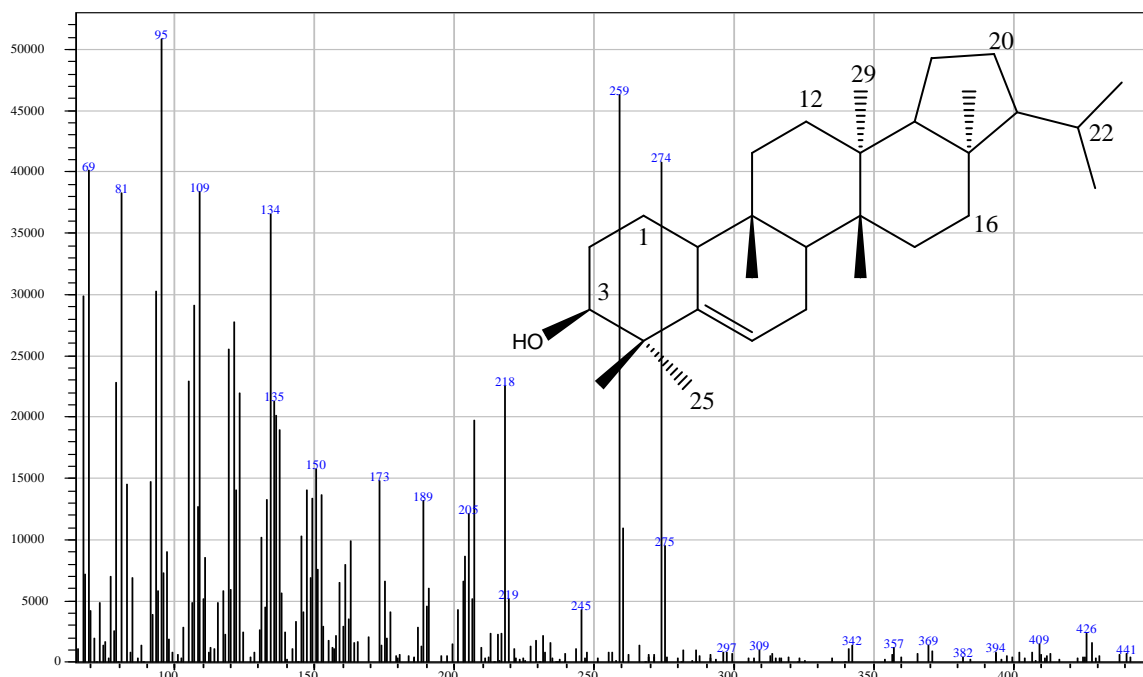


Figura 39: Espectro de massas relativo ao pico 12 da figura 25 (pág. 50) obtido por CG/EM. O composto foi identificado como simiarenol (Shiojima, 1999).

Tabela 1: Compostos identificados por CG/MS na análise de extratos em hexano de *M. salicifolia* (OB e BH) e *M. gonoclada* (CA)

Picos	Tempo de retenção	Similaridade*	Composto
1	5,12	95%	hentriacontano
2	5,35	95%	α -tocoferol
3	5,91	90%	dotriacontano
4	6,89	94%	tritiacontano
5	7,25	81%	β -sitosterol
6	7,72	80%	β -amirina
7	8,04	90%	tetratriacontano
8	8,21	80%	lupeol
9	9,66	86%	β -friedelinol
10	9,93	91%	friedelina
11	7,50	84%	α -amirina
12	8,33	81%	simiarenol

*Similaridade (%): valor da concordância (identidade ou semelhança) entre o espectro de massas obtido pelo equipamento e os dados disponíveis na biblioteca do *software* (NIST147 e NIST27).

4.3 Discussão dos resultados

4.3.1 Análise histoquímica

O estudo histoquímico permitiu constatar que as populações trabalhadas não diferiram entre si quanto ao conteúdo de gordura (lipídeos), amido, lignina e de compostos fenólicos mostraram, ao contrário, grande similaridade quanto ao perfil de distribuição de todos os compostos analisados.

Na análise com vermelho de sudan B, notou-se que os grupos, independentemente de seu *habitat*, apresentaram uma maior concentração de lipídeos formando uma fina camada nas epidermes adaxial e abaxial da folha e algumas gotículas esparsas pelas células epiteliais quando comparado com o mesofilo (parênquimas lacunoso e paliçádico). Isso indica que as populações estudadas utilizam os lipídeos quase que exclusivamente como proteção para a estrutura foliar, em decorrência da pequena quantidade de gordura de reserva evidenciada nas fotomicrografias. Há duas hipóteses mutuamente exclusivas que podem justificar essa afirmação, uma é consequência da época de coleta que coincidiu com final do inverno e início da primavera (*vide* data de coleta subitem 3.1, Material vegetal, pág. 28), período no qual as plantas apresentam um metabolismo mais baixo em virtude da menor disponibilidade de água e, conseqüentemente, utilizam-se mais de suas reservas que uma eventual biossíntese poderia repor, ou decorrência da fisiologia vegetal das *Maytenus* estudadas que simplesmente não armazenam grandes quantidades de lipídeos.

A análise de compostos fenólicos utilizando o cloreto férrico como reagente resultou negativa, revelando que os grupos estudados não apresentam conteúdo significativo destas substâncias. Este resultado indica que estas plantas não acumulam estes grupos de compostos e, conseqüentemente, não os utilizam como defesa contra a irradiação excessiva, patógenos e predadores (*vide* Introdução, pág. 2 e 3).

O teste para determinar a presença de amido não revelou a presença desta importante substância de reserva nos grupos analisados, o que pode ser resultado dos mesmos fenômenos ocorridos com os lipídeos. Em resumo, as reservas de amido podem ter sido totalmente consumidas durante o período de seca e não foram repostas, ou estes grupos não armazenam grandes quantidades de substâncias de reserva como o amido.

A reação com floroglucinol revelou a presença de lignificação do xilema localizado no cerne da nervura principal. As fotomicrografias mostraram uma

similaridade entre os grupos em relação à presença de lignina, mas revelou uma maior intensidade da coloração vermelha para a população BH, o que sugere uma maior lignificação do xilema neste grupo. Em contrapartida, a população de *M. gonoclada* (CA) apresentou o xilema com tonalidade mais clara, indicando um menor conteúdo de lignina. Estas distinções entre os grupos são aparentemente respostas contra o estresse que são expostas em seus respectivos *habitats*. De alguma forma a lignificação está ligada ao ambiente em que o grupo está inserido. A *M. gonoclada* no ambiente de maior estresse com menor lignificação do xilema, *M. salicifolia* OB num meio de escassez intermediária e conteúdo de lignina também intermediária entre os grupos estudados e, por fim, *M. salicifolia* BH com maior lignificação e localizada numa altitude menor, com maior incidência de chuvas e solo mais rico e profundo.

4.2.2 Análise de flavonóides

O método por CLAE/UV desenvolvido para a identificação de rutina no extrato aquoso de *M. salicifolia* e *M. gonoclada* foi muito promissor. A adequação do sistema de eluição isocrática utilizando, tanto a mistura das soluções A e B (sistema AB), quanto somente à solução B, possibilitou sugerir a presença de rutina em todas as amostras analisadas. Portanto, a variação dos dados obtidos com sistema de eluição AB, em torno de 2,5 % de diferença entre os valores 4,72 e 4,68 min e o padrão de rutina, não parece ser significativo para descartar a hipótese de mesma identidade entre ambos os picos e o padrão utilizado. Os cromatogramas revelaram, também, que a intensidade dos picos de rutina é similar para ambas as populações, não corroborando com os dados de Mendonça (1997) que relata uma nítida diferenciação de concentração deste flavonol glicosilado para ambas as populações. A possível justificativa para essa discrepância de dados é a técnica utilizada, em virtude da cromatografia em camada delgada ter uma resolução menor e, portanto, não permitir uma separação eficiente e nítida de compostos similares como pode ocorrer na CLAE. Outro fato que pode ter contribuído para a divergência dos dados é a data de coleta distinta entre os trabalhos, fato que não pode ser confirmado devido à falta dessa informação nos dados relatados por Mendonça (1997).

O protocolo, desde a extração até a análise por cromatografia líquida, mostrou grande potencial na análise quimiotaxonômica quando se avalia o perfil cromatográfico obtido. Apesar de não ter sido realizada a validação do *fingerprint* por CLAE/UV do

extrato aquoso, nota-se uma nítida diferenciação de ambas as populações e uma maior riqueza de compostos na constituição do extrato de *M. gonoclada*. Embora os cromatogramas mostrem, além do pico da rutina em comum, dois outros picos bem evidentes em todas as amostras examinadas. O método proposto para análise de rutina, por conseguinte, mostrou potencial para ser submetido à validação e fazer parte de um protocolo quimiotaxonômico amplo de análise de plantas.

4.2.3 Análise de triterpenos

O método de validação utilizado para avaliar o desempenho do protocolo sugerido permitiu constatar um aceitável grau de concordância entre os resultados das medições dos tempos de retenção, com DPR (desvio padrão relativo) menor que 0,01 %, e um resultado idêntico em relação às áreas dos picos com DPR menor que 3,6 %. Assim, pode-se afirmar que a estabilidade da análise quimiotaxonômica, desde a extração até a injeção de uma alíquota no CG/EM e a obtenção do cromatograma, é satisfatória e permite uma geração segura de informações das plantas analisadas.

No cromatograma obtido para a população de *Maytenus salicifolia* coletada em Ouro Branco (OB) foram identificados 10 substâncias utilizando-se da biblioteca do *software* NIST147 e NIST27, padrões disponíveis no laboratório e dados da literatura quando necessário (Figura 24, pág. 49). Este mesmo procedimento foi adotado para as outras populações estudadas permitindo identificar 9 substâncias no cromatograma de *Maytenus salicifolia* coletada em Belo Horizonte (BH) (Figura 25, pág. 50) e determinar a identidade de 10 substâncias no cromatograma de *Maytenus gonoclada* coletada em Caeté (CA) (Figura 26, pág. 50). As substâncias identificadas foram numeradas nos cromatogramas das populações analisadas e os respectivos espectros de massas mostrados nas figuras 28 a 39, pág. 51 a 57, juntamente com uma Tabela (Tabela 1, pág. 57) com os respectivos valores de similaridade em porcentagem (%) entre os espectros de massas obtidos e os dados das bibliotecas NIST 147 e NIST27.

A análise comparativa dos cromatogramas revelou (Figuras 27, pág. 51) que existe uma nítida diferenciação entre as populações de *Maytenus salicifolia* OB e BH, em especial a ausência dos picos relativos à friedelina e ao β -friedelinol no cromatograma do grupo BH, mas nota-se, também, que o grupo OB não apresentou, nas análises por CG/EM, os picos 11 e 12, referentes à α -amirina e ao simiarenol, triterpeno da classe dos hopanos, respectivamente (Figuras 38 e 39, pág. 56 e 57). A comparação

dos dados obtidos de *M. salicifolia* e *M. gonoclada* mostrou que há similaridade de perfil cromatográfico entre os grupos OB e CA, principalmente em relação aos picos de 3 hidrocarbonetos de cadeia longa (picos 1, 3 e 4), β -sitosterol (5), β -amirina (6), lupeol (8), β -friedelinol (9) e friedelina (10). Entretanto, difere significativamente com relação à ausência do pico 7 (tetratriacontano), na maior intensidade do pico 8 correspondente ao lupeol e na presença de uma inflexão na lateral do pico 8 (ombro) relativo ao composto simiarenol (12) no extrato da população CA, triterpeno identificado, também, no cromatograma do grupo BH.

Nota-se, portanto, que apesar de um grau de similaridade menor ou maior os grupos não apresentam um perfil exatamente idêntico, mas os cromatogramas revelaram alguns picos em comum. *M. gonoclada* apesar de estar classificada como outra espécie apresenta uma feição cromatográfica comum entre as duas populações de *M. salicifolia*. Os dados mostraram, também, que a ausência de friedelina e β -friedelinol em *M. salicifolia* BH, substâncias extremamente comuns neste gênero, sugere que esta população constitua uma raça química distinta das demais. A não identificação destes dois triterpenos mostra que estes compostos não são marcadores ideais para a espécie *M. salicifolia* e, talvez, para o próprio gênero *Maytenus*. Com relação aos compostos identificadores ou marcadores dos grupos analisados citam-se os hidrocarbonetos de cadeia longa hentriacontano, dotriacontano e tritriacontano, o α -tocoferol, o β -sitosterol, a β -amirina e o lupeol.

Este protocolo possibilitou, ainda, a identificação de dois compostos que não foram isolados nos estudos fitoquímicos de ambas as populações estudadas até o presente momento, o tetraterpeno α -tocoferol ou vitamina E e o triterpeno da classe dos hopanos, o simiarenol. Suspeita-se que estes compostos estejam presentes em frações muito complexas e com quantidades pequenas de material, que em virtude da impossibilidade de separação por coluna cromatográfica com sílica gel, com ou sem adição de nitrato de prata, ou outro adsorvente disponível no laboratório (CaCO_3 , alumina e sephadex), é eventualmente descartado e, conseqüentemente, ocorrendo a perda de diversos compostos e levando ao não isolamento destas substâncias.

5. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *MAYTENUS SALICIFOLIA* REISSEK (BH)

O presente trabalho utiliza-se de vários métodos de análise química como reações colorimétricas, métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos com a finalidade de isolar, purificar e identificar constituintes químicos de *M. salicifolia*. Esta espécie, pertencente à família *Celastraceae* e endêmica no estado de Minas Gerais foi citada em um estudo realizado por um grupo de pesquisadores do Departamento de Botânica da UFMG como planta utilizada na medicina popular. O relato de sua aplicação no alívio de pruridos e de alergias tóxicas e sua diversidade química e anatômica (Grandi, 1989; Valladão, 2005) incentivaram a continuidade do estudo da polpa de fruto e das folhas desta espécie.

5.1 Preparo do material vegetal

Após a coleta (Estação Ecológica da UFMG) realizada em maio de 2004 (*vide* subitem 3.1.1, pág. 28), a polpa e a semente dos frutos foram separadas e espalhadas sobre folhas de papel 'Kraft' para secagem à temperatura ambiente. Após secagem completa, a polpa de fruto foi moída em moinho de facas e pesada em balança analítica, dando origem a um total de 932,10 g de material moído.

As folhas coletadas (Estação Ecológica da UFMG) em maio de 2005 foram separadas dos galhos e a seguir o material resultante foi espalhado sobre papel 'Kraft' para secagem em temperatura ambiente (25 °C). Após secagem, as folhas foram moídas em moinho de martelo e pesadas em balança analítica, dando origem a um total de 1000 g de material moído.

A nomenclatura adotada para identificação dos extratos foi a seguinte: letra E para extrato, H para hexano, A para acetato de etila, M para metanol e letra F para folhas. Portanto, a sigla utilizada foi a seguinte:

EHP – Extrato em hexano de polpa de fruto de *Maytenus salicifolia*,

EAP – Extrato em acetato de etila de polpa de fruto de *Maytenus salicifolia*.

EMP – Extrato em metanol de polpa de fruto de *Maytenus salicifolia*.

EHF – Extrato em hexano de folhas de *Maytenus salicifolia*.

Com a finalidade de identificar os grupos de frações foi usada a letra F para indicar sua origem, ou seja, do extrato em hexano das folhas. As letras C e G seguidas de um número também foram adotadas para indicar a coluna que originou as frações e o grupo ao qual estas pertenciam.

5.2 Análise fitoquímica da polpa de fruto

5.2.1 Preparo dos extratos da polpa de fruto de *Maytenus salicifolia* (BH)

As polpas de frutos de *Maytenus salicifolia*, secas e moídas, foram submetidas à processo de extração contínua em aparelho de *Soxhlet* utilizando como solvente extrator hexano, acetato de etila e metanol. Após filtração e remoção do solvente extrator, por destilação em pressão reduzida seguida de ventilação em chapa aquecida a 50 °C, foram obtidos o extrato em hexano (EHP), o extrato em acetato de etila (EAP) e o extrato em metanol (EMP) (Figuras 40 e 41, pág. 63 e 64).

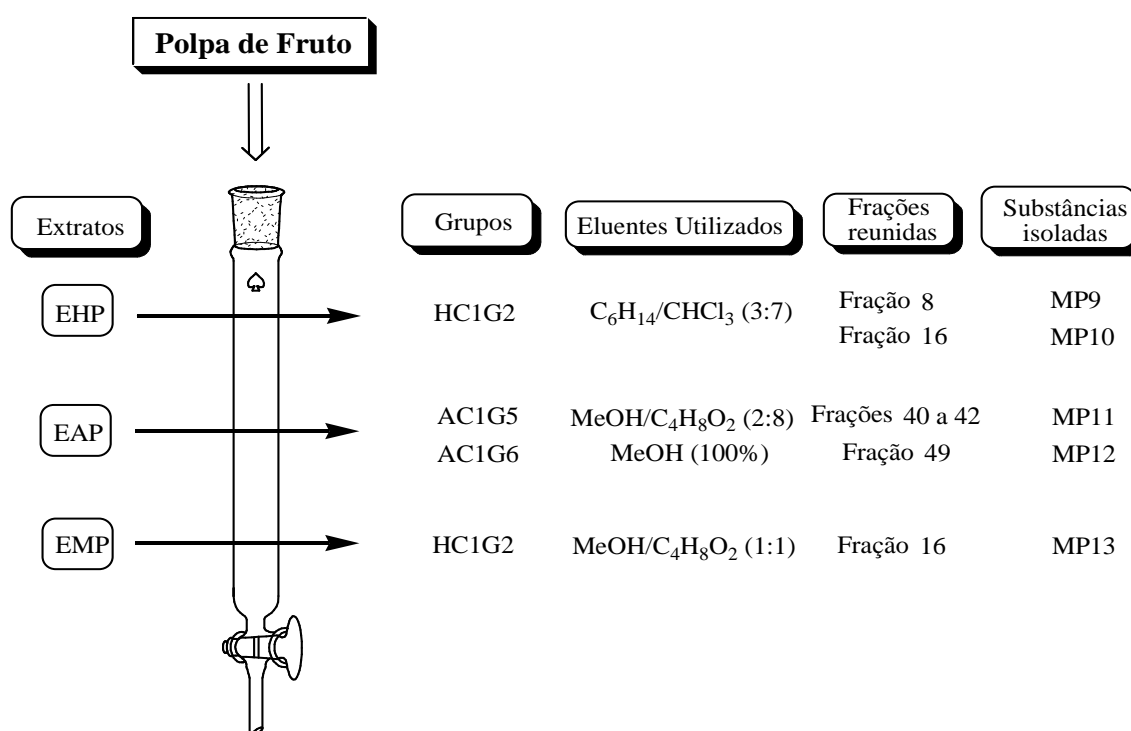


Figura 40: Esquema mostrando o isolamento das substâncias de polpa de fruto de *Maytenus salicifolia* (BH).

5.2.2 Elaboração do extrato em hexano (EHP)

O extrato em hexano obtido de polpa de fruto de *Maytenus salicifolia* (EHP), 3,62 g, foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (120 g) (Coluna C1). Da coluna C1, foram coletadas 21 frações de aproximadamente 100 mL cada, utilizando como eluente hexano e clorofórmio, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Por análise comparativa das frações coletadas, através de cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS) foi possível reunir as frações em grupos para serem estudados. As frações ou grupos com pouca quantidade de material e grande complexidade observada através das análises por CCDS foram descartadas.

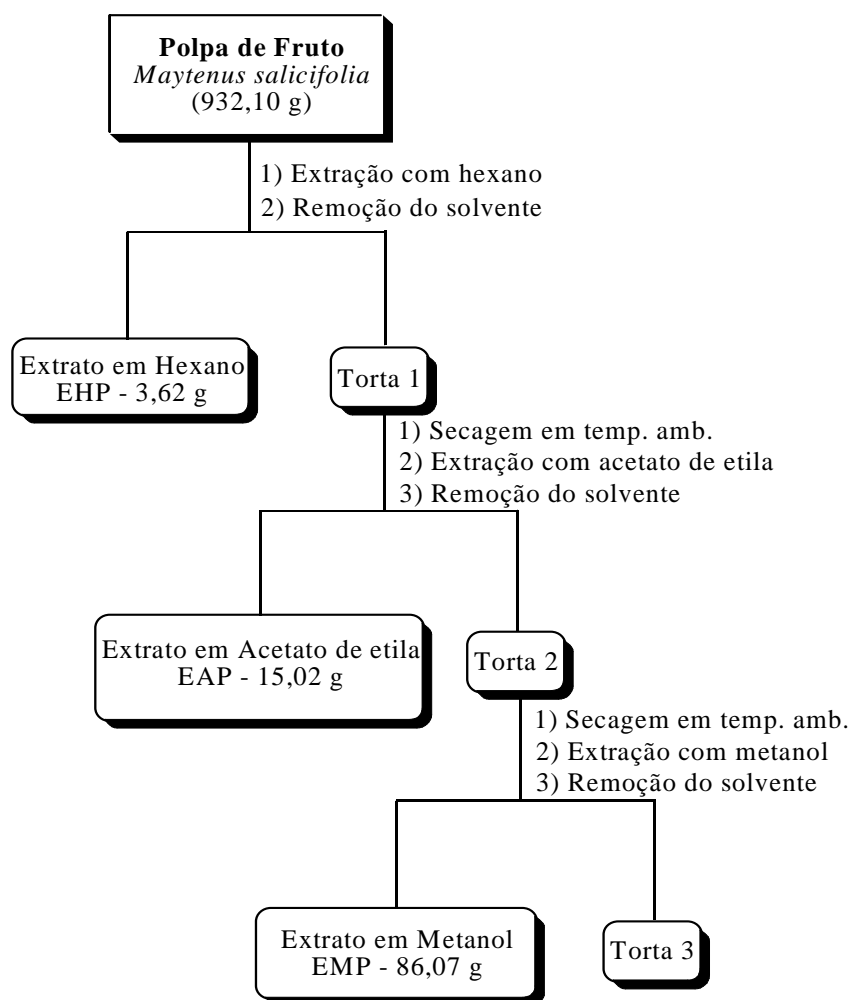


Figura 41: Esquema do processo de obtenção dos extratos de polpa de frutos de *Maytenus salicifolia* Reissek.

Obtiveram-se deste extrato as frações 1 e 2 com quantidade e número de constituintes que permitissem a análise, separação e identificação de compostos. As frações reunidas no grupo HC1G1 foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel (C2), dando origem a 23 frações de 100,0 mL cada que foram reunidas em 10 grupos. Os grupos HC2G1 e HC2G9 foram estudados durante o trabalho de mestrado e levaram a identificação de uma mistura de hidrocarbonetos saturados de cadeia longa e de um triterpeno, o 3 β -hidroxi-D:B-friedo-olean-5-eno (Valladão, 2005).

Grupo HC1G2

Dando continuidade ao estudo fitoquímico de polpa de fruto, o grupo HC1G2 obtido da elaboração do extrato hexânico foi estudado (fração 3, coluna C1).

Este grupo apresentou-se como um sólido branco (196,2 mg) que quando submetido ao teste químico de Liebermann-Burchard apresentou o resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. A análise por CCDS mostrou que o grupo HC1G2 era constituído de pelo menos duas substâncias. Submetendo-o à cromatografia em coluna de sílica gel com a finalidade de isolar as substâncias deste grupo, foram obtidos os sólidos MP9 (4,8 mg) e MP10 (4,4 mg), que se apresentaram como única mancha em CCDS utilizando diferentes sistemas de eluição e de pontos de fusão 213,9-215,8 °C e 147,8-152,3 °C, respectivamente. Posteriormente, foram realizadas análises por espectroscopia de RMN para elucidação estrutural desses constituintes. Constatou-se que MP9 tratava-se do lupeol e que MP10 correspondia ao 3 β -hidroxi-D:B-friedo-olean-5-eno.

Os demais grupos não conduziram ao isolamento de nenhuma substância com grau de pureza adequado para análise e foram descartados.

5.2.3 Elaboração do extrato em acetato de etila (EAP)

O extrato em acetato de etila obtido da torta 1 da polpa de fruto de *Maytenus salicifolia* (EAP), 15,02 g, foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (500 g). Foram coletadas 57 frações de aproximadamente 200 mL cada, utilizando como eluente diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Por análise das frações coletadas, através de cromatografia em camada delgada

de sílica (CCDS) foi possível avaliar a complexidade das frações e reunir aquelas de constituição similar e, conseqüentemente, permitir a seleção das frações ou grupos a serem estudados. As frações e grupos com pouca quantidade de material obtido e com um número elevado de constituintes, observado através das análises por CCDS, foram descartados. A análise dos grupos AC1G1 (fração 9), AC1G2 (frações 11 e 12), AC1G3 (frações 16 a 19) e AC1G4 (fração 43) possibilitou a obtenção de uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa, o 10-hidroxi-decanoato de 1'-acetiloximetil-pentacosa-20'-enila, β -sitosterol e uma mistura de β -sitosterol glicosilado e β -sitostenona (Valladão, 2005). Neste trabalho, foram estudados os grupos: AC1G5 (fração 49) e AC1G6 (frações 25 a 29).

Grupo AC1G5

O material deste grupo se apresentou como um sólido de cor avermelhada (820 mg). A análise por CCDS mostrou que o grupo AC1G5 tratava-se de uma mistura complexa. Foi realizada uma tentativa de separação das substâncias deste grupo submetendo-o à cromatografia em coluna de sílica-gel, sendo recolhido 45 frações de aproximadamente 5,0 mL. As frações de 1 a 14 (32,2 mg) foram reunidas em virtude da similaridade constatada em CCDS e, posteriormente, o material foi lavado com acetona obtendo-se 10,0 mg de um sólido amarelado (MP11) de ponto de fusão 185,5-190,2 °C, e que apresentou uma única mancha ao ser analisado por CCDS. Foi realizada a análise por espectroscopia de RMN para elucidação estrutural da substância, constatando que MP11 tratava-se de um flavonóide glicosilado, a rutina.

Grupo AC1G6

O material deste grupo se apresentou como um sólido de cor avermelhada (812 mg). A análise por cromatoplaça evidenciou constituição complexa desse grupo. Assim, este foi submetido à cromatografia em coluna de sephadex LH - 20. As frações de 25 a 29 foram reunidas (72 mg) e submetidas novamente a cromatografia em coluna de sephadex LH - 20. As frações 9 a 13 (24,0 mg), resultantes da última coluna, apresentou-se como uma substância amarelada que foi, posteriormente, identificada com o código MP12. A estrutura deste composto foi determinada por RMN de ^1H e de ^{13}C possibilitando constatar que se tratava de um flavonóide, a epicatequina.

5.2.4 Elaboração do extrato em metanol (EMP)

Uma alíquota do extrato em metanol obtido de polpa de fruto de *Maytenus salicifolia* (EHP), 2,5 g foi submetida à cromatografia em coluna de “Sephadex” LH - 20 (150 g). Foram coletadas 35 frações de aproximadamente 40 mL cada, utilizando como eluente metanol. Por análise comparativa das frações coletadas, através de cromatografia em camada delgada de sílica-gel (CCDS), foi possível obter o grupo MC1G1 (Fração 16). Os demais grupos foram descartados em função da pouca quantidade de material obtido e sua complexidade observada através das análises por CCDS.

Grupo MC1G1

O material deste grupo apresentou-se como um sólido de cor amarelada (83 mg). Este sólido (MP13) apresentou uma única mancha em CCDS. Realizada a análise por espectroscopia de RMN para elucidação estrutural da substância e obtido o ponto de fusão (185,1-190,5° C), constatou-se que tratava-se do mesmo flavonóide glicosilado do grupo AC1G5, a rutina.

5.3 Análise fitoquímica de folhas

5.3.1 Preparo dos extratos das folhas de *Maytenus salicifolia* (BH)

As folhas de *Maytenus salicifolia*, secas e moídas, foram submetidas à processo de extração contínua em percolador utilizando-se como solvente extrator o hexano. Após filtração e remoção do solvente extrator, por destilação à pressão reduzida seguida de ventilação em chapa aquecida a 50 °C, obteve-se 32,4 g de extrato em hexano de folhas (EHF) (Figura 42, pág. 69).

Grupo FC0G0 (Extrato em hexano, EHF)

Material pastoso de coloração verde escuro, quase preto, foi analisado por CCDS e comparado com amostra de extratos de dois outros grupos, a *M. salicifolia* coletada em Ouro Branco e *M. gonoclada* coletada em Caeté (*vide* item 3, Materiais, métodos e instrumentos, pág. 28). Os resultados obtidos revelaram que o EHF diferia dos extratos das demais populações e, em especial, devido a uma substância com o mesmo fator de retenção (Rf) da friedelina, mas de coloração diferente quando submetido à revelação com vanilina perclórica. Estes dados incentivaram o isolamento deste composto, sua identificação e comparação com as substâncias isoladas nestas duas espécies.

Procedeu-se, então, sucessivas CCDSs preparativas eluidas com clorofórmio puro ou mistura de clorofórmio e hexano (9:1) até a obtenção de aproximadamente 3,0 mg de uma substância amarelada revelada com vanilina perclórica apresentando-se como uma única mancha em cromatoplaça. Identificada com o código MF0, esta apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos que após a análise por espectroscopia de RMN e CG/MS, constatou-se que se tratava do triterpeno friedelina.

5.3.2 Elaboração do extrato em hexano (EHF)

Aproximadamente dois terços do extrato em hexano (20,0 g) obtido de folhas de *Maytenus salicifolia* (EHF), foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (380,0 g). Foram coletadas 125 frações da coluna C-1, de aproximadamente 300 mL cada, utilizando-se como eluente hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas em ordem crescente de polaridade. Por análise comparativa das frações coletadas, através de cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS), foi possível reunir as frações em grupos para uma posterior análise de viabilidade de separação e purificação dos constituintes existentes. Foram trabalhados um total de 55 frações reunidas em nove (9) grupos (Figura 43, pág. 69).

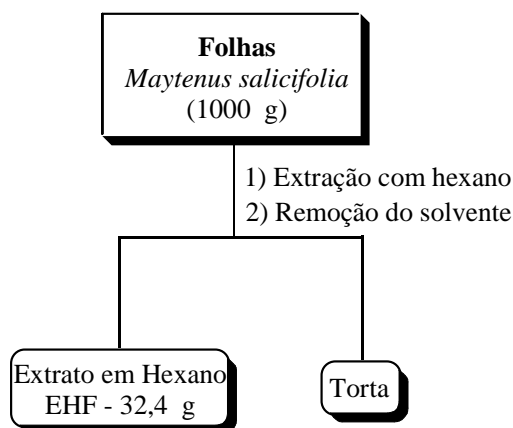


Figura 42: Esquema do processo utilizado para obtenção de extrato em hexano de folhas de *Maytenus salicifolia*.

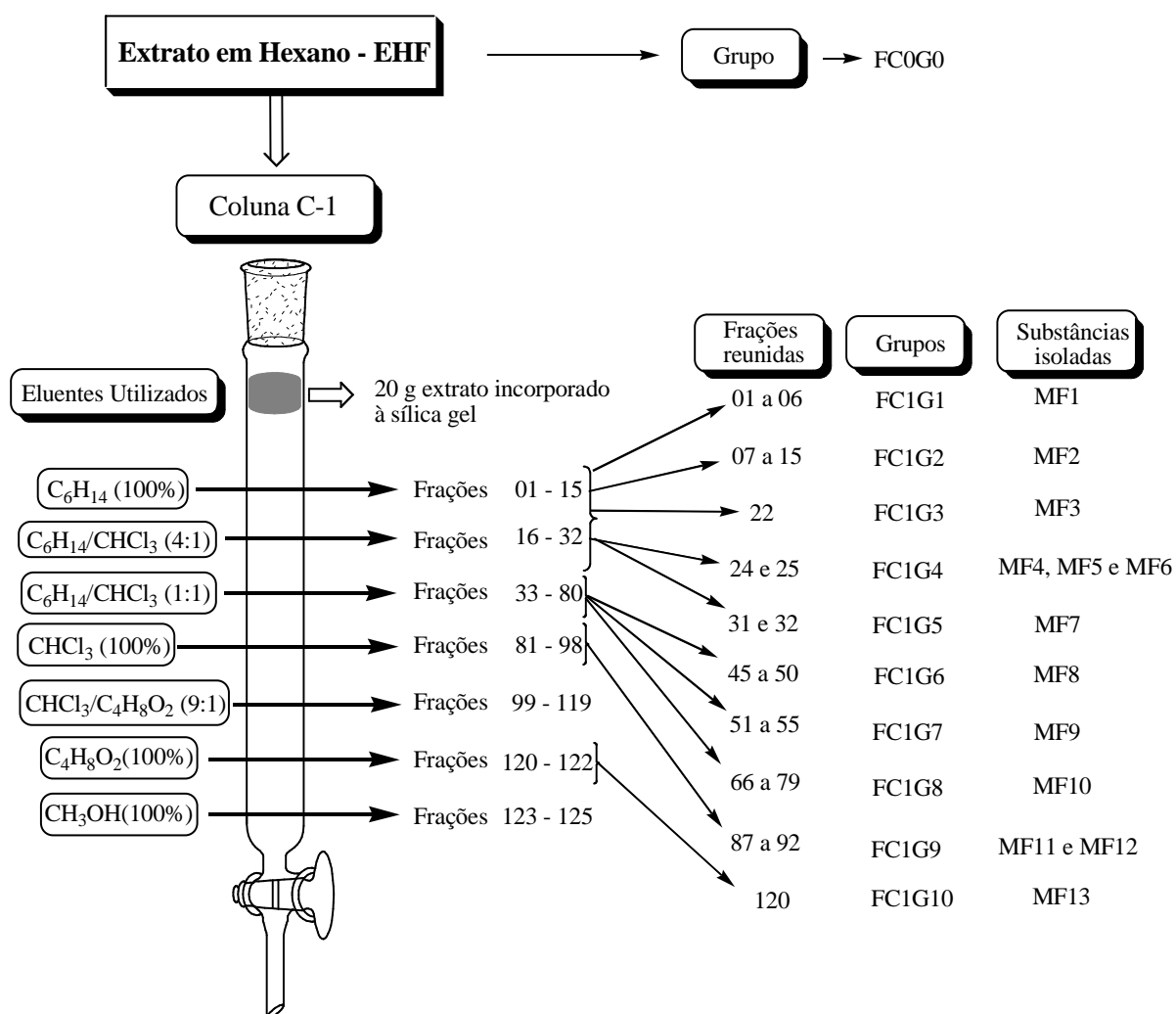


Figura 43: Esquema mostrando o processo de elaboração de EHF através da coluna C-1.

Grupo FC1G1 (Frações 01 a 06)

Apresentou-se como um sólido amorfo branco (MF1, 450,0 mg) de ponto de fusão 60,5 – 63,2 °C. A cromatoplaça de MF1 mostrou apenas uma mancha, mesmo após a mudança da polaridade do sistema de eluição. A análise por espectroscopia no IV e por CG-FID possibilitou sugerir que MF1 se tratava de uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa.

Grupo FC1G2 (Frações 07 a 15)

Este grupo se apresentou como um sólido de coloração amarelada (160 mg). A análise por CCDS mostrou que o grupo FC1G2 apresentava uma constituição complexa. Foi realizada uma tentativa de isolamento de constituintes deste grupo submetendo-o à cromatografia em coluna de sílica-gel sendo recolhidas 78 frações de 5,0 mL. As frações de 5 a 11 foram reunidas em virtude da similaridade verificada em CCDS, obtendo-se 10,0 mg de um óleo translúcido (MF2) que se apresentou como única mancha em CCDS. Após a análise por espectroscopia de RMN, constatou-se que MF2 se tratava de um sesquiterpeno, o tanaceteno.

Grupo FC1G3 (Fração 22)

O material deste grupo apresentou-se como um sólido branco (5,0 mg). A análise por CCDS revelou uma única mancha, mesmo após a mudança do sistema de eluição e a utilização de cromatoplaça de sílica gel com nitrato de prata a 2% p/p. Quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou teste positivo para triterpenos pentacíclicos. Após a análise por RMN para elucidação estrutural da substância, constatou-se que o sólido (MF3) se tratava de uma mistura de triterpenos pentacíclicos esterificados.

Grupo FC1G4 (Frações 24 e 25)

Estas frações apresentaram-se como um sólido esbranquiçado (500,0 mg) constituído por várias substâncias, verificado após análise por CCDS. A mistura foi submetida à cromatografia em coluna de sílica-gel com a finalidade de isolamento de substâncias, foram obtidos 181 frações de 5,0 mL cada. As frações foram reunidas levando-se a dois grupos de frações 59-78 (226,0 mg) e 100-131 (52,5 mg). O grupo 59-78,

nomeado de MF4, apresentou-se como única mancha em CCDS e quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou teste positivo para triterpenos pentacíclicos. Após a análise por espectroscopia de RMN com a finalidade de elucidar a estrutura da substância, constatou-se que MF4 era uma mistura de triterpenos pentacíclicos esterificado. MF4 foi, posteriormente, submetido a separação em coluna de sílica-gel com AgNO_3 (1,0 % p/p). Desta coluna, nas frações 90 a 94, foi possível isolar um composto inédito, o 3β -araquidoiloxi-11-oxo-ursan-12-eno (MF5), elucidado através de análises de RMN (1D e 2D). O outro grupo, 100-131, foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (85 frações de 5,0 mL) que permitiu a obtenção de 15,4 mg (frações 40-85) de um sólido branco (MF6). Este também, quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos e as análises de RMN indicaram que MF6 se tratava de um triterpeno pentacíclico esterificado, 3β -esteariloxi-D:C-friedoleanan-7-eno.

Grupo FC1G5 (Fração 31 a 32)

Este material apresentou-se com uma graxa translúcida ligeiramente amarelada (856,0 mg) que por CCDS revelou uma mistura complexa de substâncias. Este material foi, então, cromatografado em coluna de sílica-gel. Foram obtidas 165 frações de 5,0 mL, sendo que as frações de 49 a 53 foram analisadas por CCDS e agrupadas em consequência da similaridade, rendendo cerca de 4,0 mg de uma substância com aspecto de graxa translúcida. Identificado com o código MF7, esta substância apresentou-se como única mancha em CCDS e quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. Após a análise por RMN e a comparação com dados da literatura, constatou-se que MF7 tratava-se de 3β -esteariloxi-lup-20(29)-eno.

Grupo FC1G6 (Fração 45 a 50)

O material deste grupo se apresentou como um sólido de cor branca (1,10 g). A análise por CCDS mostrou que o grupo FC1G5 era constituído por várias substâncias. Esta mistura foi, então, submetida a cromatografia em coluna de sílica-gel com a finalidade de se isolar substâncias deste grupo obtendo-se 60 frações de 5,0 mL cada. As frações 23 e 24 foram reunidas devido à similaridade averiguada por CCDS, obtendo-se 7,0 mg de um

sólido esbranquiçado. Esse constituinte (MF8) apresentou-se como única mancha em CCDS e quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. Após a análise por espectroscopia de RMN, constatou-se que MF8 se tratava de uma mistura de triterpenos pentacíclicos.

Grupo FC1G7 (Fração 51 a 55)

As frações deste grupo apresentaram-se como um sólido amarelado (498,2 mg) que por análise em CCDS revelou a presença de vários constituintes. A mistura foi submetida a cromatografia em coluna de sílica-gel com a intenção de isolar seus constituintes (64 frações de 3,0 mL). O procedimento permitiu reunir as frações 23 a 25 perfazendo cerca de 32,0 mg de uma substância esbranquiçada que submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. Nomeado de MF9, este grupo foi analisado por espectroscopia de RMN, verificando que MF9 se tratava de um triterpeno da classe dos lupanos, o lupeol.

Grupo FC1G8 (Fração 66 a 79)

O grupo FC1G8 se apresentou como um sólido de coloração alaranjada (387,9 mg). A análise por CCDS mostrou que o grupo FC1G8 apresentava uma constituição complexa. O material foi lavado com acetona obtendo-se dois sólidos, um branco e outro alaranjado. Optou-se em trabalhar com sólido branco (312,2 mg) que foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (121 frações de 5,0 mL) e descartar o sólido alaranjado por apresentar-se como uma mistura muito complexa em cromatoplaça e em virtude da quantidade insuficiente para possibilitar o isolamento de algum constituinte (62,7 mg). O fracionamento desse sólido esbranquiçado possibilitou a obtenção de uma substância branca (30,6 mg), identificada com o código MF10 (frações 21 a 30). Esse apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para triterpenos pentacíclicos. Após a análise por espectroscopia de RMN, constatou-se que MF10 se tratava de uma mistura de triterpenos pentacíclicos.

Grupo FC1G9 (Fração 87 a 92)

Este grupo de consistência sólida e coloração marrom (40,0 mg) apresentou várias manchas em cromatoplaça. Neste caso, em função dos espaçamentos entre as manchas, optou-se por submeter esse grupo à CCDS preparativa utilizando CHCl_3 como eluente. O procedimento permitiu separar um sólido branco (MF11) que apresentou teste de Liebermann-Burchard positivo para esteróides. Constatou-se na análise por CG/MS e RMN de ^1H e de ^{13}C que MF11 se tratava de um esteróide, o β -sitosterol. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas possibilitou, além da confirmação da identidade de MF11, a identificação de um contaminante em MF11, o esteróide campesterol, denominado de MF12.

Grupo FC1G10 (Fração 120)

Este material apresentou-se como um sólido de cor verde escuro (1,83 g), após análise por CCDS, constatou-se que se tratava de uma mistura de várias substâncias. A mistura foi submetida à cromatografia em coluna de florisil, com a finalidade de promover a limpeza (*cleanup*) desta fração do pigmento esverdeado (clorofila) e separar substâncias (173 frações de 5,0 mL). O procedimento cromatográfico permitiu a obtenção de um grupo de frações 46-91 (282 mg) que após lavagem com acetona forneceu 47,0 mg de um sólido branco, nomeado de MF13, e uma mistura de substâncias de cor amarelada. O sólido branco apresentou-se como única mancha em CCDS e quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. A análise por espectroscopia de RMN confirmou que MF13 se tratava de um triterpeno pentacíclico, o $1\beta,3\alpha$ -di-hidroxi-D:C-friedoleanan-7-eno.

5.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas

5.4.1 MP9 e MF9: 3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno (lupeol)

Dois sólidos de coloração esbranquiçada, com ponto de fusão de 213,9-215,8 °C e 213,8-215,5 °C, obtidos do extrato em hexano de polpa de frutos (MP9) e do extrato em hexano de folhas (MF9), respectivamente, quando submetidos ao teste de Liebermann-Burchard se comportaram como triterpenos pentacíclicos.

Estes dois sólidos apresentaram espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C coincidentes, constatando-se que se tratava de um mesmo composto.

A análise por RMN de ^1H (Figura 44, pág. 75) constatou a presença de sete sinais (simpletos) localizados em: δ_{H} 0,76; 0,78; 0,83; 0,94; 1,03; 1,25 e 1,68. Estes sinais foram associados a sete grupos metila presentes na estrutura do composto. O espectro apresentou um multiplete em torno de δ_{H} 3,20 que indicou a presença de hidrogênio carbinólico e dois simpletos em δ_{H} 4,56 e 4,68 característicos de hidrogênios vinílicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45, pág. 75) apresentou sinais em δ_{C} 150,99 (C) e 109,33 (CH_2) que comparados com os valores da literatura (Mahato, 1994), permitiram concluir que MP9 se tratava de um triterpeno pentacíclico da classe lupano.

A comprovação de que MP9 se tratava de 3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno e a atribuição dos demais sinais de carbono, se deu por comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de MP9 com dados da literatura (Souza, 2001) referidos na Tabela 2 (pág. 76).

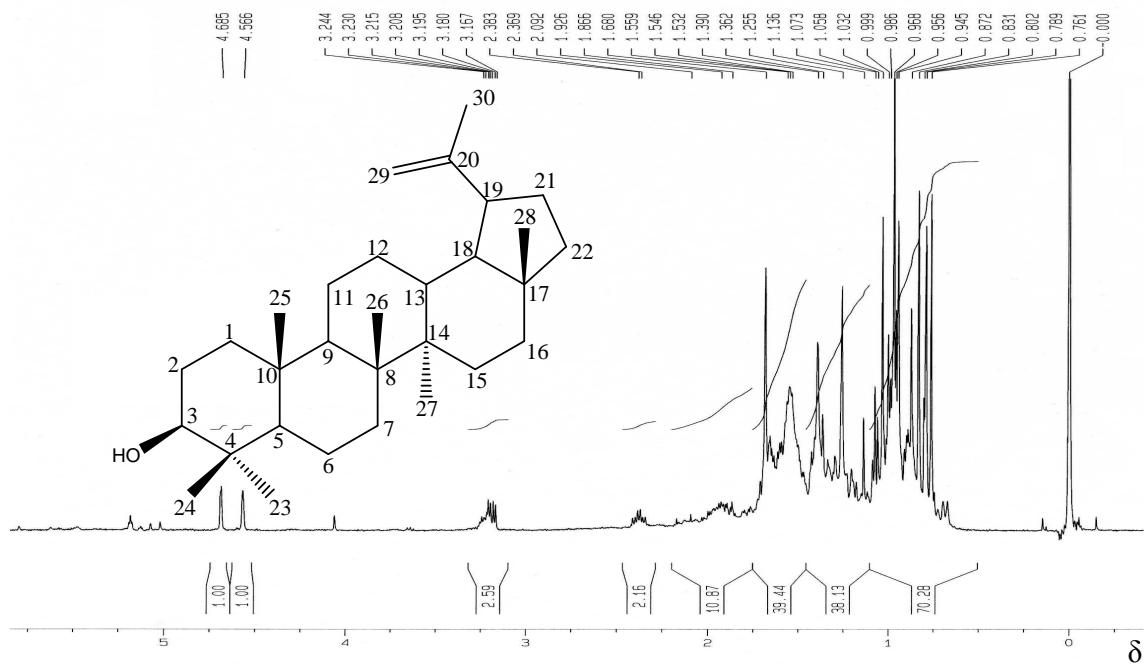


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H de MP9 e MF9 (CDCl_3 , 400 MHz).

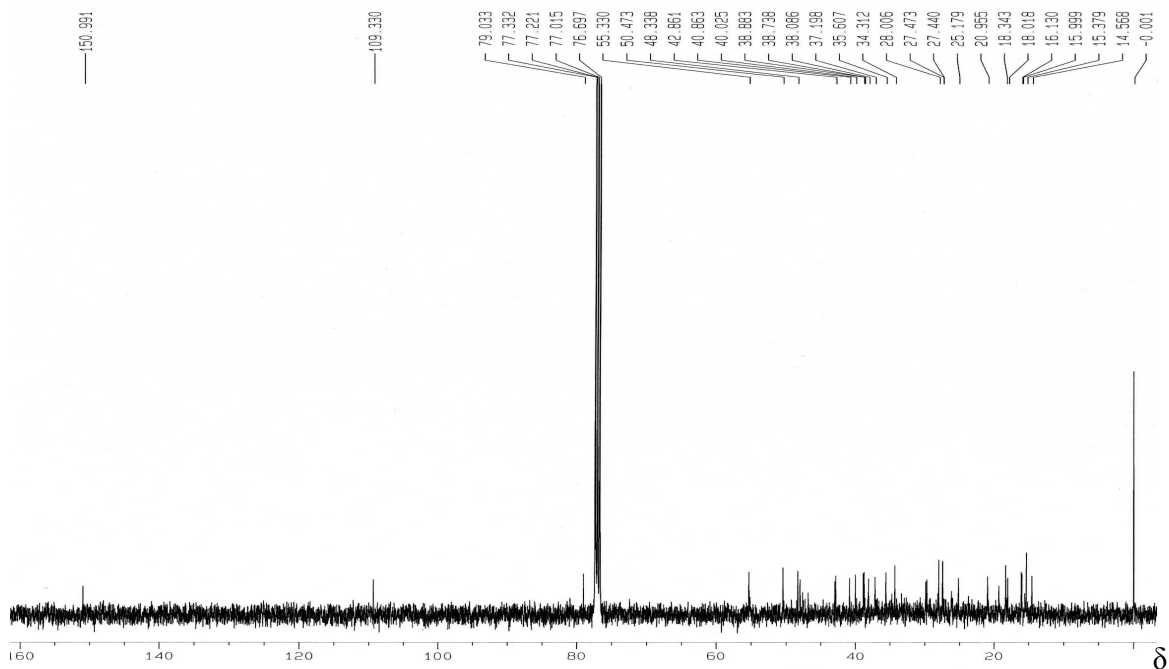


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C de MP9 e MF9 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 2: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MP9 (3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno) com dados da literatura para o Lupeol (Souza, 2001)

C _n	MP9	Lupeol	C _n	MP9	Lupeol
1	38,74	38,7	16	35,61	35,5
2	25,18	25,1	17	42,86	43,0
3	79,03	78,9	18	48,33	48,2
4	38,88	38,8	19	48,01	47,9
5	55,33	55,3	20	150,99	150,9
6	18,34	18,3	21	29,88	29,8
7	34,31	34,2	22	40,02	40,0
8	40,86	40,8	23	28,00	28,0
9	50,47	50,4	24	15,38	15,4
10	37,20	37,1	25	16,00	16,1
11	20,95	20,9	26	16,13	15,9
12	26,19	27,4	27	14,57	14,5
13	38,09	38,0	28	18,01	18,0
14	42,86	42,8	29	109,33	109,3
15	27,47	27,4	30	19,32	19,3

5.4.2 MP10: 3 β -hidroxi-D:B-friedo-olean-5-eno (Glutinol)

MP10 foi obtido da fração 3 da coluna C-1 do extrato em hexano de polpa de frutos, apresentando-se como um sólido branco de ponto de fusão 147,6-152,3 °C. Este composto quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard, apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 46, pág. 77) apresentou vários sinais entre δ_H 0,87 a 1,90, referentes à hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos, um sinal em δ_H 3,49, atribuído ao hidrogênio carbinólico e um sinal em δ_H 5,65 de hidrogênio olefínico.

A análise de RMN de ¹³C (Figura 47, pág.78) revelou a presença de 30 sinais de carbono. Quando comparados com dados da literatura (Valladão, 2005), os sinais atribuídos aos carbonos insaturados (δ_C 122,08 e 141,64) assemelhavam-se a valores de insaturação localizadas entre os carbonos 5 e 6, associado ao sinal em δ_C 76,35 (CH) atribuído à C3, além da confrontação dos demais sinais de carbono, possibilitou afirmar que a substância isolada se tratava do triterpeno 3 β -hidroxi-D:B-friedo-olean-5-eno. Os sinais de carbono e os valores da literatura estão discriminados na Tabela 3, pág. 77 (Agrawal, 1992).

Tabela 3: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MP10 (3 β -hidroxi-D:B-friedo-olean-5-eno) com dados da literatura para o Glutinol (Agrawal, 1992)

C _n	MP10	Glutinol	C _n	MP10	Glutinol
1	18,23	18,3	16	35,10	35,2
2	27,83	27,9	17	30,11	30,2
3	76,35	76,4	18	43,09	43,3
4	40,84	40,9	19	35,10	35,2
5	141,64	141,7	20	28,26	28,3
6	122,08	122,1	21	32,10	32,2
7	23,66	23,7	22	38,98	39,0
8	47,46	47,5	23	28,96	29,0
9	34,87	34,9	24	25,46	25,5
10	49,72	49,8	25	16,21	16,3
11	33,14	33,2	26	18,42	18,5
12	30,37	30,5	27	19,63	19,7
13	37,86	37,9	28	32,40	32,5
14	39,33	39,4	29	32,05	32,1
15	34,63	34,7	30	34,53	34,6

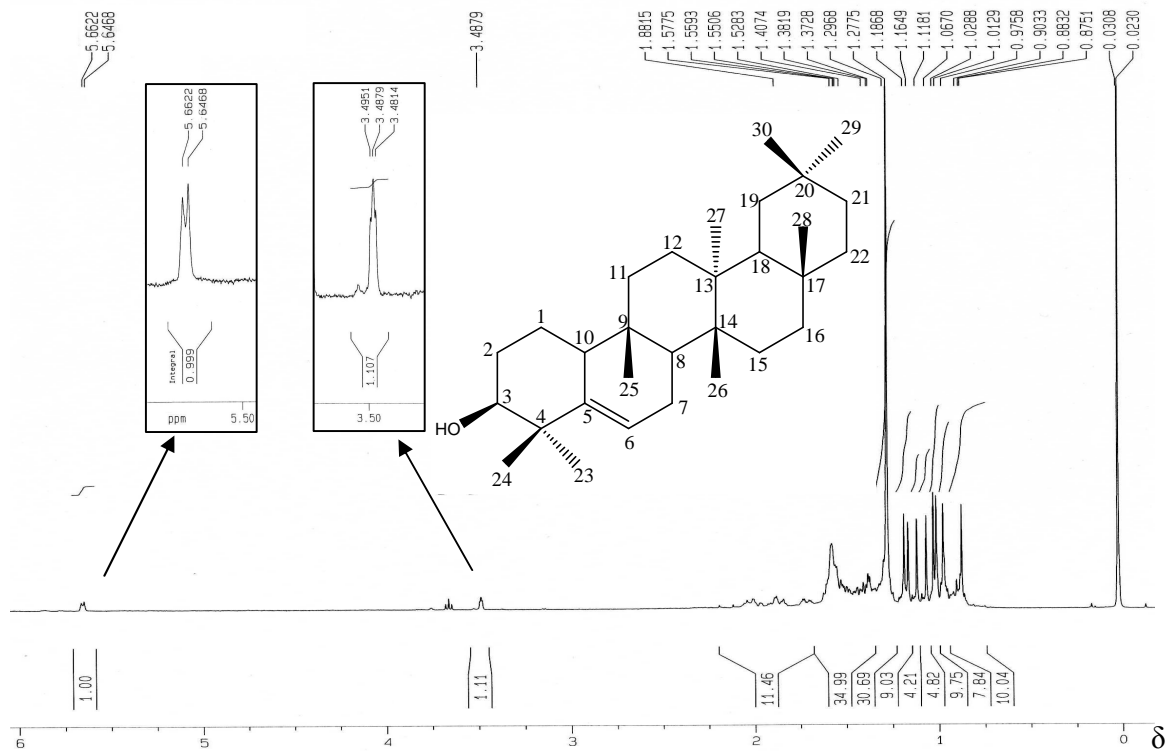


Figura 46: Espectro de RMN de ¹H de MP10 (CDCl₃, 400 MHz).

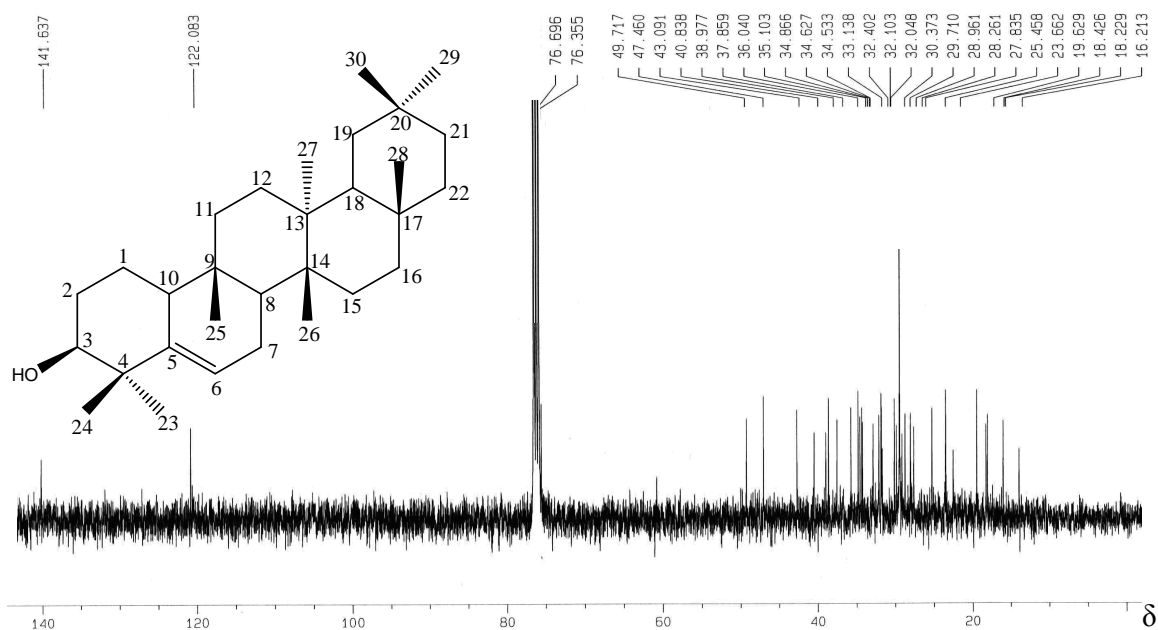


Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C de MP10 (CDCl_3 , 100 MHz).

5.4.3 MP11 E MP13: Rutina (Quercetina-3-O-rutenosídeo)

MP11 e MP13 apresentaram-se como sólidos de coloração amarelada, com pontos de fusão $185,5\text{-}190,2^\circ\text{C}$ e $185,1\text{-}190,5^\circ\text{C}$, isolados do extrato acetato-etílico e do extrato metanólico das folhas, respectivamente. A comparação dos espectros na região do infravermelho e de RMN de ^1H e de ^{13}C revelou valores coincidentes, mostrando que se tratava de um mesmo composto.

A análise do espectro na região do infravermelho (Figura 48, pág. 80) revelou a presença de bandas de absorção em 2908 , 1501 , 1455 , 1360 e 967 cm^{-1} que sugeriram uma natureza mista, alifática e aromática, para MP11. A banda intensa em 3336 cm^{-1} indicou presença de grupos hidroxila e a banda de absorção em 1651 cm^{-1} indicou a presença de carbonila conjugada com dupla ligação.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 49 e 50, pág. 81) apresentou sinais em δ_{H} 3,25, 3,31, 3,35, 3,39, 3,41, 3,43, 3,46, 3,54 (dd, $J=3,4; 9,5\text{ Hz}$), 3,63 (dd, $J=2,0; 3,4\text{ Hz}$) e 3,80 (d, $J=9,5\text{ Hz}$), que sugeriram a presença de dez hidrogênios carbinólicos. Os sinais em δ_{H} 4,52 (d, $J=1,3\text{ Hz}$) e δ_{H} 5,11 (d, $J=7,6\text{ Hz}$) indicaram a presença de hidrogênios olefínicos

ou de carbonos di-oxigenados. Quatro sinais em δ_H 6,21 (d, $J=2,1$ Hz), 6,40 (d, $J=2,1$ Hz), 6,87 (d, $J=8,4$ Hz), 7,62 (dd, $J=2,1$; 8,4 Hz) e 7,67 (d, $J=2,1$ Hz) mostraram que MP11 possuía hidrogênios de carbonos em hibridação sp^2 de sistema aromático e/ou alquenos conjugados.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 51, pág. 82) juntamente com dados do subespectro DEPT-135 (Figura 51, pág. 82) sugeriu a presença de dez carbonos não hidrogenados responsáveis pelos sinais em δ_C 179,58, 166,23, 163,15, 159,49, 158,68, 149,96, 146,00, 135,78, 123,29 e em δ_C 105,78. O sinal em δ_C 179,58 deve corresponder a uma carbonila de cetona conjugada com dupla ligação. Os sinais em δ_C 18,03 e 68,71 revelaram a existência de um grupo metila e um metileno, respectivamente.

Comparando os dados obtidos com os da literatura (Pastene, 2001) pôde-se concluir que MP11 e MP13 se tratavam de um flavonóide da classe dos flavonóis glicosilados: a rutina. MP11 foi submetido à análise de RMN-2D.

O mapa de contornos HSQC (Figuras 53 e 54, pág. 83) permitiu associar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios. Numa análise preliminar foi possível correlacionar os valores do carbono C1'' (δ_C 104,87, δ_H 5,11), C5'' (δ_C 77,39, δ_H 3,35), C6'' (δ_C 68,71, δ_H 3,84 e 3,41) e C1''' (δ_C 102,57, δ_H 4,52) e C6''' (δ_C 18,02, δ_H 1,12) aos seus respectivos hidrogênios.

No mapa de contornos HMBC (Figuras 55, 56, 57 e 58, pág. 84 e 85) foi observado que o sinal do hidrogênio H1'' (δ_H 5,11) correlacionou com o sinal em δ_C 135,78 (C3) mostrando que a parte glicosídica está ligada pelo carbono C1'' ao carbono C3 da quercetina (aglicona). O carbono C2 correlacionou com os hidrogênios H2' e H6' evidenciando que o anel B está ligado no carbono 2 (anel C). O acoplamento (J^3) do carbono de C10 com os hidrogênios H6 e H8, conjuntamente com a correlação entre C5/H6, C7/H6 e C7/H8 evidenciaram as posições dos hidrogênios e dos carbonos não hidrogenados. Na porção glicona, os acoplamentos de C6''/H1''' e C1'''/H6''^{a,b} revelaram a posição da ligação entre os compostos glicose e ramnose, o que foi confirmado pelo acoplamento entre C4''/H6'' que justifica a posição sugerida para C6''. A correlação de C5'''/H6''', associada aos demais dados supracitados, mostrou que a proposta de um dissacarídeo constituído por glicose e ramnose é a mais provável.

A Tabela 4, pág. 86 apresenta os dados de RMN de ^{13}C de MP11 comparados com os da literatura para a rutina (Pastene, 2001).

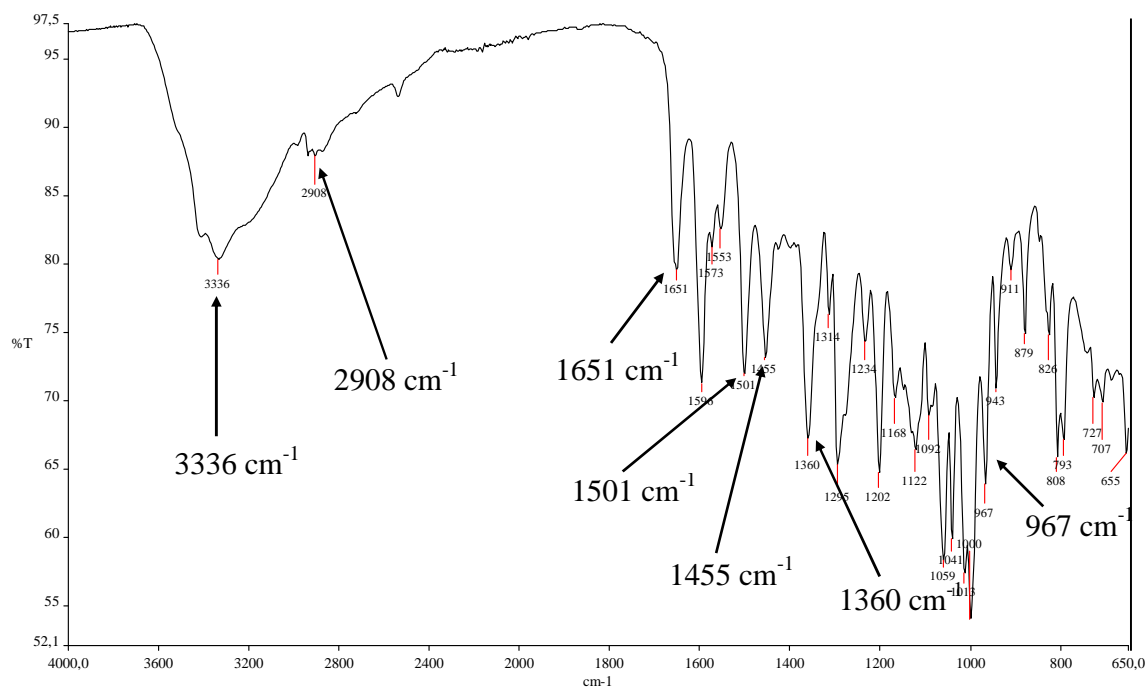
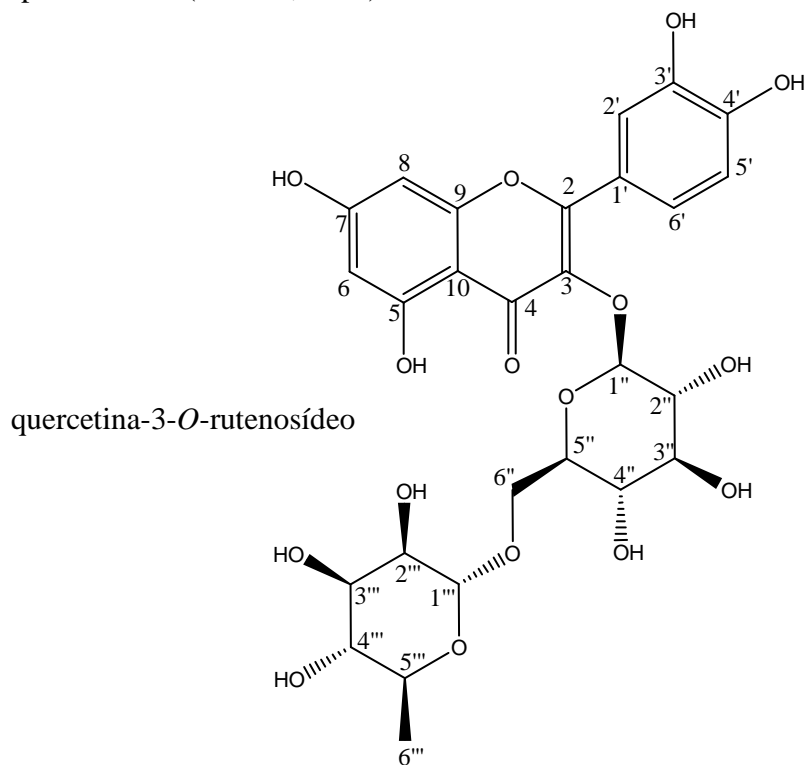


Figura 48: Espectro na região do infravermelho de MP11 (cm^{-1}).

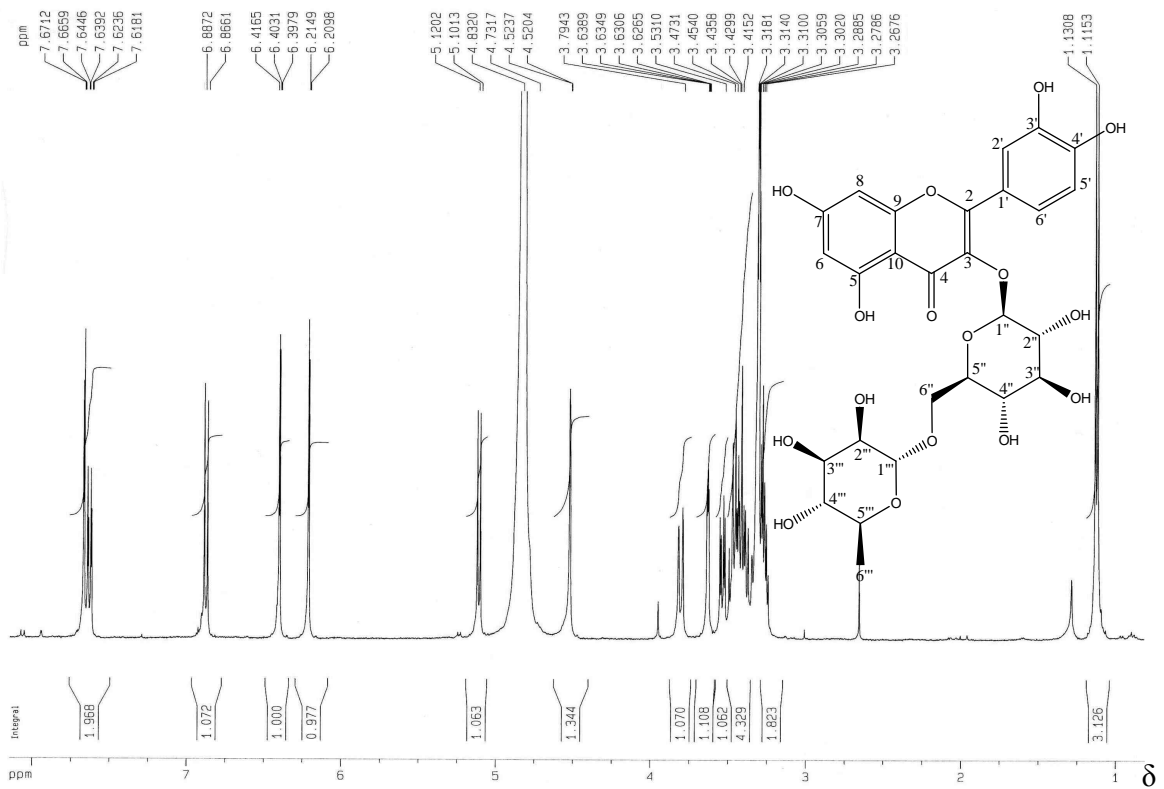


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H de MP11 (D_2O , 400 MHz).

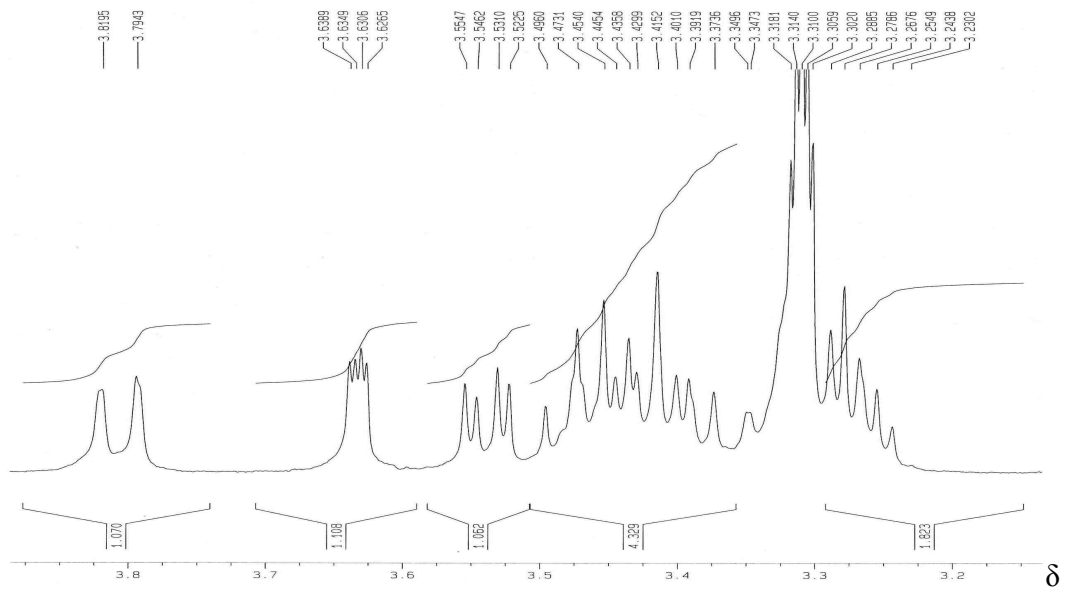


Figura 50: Seção expandida do espectro de RMN de ^1H de MP11 (D_2O , 400 MHz): δ_{H} 3,2 a 3,9.



Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C de MP11 (D_2O , 100 MHz).

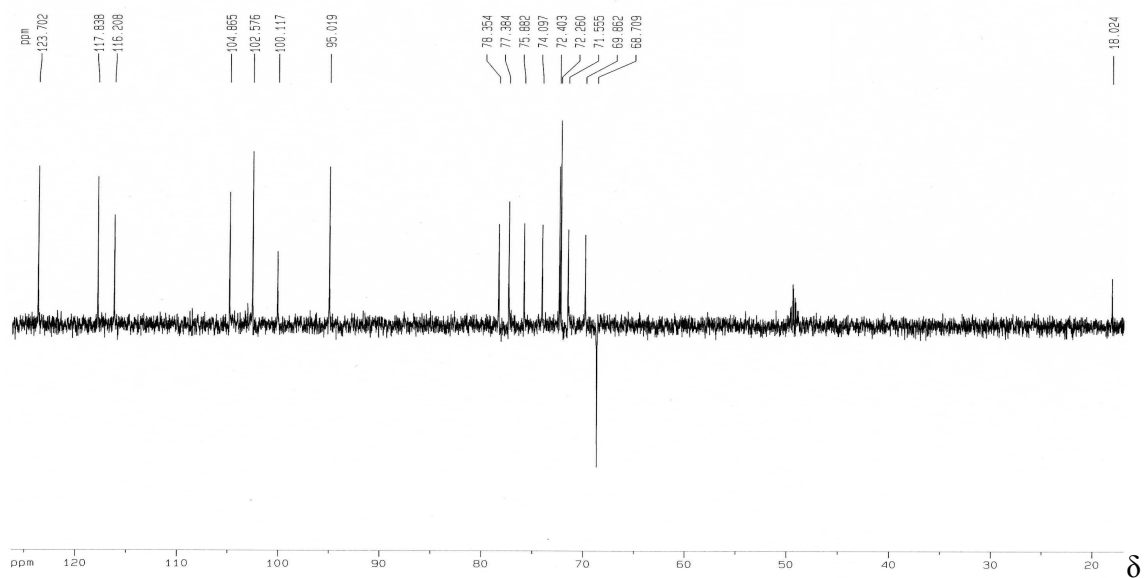


Figura 52: Subespectro DEPT-135 de MP11 (D_2O , 100 MHz).

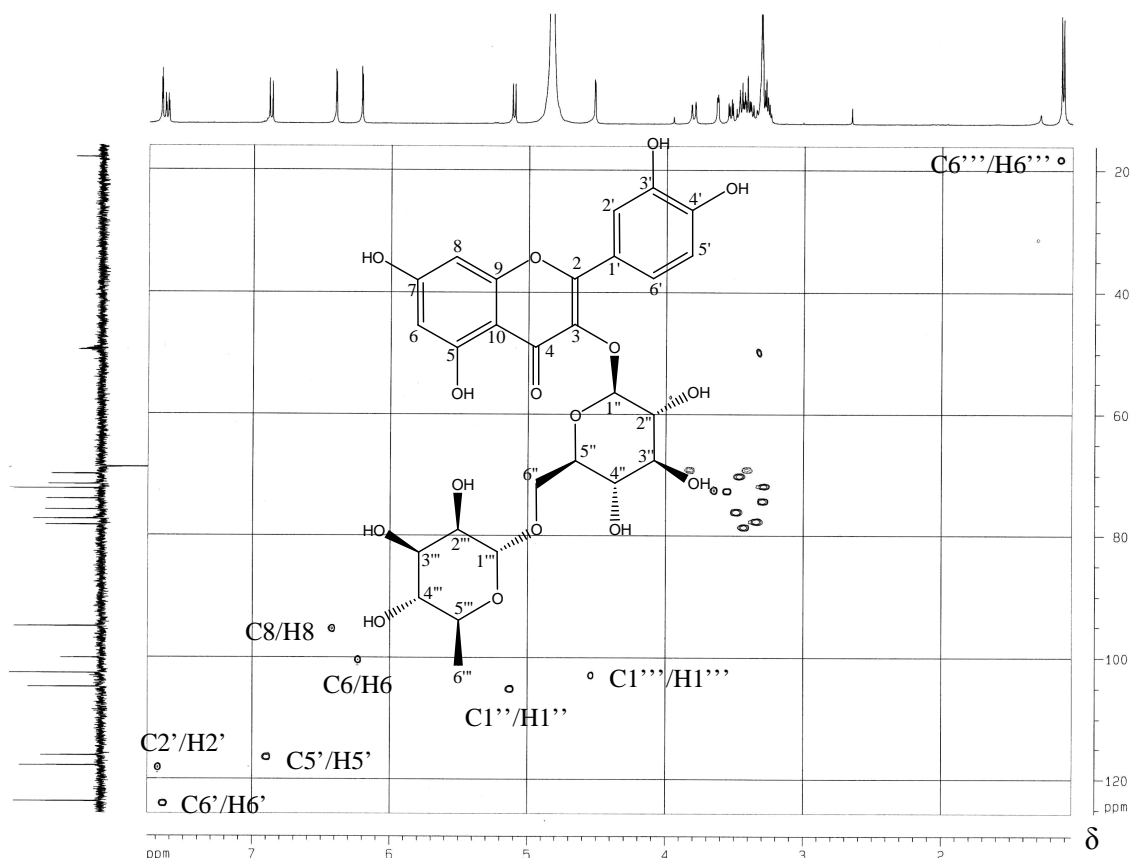


Figura 53: Mapa de contornos HSQC de MP11 (D₂O, 100 MHz).

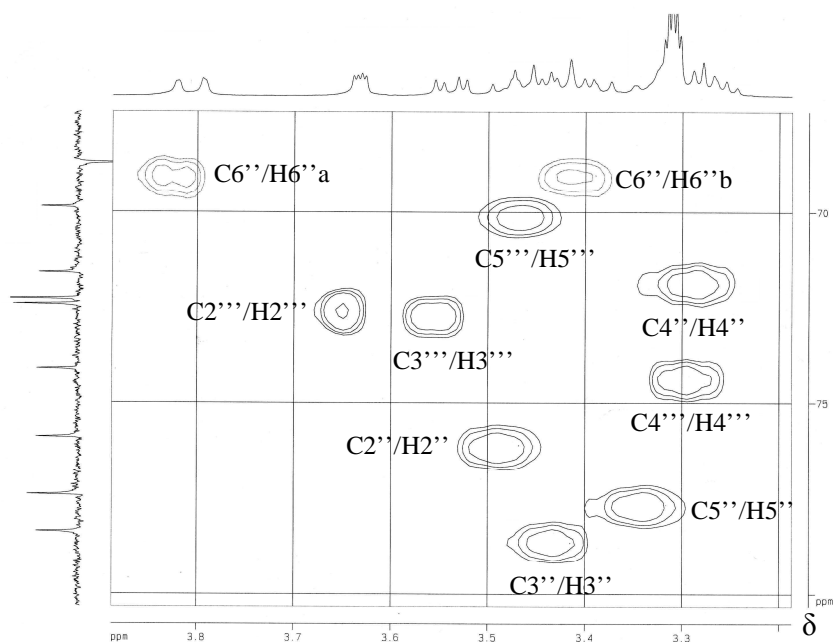


Figura 54: Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MP11 (D₂O, 100 MHz): δ_c 65 a 80.

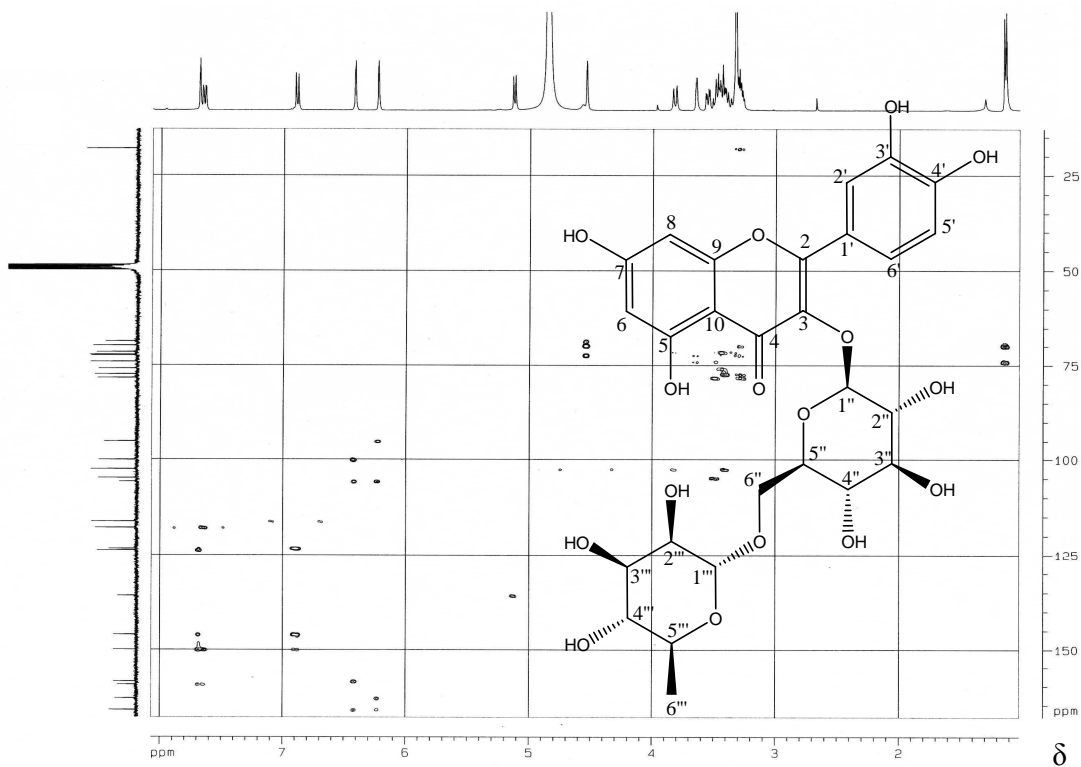


Figura 55: Mapa de contornos HMBC de MP11 (D₂O, 100 MHz).

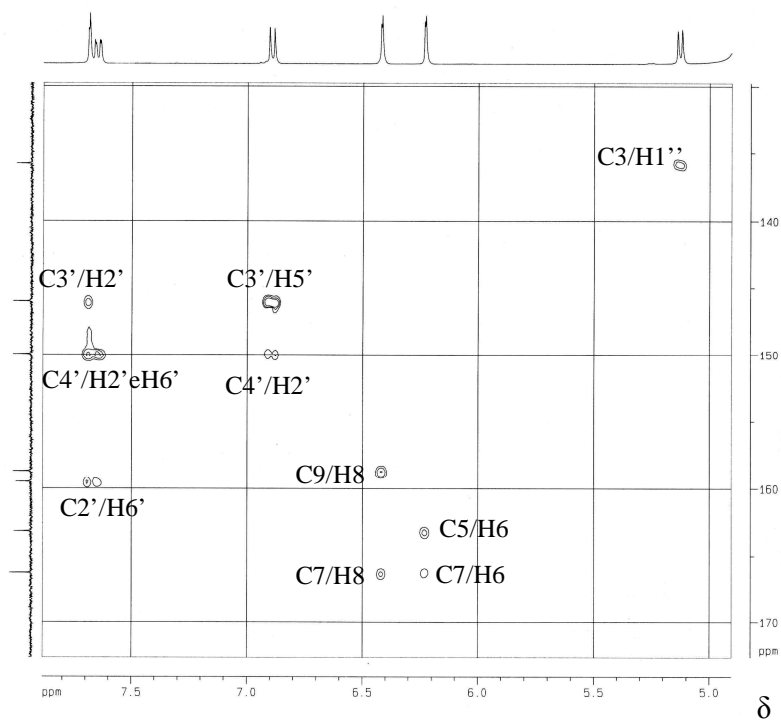


Figura 56: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MP11 (D₂O, 100 MHz): δ_c 130 a 170.

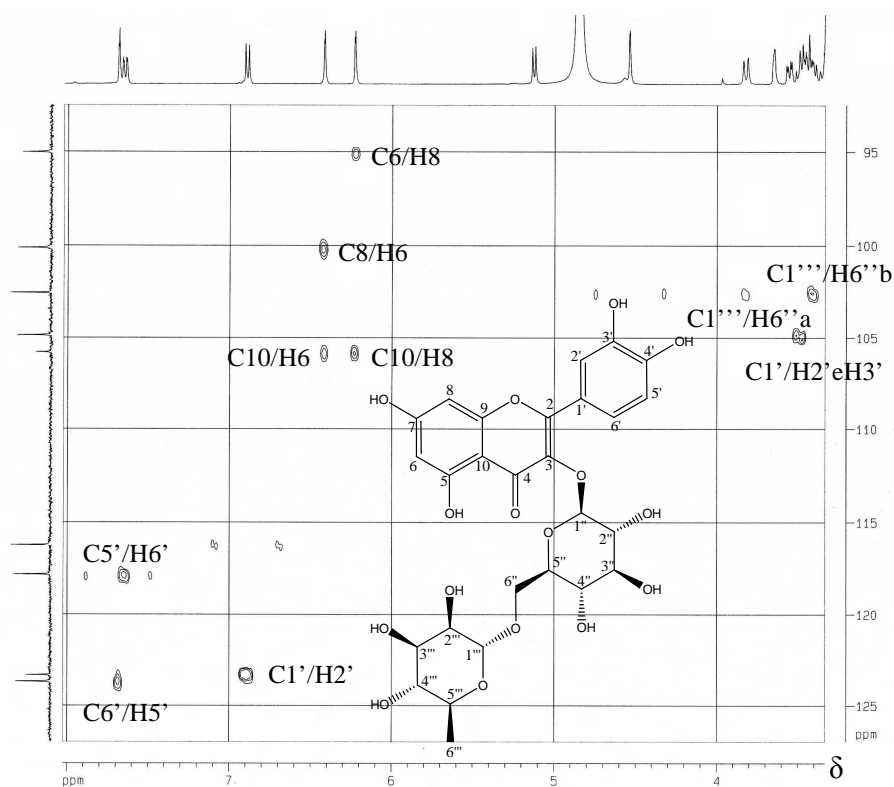


Figura 57: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MP11(D₂O, 100 MHz): δ_c 90 a 125.

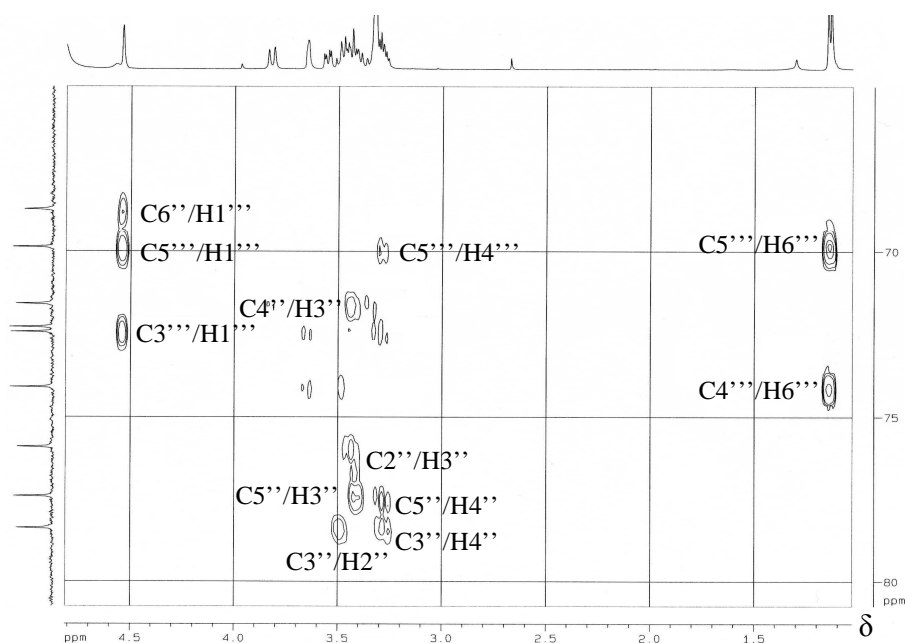


Figura 58: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MP11 (D₂O, 100 MHz): δ_c 60 a 80.

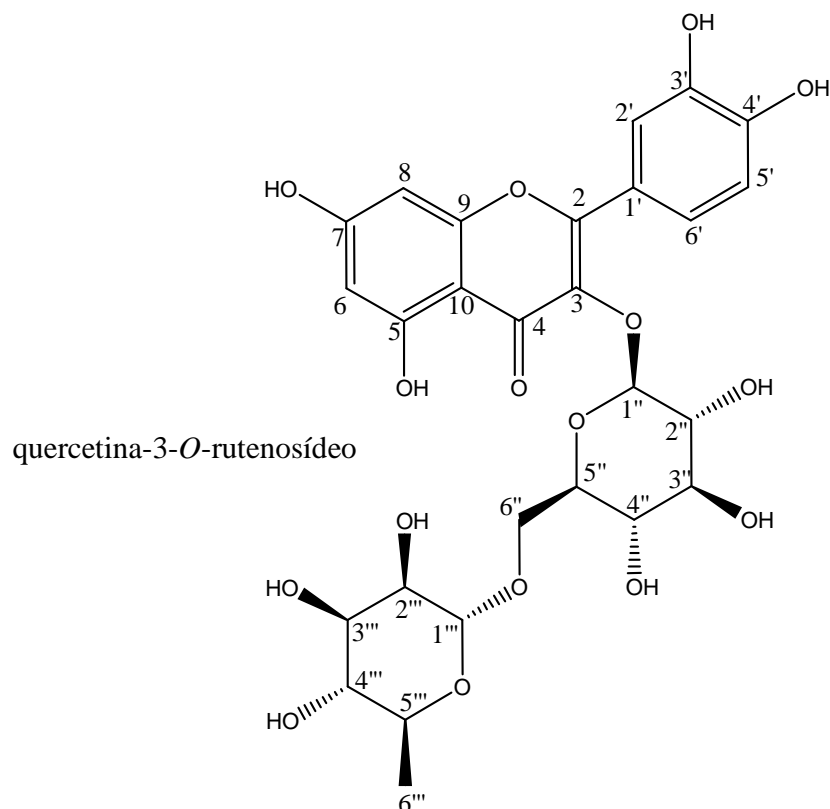


Tabela 4: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio de MP11 (quercetina-3-*O*-rutenosídeo) com dados da literatura para a rutina em CD₃OD (SBDS, 1997; Pastene, 2001)

C _n (H _n)	MP11	Rutina	C _n (H _n)	MP11	Rutina
2	159,49	158,36	6'	123,70 (7,62)	123,57 (7,60)
3	135,78	135,61	1''	104,87 (5,11)	104,76 (5,10)
4	179,58	179,00	2''	75,89 (3,49)	73,93 (3,27)
5	163,15	162,74	3''	78,36 (3,44)	78,14 (3,45)
6	100,12 (6,21)	99,95 (6,18)	4''	71,57 (3,29)	72,02 (3,31)
7	166,23	165,83	5''	77,39 (3,35)	78,14 (3,28)
8	95,02 (6,40)	94,89 (6,38)	6''	68,71 (3,84/3,41)	68,52 (3,79/3,56)
9	158,68	159,25	1'''	102,57 (4,52)	102,33 (4,52)
10	105,79	105,90	2'''	72,26 (3,65)	71,37 (3,52)
1'	123,30	123,12	3'''	72,41 (3,55)	72,26 (3,47)
2'	117,84 (7,62)	117,73 (7,60)	4'''	74,10 (3,30)	77,12 (3,42)
3'	146,00	145,67	5'''	69,86 (3,47)	69,63 (3,35)
4'	149,96	149,67	6'''	18,03 (1,12)	17,82 (1,15)
5'	116,21 (6,87)	116,05 (6,84)	-	-	-

5.4.4 MP12: Epicatequina ((2R-cis)-3,3',4',5,7-pentahidroxi flavana)

Isolado a partir das frações 25 a 29 do extrato em acetato de etila das folhas, MP12 apresentou-se como um sólido de coloração amarelado de ponto de fusão 232,6-235,9 °C.

A análise do espectro na região do infravermelho (Figura 59, pág. 88) revelou a presença de bandas de absorção em 2963, 1497, 1451, 1357 e 968 cm^{-1} indicando a presença de uma estrutura química com características alifáticas e aromáticas para MP12. Além de uma banda intensa em 3377 cm^{-1} que indicou presença de grupos hidroxila.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 60, pág. 88) apresentou um duplete em δ_{H} 6,97 (H-2'; $J= 2,0$ Hz), um duplete duplo em δ_{H} 6,80 (H-6'; $J= 2,0$ e 8,0 Hz); um duplete em δ_{H} 6,77 (H-5'; $J= 8,4$ Hz); um duplete em δ_{H} 5,94 (H-6; $J= 2,4$ Hz); um duplete em δ_{H} 5,91 (H-8; $J= 2,4$ Hz); um simpleto em δ_{H} 4,82 (H-2); um multiplete em δ_{H} 4,17 (H-3); um duplete duplo em δ_{H} 2,85 (H-4b; $J= 4,8$ e 16,8 Hz) e um duplete duplo em δ_{H} 2,73 (H-4a; $J= 2,8$ e 16,8 Hz). Estes sinais foram comparados com os obtidos para a rutina, o que sugeriu propor um esqueleto similar à parte aglicona deste flavonóide.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 61, pág. 89) juntamente com dados do subespectro DEPT-135 (Figura 62, pág. 89) mostrou a presença de quinze carbonos, sendo um metilênico, sete metínicos e sete não hidrogenados, corroborando com a proposta sugerida pela análise dos espectros de RMN de ^1H .

Comparando os dados obtidos com os da literatura (Tanaka, 2005), chegou-se à conclusão que MP12 se tratava de um flavonóide da classe dos flavan-3-ol: a epicatequina.

O mapa de contornos HSQC (Figura 63, pág. 90) permitiu correlacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios. Numa análise preliminar foi possível correlacionar o valor do deslocamento químico do carbono C2 (δ_{C} 80,03, δ_{H} 4,82), C3 (δ_{C} 67,63, δ_{H} 4,17), C4 (δ_{C} 29,40 δ_{H} 2,85 e 2,73) e C2' (δ_{C} 115,08, δ_{H} 6,97) com os respectivos hidrogênios.

No mapa de contornos HMBC (Figura 64, pág. 90) foi observado que o sinal de C2 (δ_{C} 80,03) correlacionou com o sinal em δ_{H} 6,97 (H2') e δ_{H} 6,80 (H6') mostrando que o anel B está ligado no anel C pelo carbono C2. O acoplamento (J^3) de C9 com H8 e a correlação entre C5/H6 sugeriram as posições dos hidrogênios e dos carbonos não

hidrogenados no anel A. Os acoplamentos de C3'/H2', C4'/H5'-H6', C2'/H6' e C6'/H2' evidenciaram as posições das hidroxilas no anel B, o que foi apoiado pelo deslocamento químico dos respectivos carbonos.

A Tabela 5, pág. 91, apresenta os dados de RMN de ^{13}C de MP12 comparados com os da literatura para a epicatequina (Tanaka, 2005).

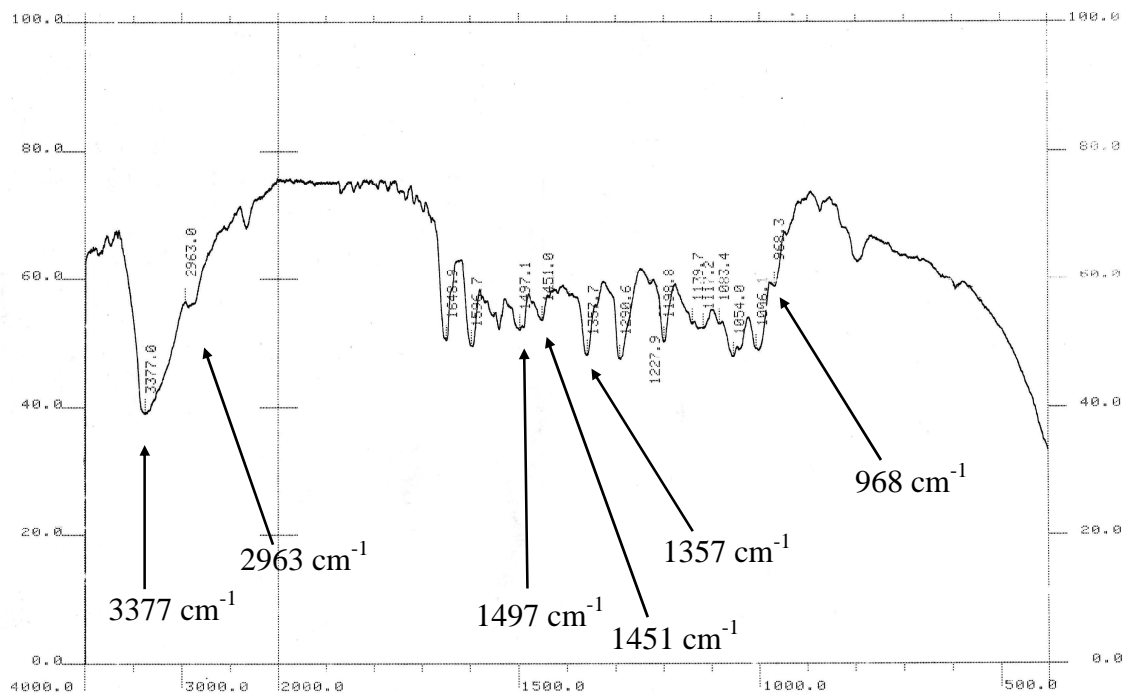


Figura 59: Espectro na região do infravermelho de MP12 (KBr, cm^{-1}).

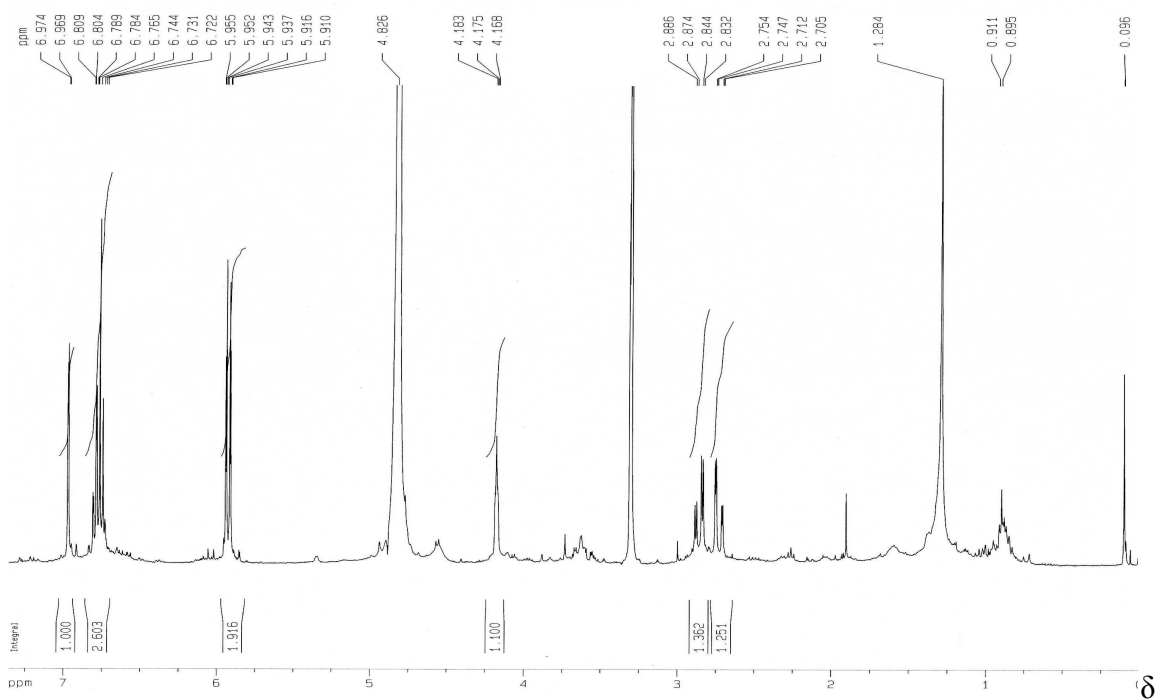


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H de MP12 (CD_3OD , 400MHz).

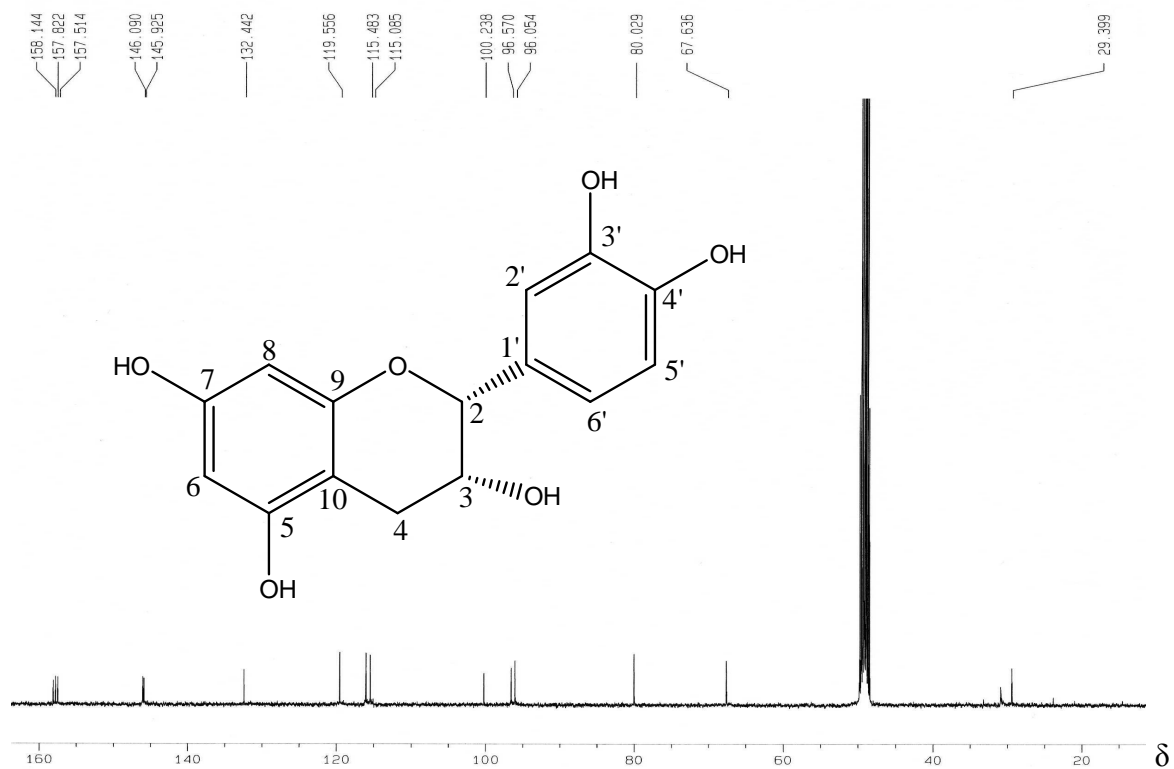


Figura 61: Espectro de RMN de ^{13}C de MP12 (CD_3OD , 100 MHz).

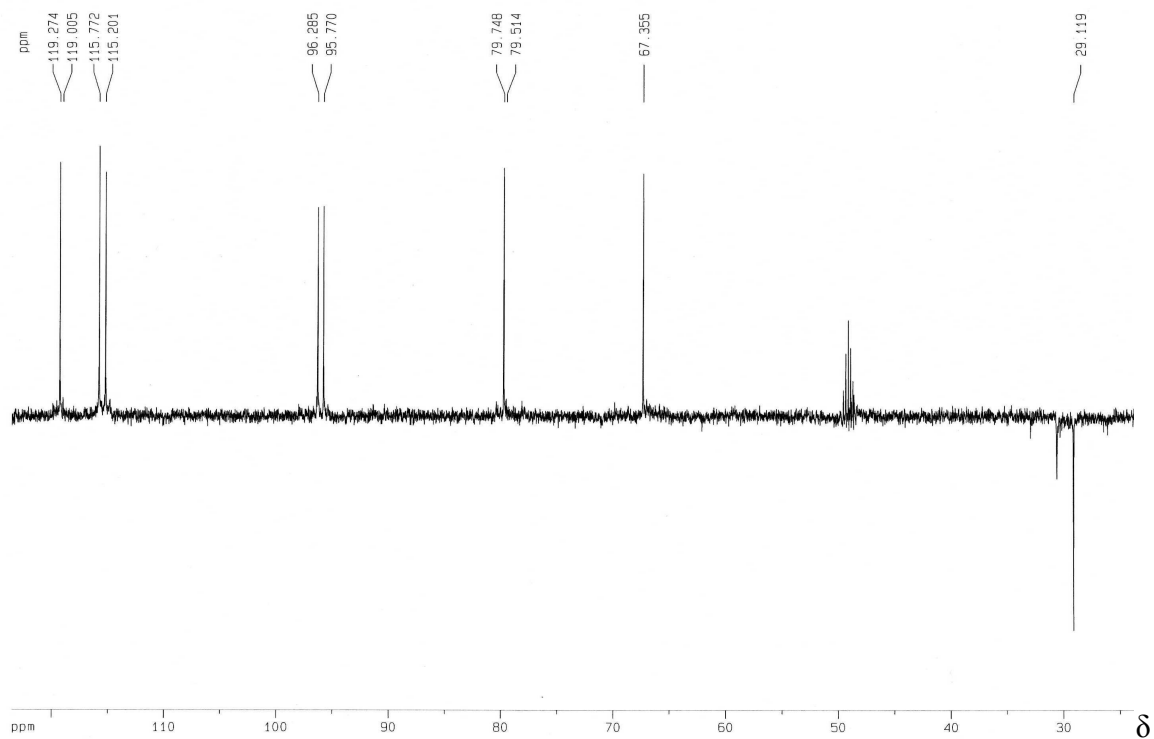


Figura 62: Subespectro DEPT-135 de MP12 (CD_3OD , 100 MHz).

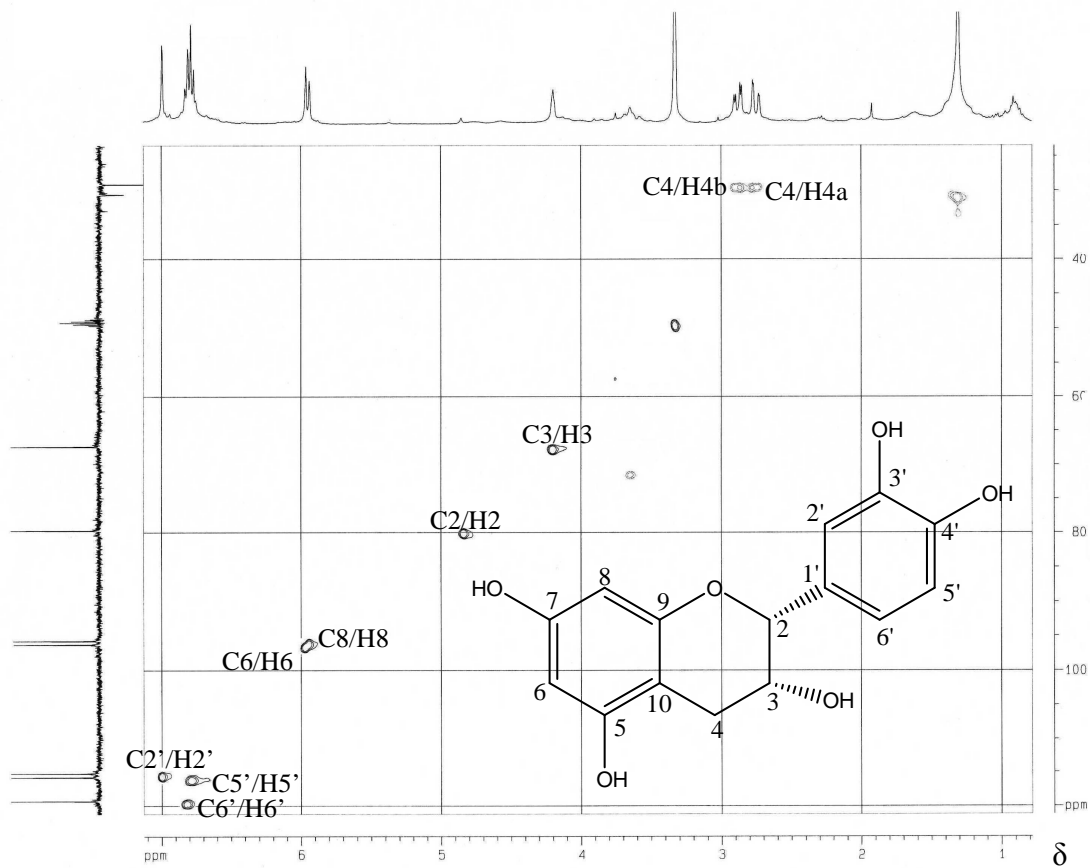


Figura 63: Mapa de contornos HSQC de MP12 (CD₃OD, 100 MHz).

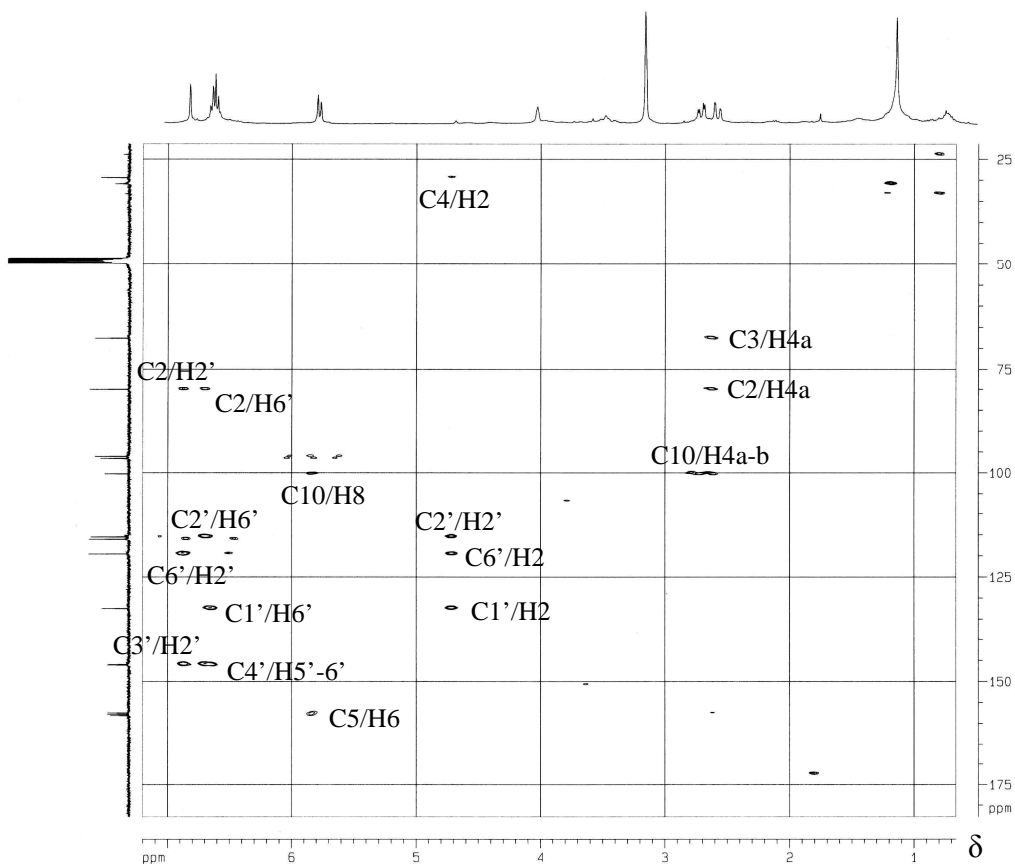


Figura 64: Mapa de contornos HMBC de MP12 (CD₃OD, 100 MHz).

Tabela 5: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênios de MP12 (epicatequina) com dados da literatura (SBDS, 1997; Tanaka, 2005)

$C_n (H_n)$	MP11	Epicatequina	$C_n (H_n)$	MP11	Epicatequina
2	80,03 (4,82)	79,9 (4,81)	10	100,24	100,2
3	67,64 (4,18)	67,5 (4,17)	1'	132,44	132,4
4	29,40 (2,86/2,73)	29,2 (2,86/2,72)	2'	115,09 (6,97)	115,4 (6,97)
5	157,51	157,9	3'	145,92	146,0
6	96,57 (5,94)	96,5 (5,93)	4'	146,09	146,1
7	158,14	158,2	5'	115,48 (6,76)	116,0 (6,75)
8	96,05 (5,91)	96,0 (5,91)	6'	119,55 (6,80)	119,5 (6,79)
9	157,82	157,6	-		

5.4.5 MF0: Friedelan-3-ona (Friedelina)

Apresentou-se como um pó ligeiramente amarelado, de ponto de fusão 259-263 °C e teste Liebermann Burchard positivo para triterpeno pentacíclico.

O espectro de RMN de 1H (Figura 65, pág. 92) apresentou sinais múltiplos na região entre δ_H 0,80 e 2,00 correspondentes a hidrogênios alifáticos. Neste faixa observa-se a presença de sinais referentes a 8 metilas, δ_H 0,73, 0,87, 0,88 (d, $J=6,4$ Hz), 0,95, 1,00, 1,01, 1,05 e 1,18 (Figura 65, pág. 92).

Através de análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 66, pág. 92) foram detectados 30 sinais de carbono. O subespectro DEPT-135 (Figura 67, pág. 93) permitiu classificar estes sinais de carbono como quatro metínicos, oito metílicos, sendo uma em δ_c 6,83, onze metilênicos, uma carbonila (δ_c 213,20) e 6 carbonos não hidrogenados, sugerindo a estrutura de um oxo-triterpeno da classe dos friedelanos.

A aquisição do espectro de massas por CG/EM (Figura 68, pág. 93) e a comparação destes com dados da literatura referentes à triterpenos pentacíclicos associado aos dados de RMN de 1H e ^{13}C possibilitou confirmar que MF0 se tratava da friedelina. Não foi possível identificar o contaminante amarelado presente em MF0, mesmo com a realização de outras análises, tais como, espectrofotometria na região do UV/Vis e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, focadas neste objetivo.

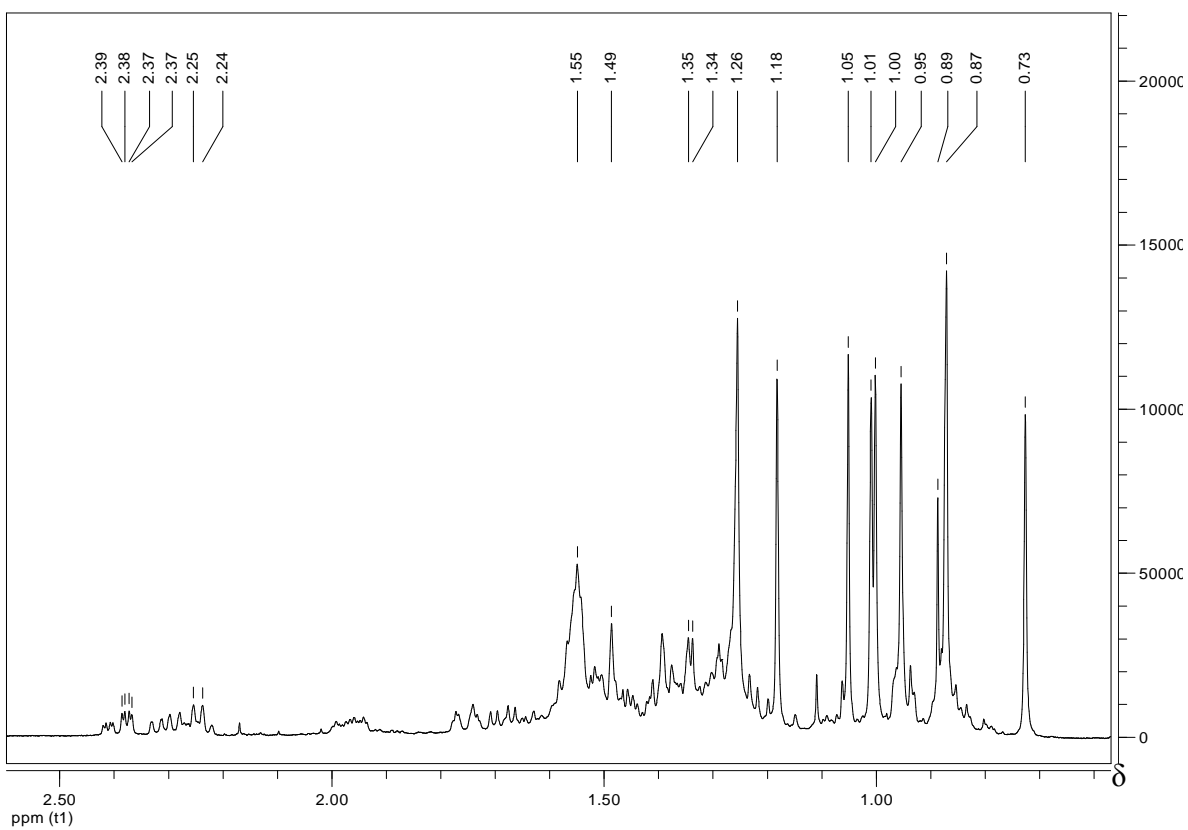


Figura 65: Expansão do espectro de RMN de ^1H de MF0 (CDCl_3 , 400MHz), região entre δ_{H} 0,20 e 2,50.

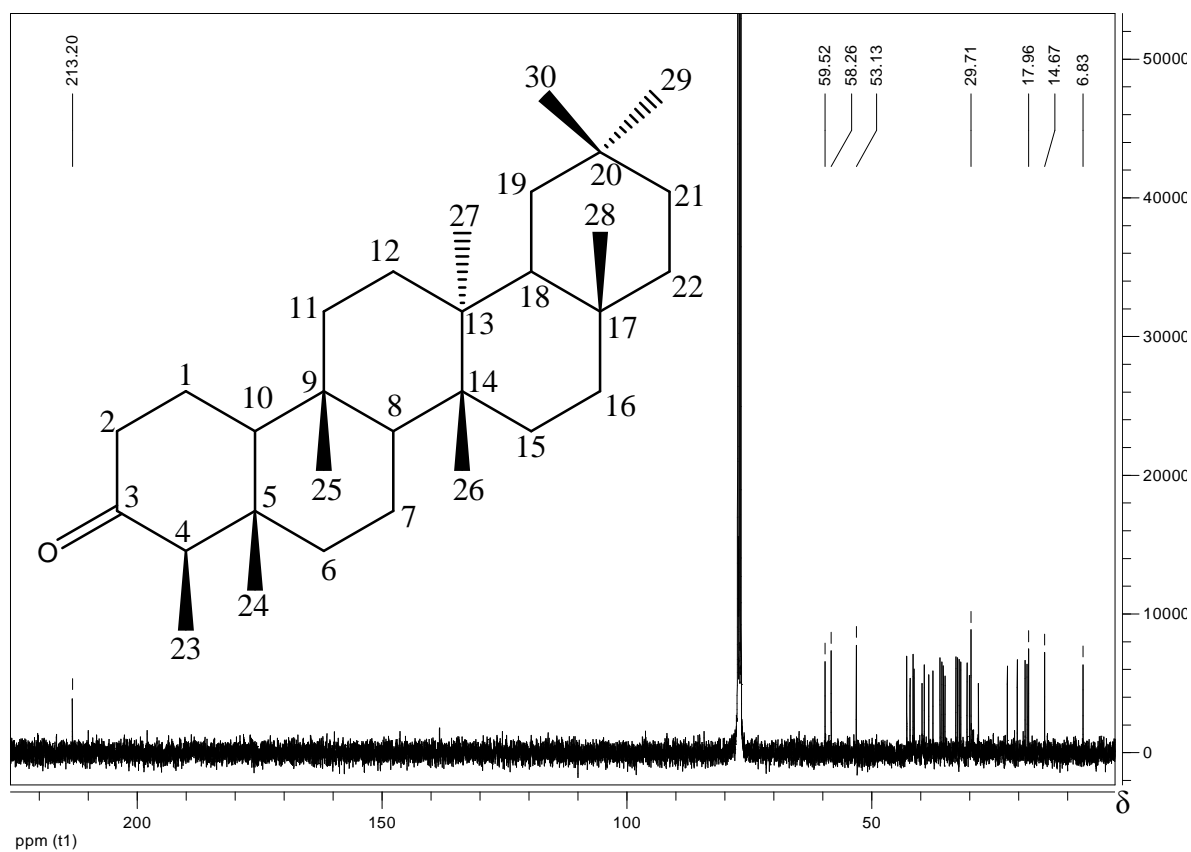


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C de MF0 (CDCl_3 , 100 MHz).

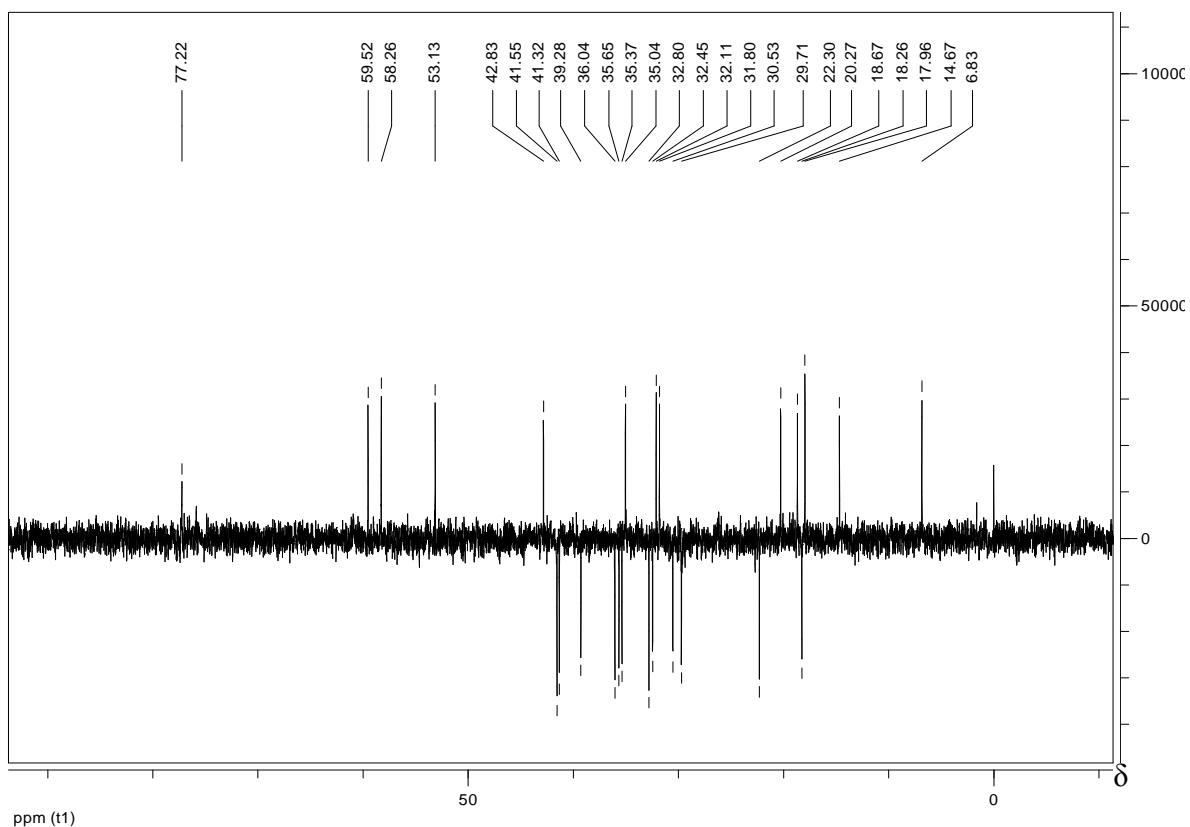


Figura 67: Subespectro DEPT-135 de MF0 (CDCl₃, 100 MHz).

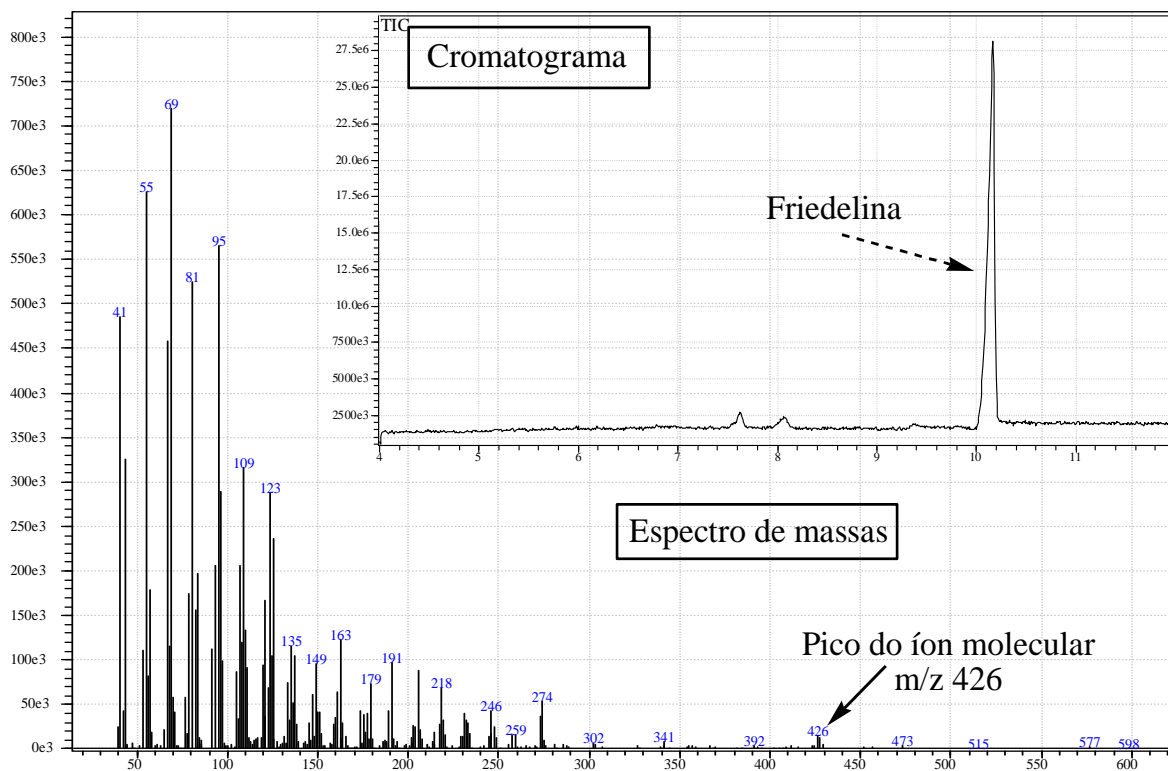


Figura 68: Cromatograma e espectro de Massas obtido de MF0 em análise por CG/EM.

5.4.6 MF1: Mistura de hidrocarbonetos

MF1, obtido a partir do extrato em hexano das folhas, apresentou-se como um sólido branco de ponto de fusão 60,5 – 63,2 °C. A análise por espectroscopia no IV evidenciou bandas características de absorção de grupos metilenos (2847 e 2922 cm^{-1}) e de ligação C-H (1458 cm^{-1}), sugerindo natureza alifática e tratar-se de hidrocarboneto (Figura 69). O cromatograma obtido em CG-FID, comparado com padrão de hidrocarbonetos, permitiu identificar MF1 como sendo uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa, constituída principalmente por 18% de hentriacontano ($n = 31$) e 63% de tritriacontano ($n = 33$) (Figura 70).

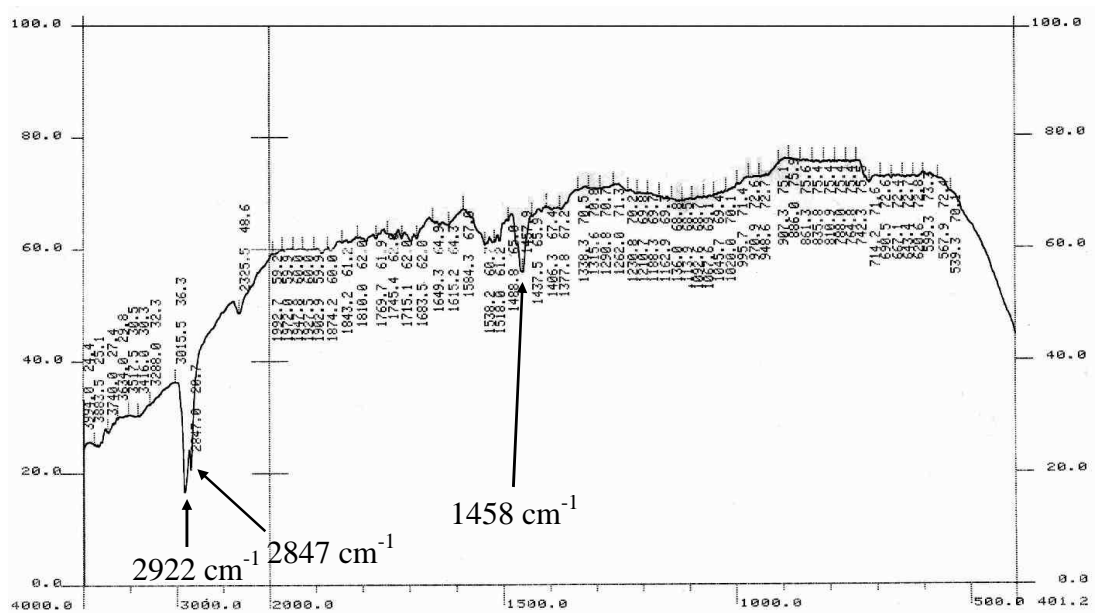


Figura 69: Espectro no IV de MF1 (KBr).

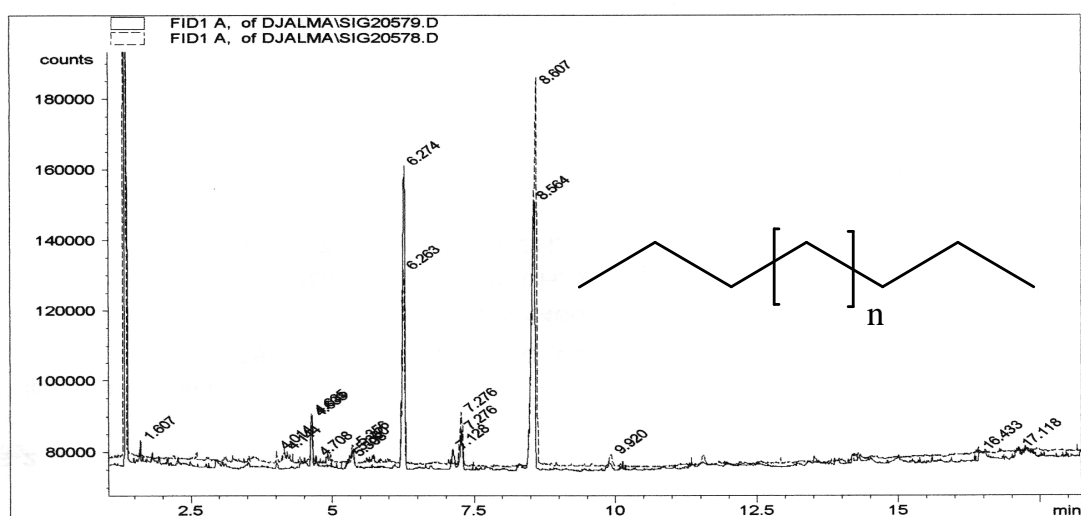


Figura 70: Cromatograma obtido por CG – FID para: padrões (linha contínua) e MF1 (linha fragmentada).

5.4.7 MF2: (2E,6E,10E)-2,6,11-trimetildodeca-2,6,10-trieno (Tanaceteno)

MF2 foi obtido das frações 7 a 15 da coluna C-1 do extrato em hexano das folhas, apresentando-se como óleo amarelado. Este composto quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard, apresentou resultado negativo para triterpenos pentacíclicos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 71, pág. 96) apresentou vários sinais entre δ_{H} 1,20 a 2,40, atribuídos a hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos e um multipletto em δ_{H} 5,13, atribuído à hidrogênios olefínicos.

A análise de RMN de ^{13}C associado ao subspectro DEPT-135 (Figuras 72 e 73, pág. 96 e 97) revelou a presença de 14 sinais de carbono, sendo quatro metílicos, quatro metilênicos, três metínicos e três não hidrogenados. Comparando-se as intensidades dos sinais de carbonos metílicos mostrados no RMN de ^{13}C (Figura 72, pág. 96), suspeitou-se que o sinal em 25,70 corresponderia a dois grupos metila, totalizando 15 carbonos.

Estes dados levaram a crer que se tratava de um sesquiterpeno. Com base na biossíntese a partir de pirofosfato de isopentenila e pirofosfato de dimetilalila e com auxílio do programa simulador de espectros de RMN de ^{13}C “ChemDraw Ultra 7.0”, foi possível propor uma estrutura para este composto. A comparação com dados relatados por Kaul (2002) possibilitou sugerir a estrutura de um sesquiterpeno irregular para MF2 e concluir que se tratava do tanaceteno. O isolamento deste constituinte mostra a capacidade dessa planta de sintetizar um sesquiterpeno cuja rota biossintética é peculiar e envolve o acoplamento de pirofosfato de γ,γ -dimetilalila com pirofosfato de geranila. Ao invés de ocorrer o acoplamento de pirofosfato de geranila com duas unidades de pirofosfato de isopentenila cauda-cabeça, processo considerado como sendo clássico da via dos isoprenos, o que se observou neste caso é o acoplamento de pirofosfato de γ,γ -dimetilalila com pirofosfato de geranila, resultando no tanaceteno (Kaul, 2002).

Os sinais de carbono e os valores da literatura estão discriminados na Tabela 6, pág. 97 (Kaul, 2002).

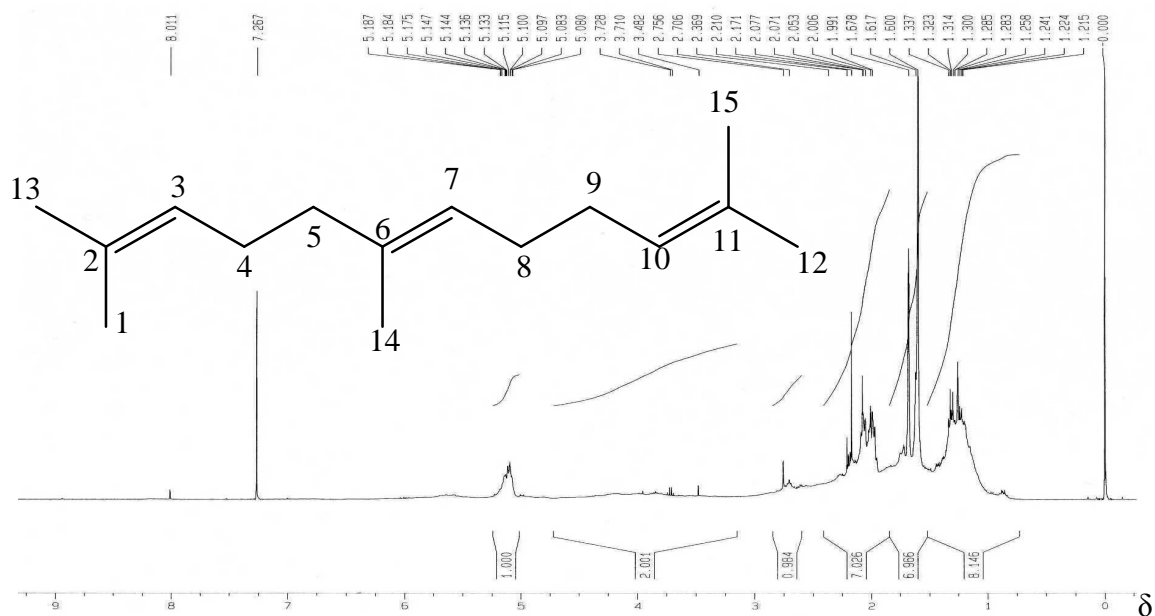


Figura 71: Espectro de RMN de ¹H de MF2 (CDCl₃, 400MHz).

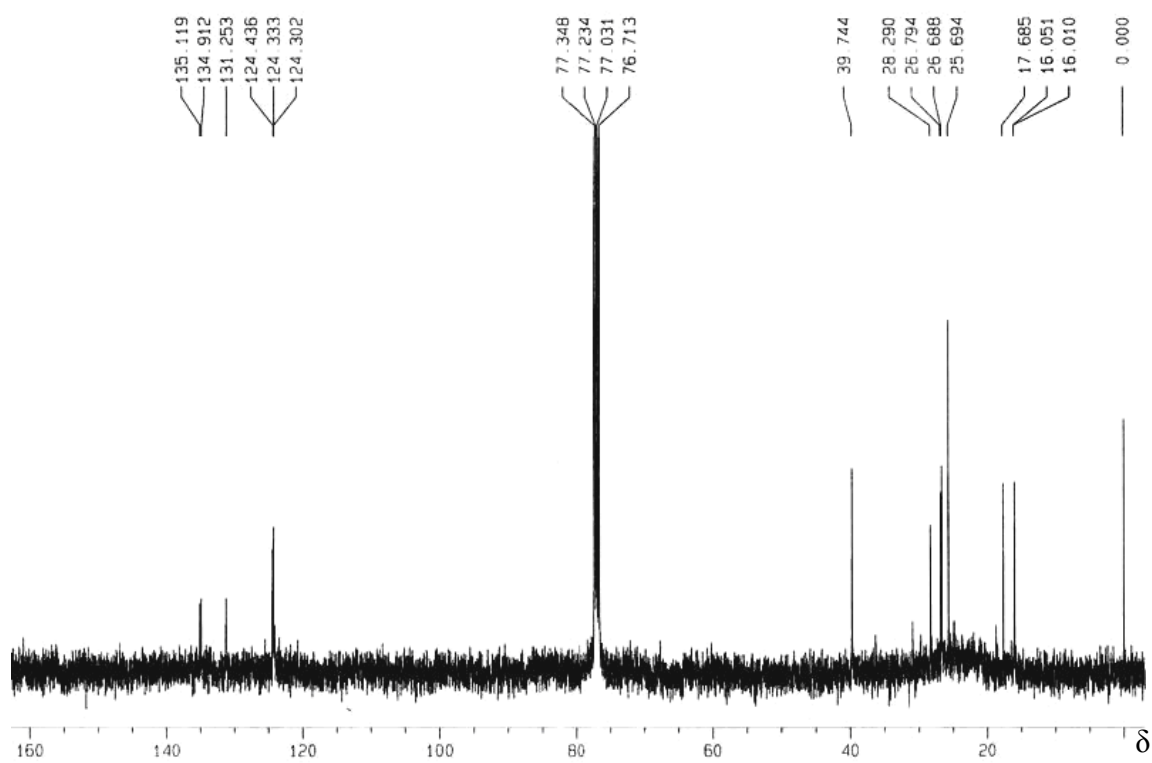


Figura 72: Espectro de RMN de ¹³C de MF2 (CDCl₃, 100 MHz).

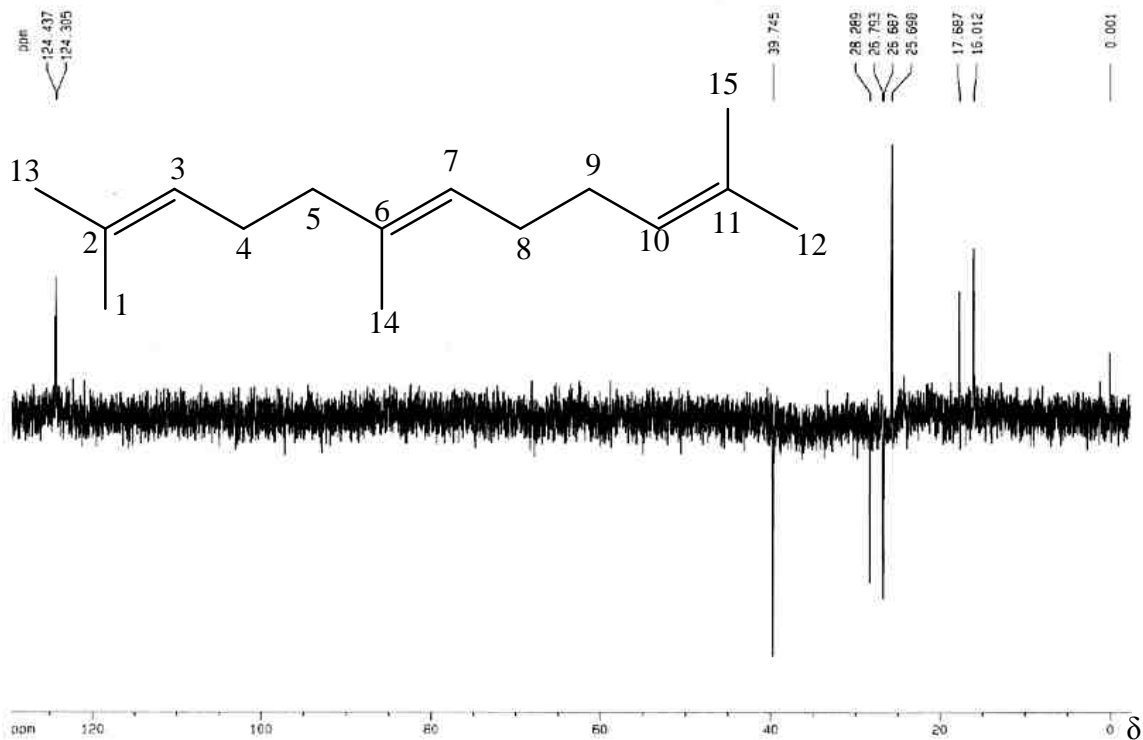
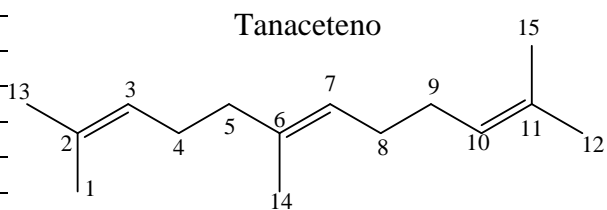


Figura 73: Subespectro DEPT-135 de MF2 (CDCl₃, 100 MHz).

Tabela 6: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF2 (Tanaceteno) com dados da literatura (Kaul, 2002)

C _n	Tanaceteno	MF2
1	25,66	25,70
2	135,08	135,12
3	124,27	124,33
4	26,75	26,79
5	39,72	39,74
6	131,22	131,25
7	124,29	124,44
8	26,65	26,69
9	28,15	28,29
10	124,27	124,30
11	134,87	134,91
12	25,66	25,70
13	16,01	16,01
14	17,65	17,69
15	16,01	16,01



5.4.8 MF3 e MF4: 3 β -araquidoiloxi-ursan-12-eno (araquidato de α -amirina), 3 β -araquidoiloxi-olean-12-eno (araquidato de β -amirina) 3 β -araquidoiloxi-D:C-friedo-olean-8-eno (araquidato de isomultiflorenol)

Os materiais se apresentaram como dois sólidos de coloração esbranquiçada que ao serem submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentaram resultados positivos para triterpenos pentacíclicos. A análise por CCDS revelou uma única mancha na cromatoplaça mesmo utilizando eluentes de diferentes polaridades.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 75, pág. 100) revelou sinais múltiplos na região entre δ_{H} 0,80 e 2,04, um tripleto em δ_{H} 2,29 referente a hidrogênios metilenos vizinho à carboxila ($\text{CH}_2\text{-COO-}$), um multiplete em δ_{H} 4,51 referente a hidrogênio carbinólico de éster e dois tripletos em δ_{H} 5,13 e 5,18 correspondentes a hidrogênios olefínicos, além de um sinal intenso em δ_{H} 1,25. Estes dados e o grande número dos sinais levaram a suspeitar de que se tratava de uma mistura constituída de triterpenos pentacíclicos esterificados.

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (Figuras 76 e 77, pág. 100) mostraram a existência de mais de 100 carbonos. O espectro apresentou sinais em δ_{C} 80,60 (CH), relativo a carbono carbinólico. Sinais em 121,68 (CH), 124,35 (CH), 133,41 (C), 135,18 (C), 139,66 (C), 145,22 (C) referentes aos carbonos olefínicos e sinal em δ_{C} 173,68 (C) correspondente a grupo carboxílico. O sinal intenso ao redor de δ_{C} 29,71 referente a grupos metilênicos de cadeia longa de hidrocarbonetos e ácidos graxos. Estes dados quando comparados com os da literatura (Mahato, 1994; SBDS, 1997; Mendes, 1999; Miranda, 2007) mostraram-se compatíveis com os deslocamentos químicos dos compostos α -amirina esterificada, β -amirina esterificada, isomultiflorenol esterificado (Tabela 7, pág. 101). O sinal de metila em δ_{C} 14,12 é condizente com o valor encontrado para metila terminal de cadeia linear de hidrocarbonetos e ácidos graxos.

A proporção de cada triterpeno na mistura foi obtida pela comparação dos valores das integrais dos sinais de dois hidrogênios olefínicos pertencentes a α -amirina (δ_{H} 5,18) com valor de integração igual a 1, β -amirina (δ_{H} 5,13) com valor igual a 3 e do sinal em δ_{H} 4,51 referente a três hidrogênios carbinólicos presente em todos os triterpenos identificados na mistura com de integração igual a 5. Assim, a proporção encontrada para os valores das integrais dos sinais citados anteriormente foi de 1:3:5, respectivamente. Como o número de hidrogênios olefínicos e carbinólicos em cada

composto é invariável e igual a 1, a proporção mostrada anteriormente revelou que a concentração da α -amirina é três vezes maior que a da β -amirina (3:1) e que o isomultiflorenol apresenta a mesma proporção em relação à β -amirina (1:1), obtendo-se a relação de 3:1:1 para α -amirina, β -amirina e isomultiflorenol, respectivamente.

A integração do sinal em δ_H 2,29 referente ao grupo metilênico α carboxílico (-CH₂-) mostrou-se duas vezes maior que a integral do sinal em δ_H 4,51 (-CH-) pertencentes aos hidrogênios carbinólicos dos triterpenos identificados na mistura. Este dado reforçou a proposta de que os triterpenos presentes na mistura estejam esterificados. Com o intuito de definir o tamanho da cadeia esterificada, foi realizada a integração dos sinais de ¹³C referentes à cadeia alifática presente na mistura obtendo-se 20 carbonos para a cadeia. Os dados de deslocamento químico obtidos comparados com dados da literatura possibilitou sugerir que a porção graxa é derivada do ácido eicosanóico ou araquídico (Tabela 7, pág. 101).

Assim, com base nos dados de ¹H, ¹³C e nos valores de integração de sinais de ambos os espectros, os triterpenos na mistura foram identificados como: 3 β -araquidoiloxi-ursan-12-eno (araquidato de α -amirina), 3 β -araquidoiloxi-olean-12-eno (araquidato de β -amirina) 3 β -araquidoiloxi-D:C-friedo-olean-8-eno (araquidato de isomultiflorenol).

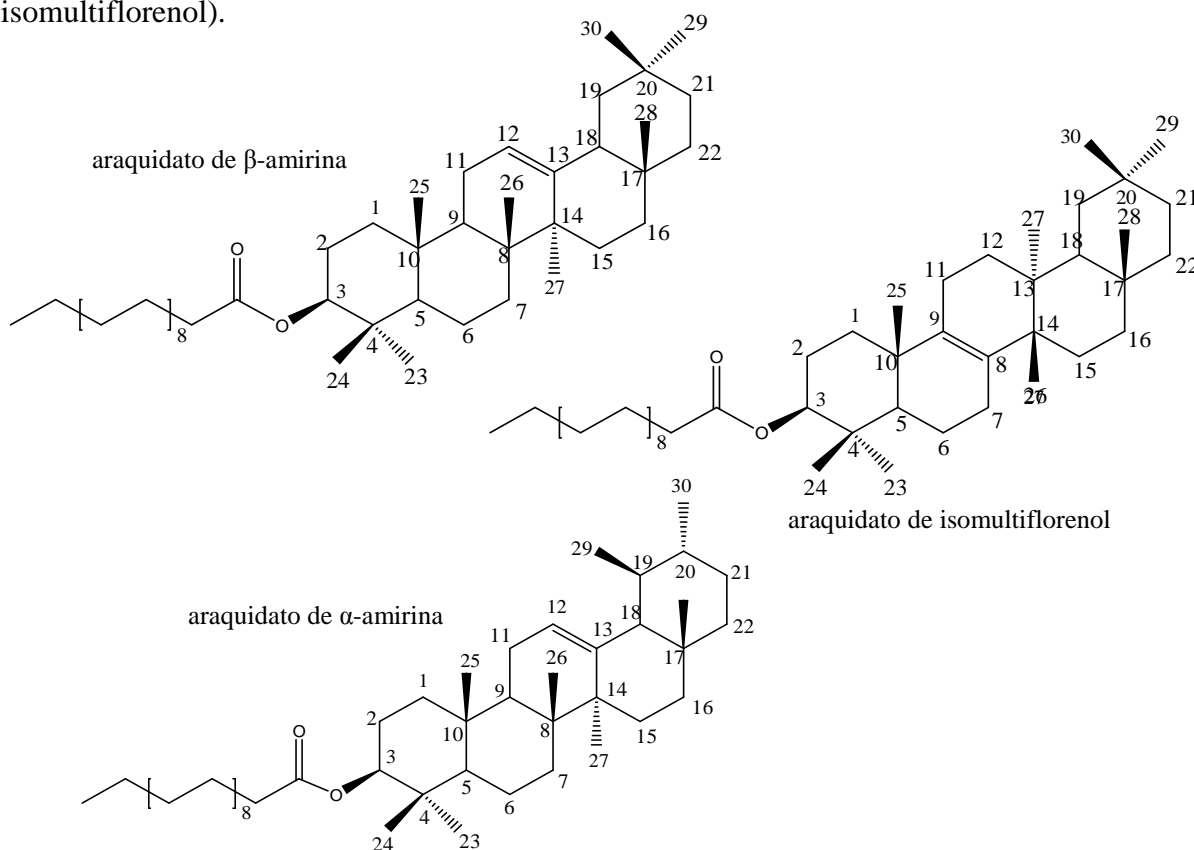


Figura 74: Compostos identificados em MF3 e MF4 por RMN de ¹H e ¹³C.

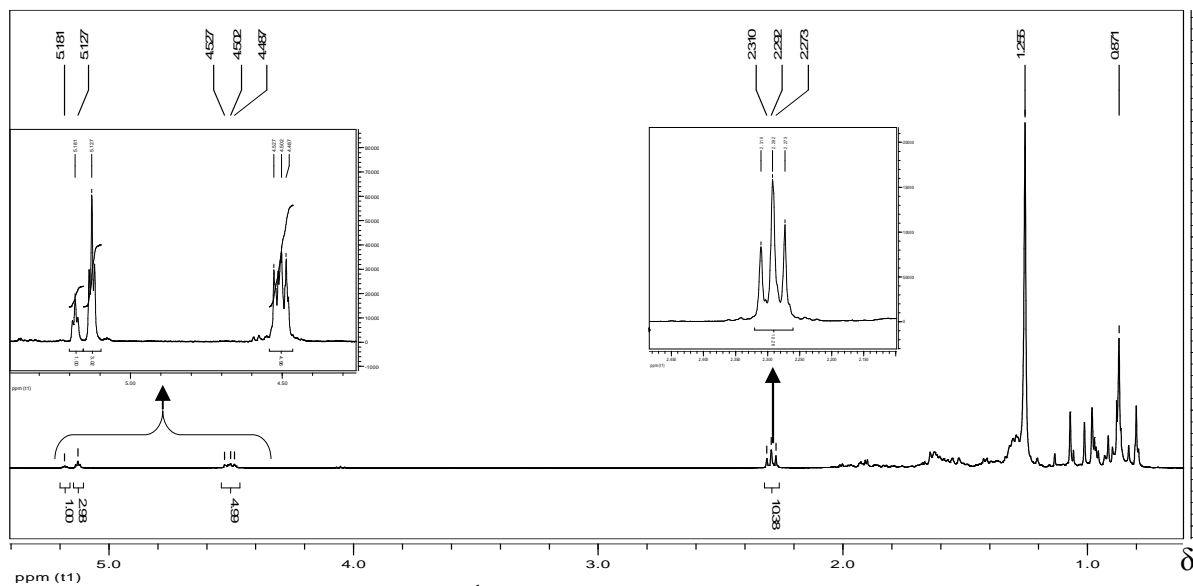


Figura 75: Espectro de RMN de ^1H de MF3 e MF4 (CDCl_3 , 400MHz).

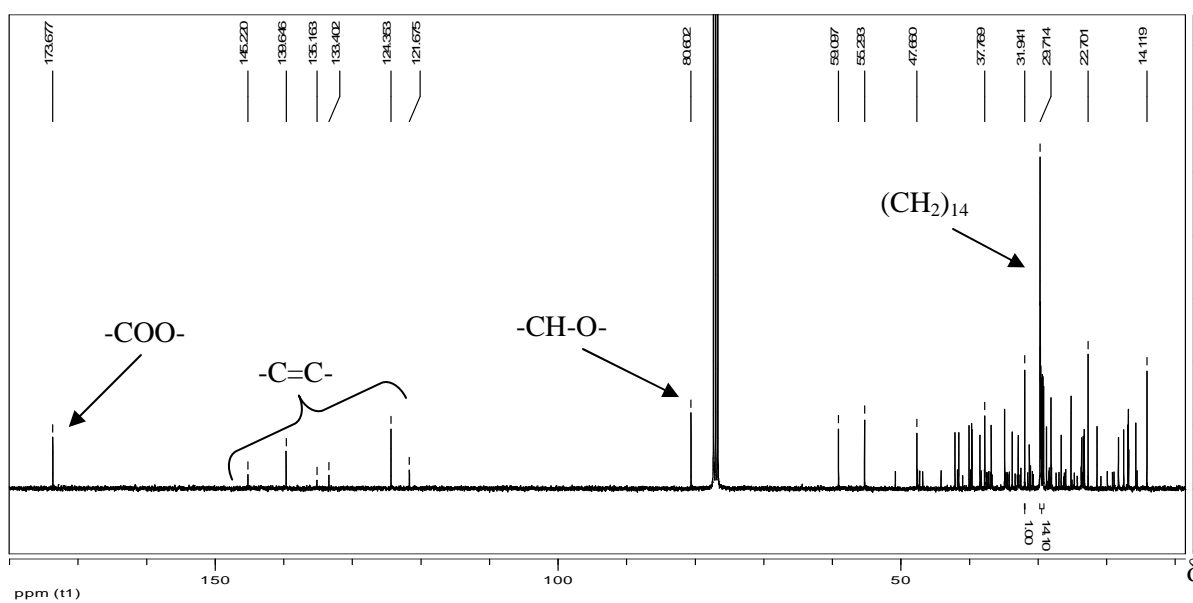


Figura 76: Espectro de RMN de ^{13}C de MF3 e MF4 (CDCl_3 , 100 MHz).

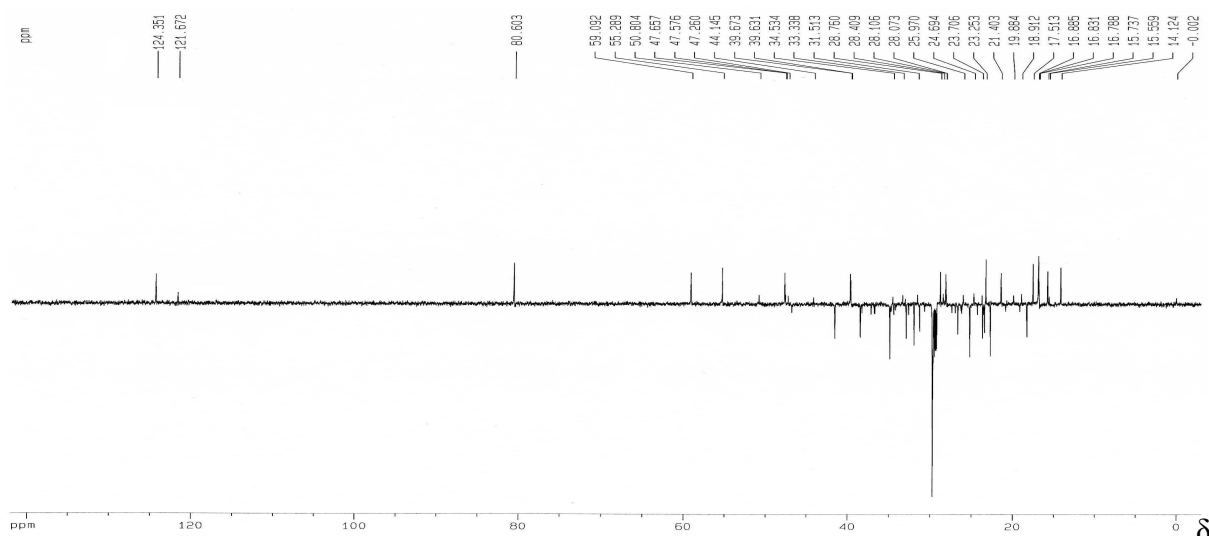


Figura 77: Subespectro DEPT-135 de MF3 e MF4 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 7: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF3 e MF4 com dados da literatura (Mahato, 1994; Miranda, 2006; SBDS, 2007)

Nº	α -amirina ¹ esterificada	MF4	β -amirina ² esterificada	MF4	Isomultiflorenol ³ esterificado	MF4	ácido eicosanóico	MF4
1	38,51	38,48	38,45	38,48	34,90	34,88	179,83	173,68
2	23,68	23,66	23,60	23,55	24,40	24,28	34,03	34,88
3	80,64	80,60	80,94	80,60	81,10	80,60	24,72	25,19
4	37,77	37,77	37,70	37,49	37,90	37,80	29,10	29,19
5	55,32	55,29	55,24	55,29	51,10	50,81	29,28	29,27
6	18,29	18,27	18,23	18,27	19,30	19,13	29,40	29,37
7	32,92	32,90	32,57	32,62	27,50	27,36	29,72	29,60
8	40,09	40,06	39,79	39,84	135,40	135,16	29,72	29,68
9	47,69	47,66	47,54	47,58	133,60	133,40	29,72	29,71
10	36,85	36,82	36,83	36,87	37,70	37,30	29,72	29,71
11	23,41	23,39	23,52	23,70	20,90	20,83	29,72	29,71
12	124,38	124,35	121,71	121,67	31,00	30,81	29,72	29,71
13	139,67	139,65	145,21	145,22	37,50	37,49	29,72	29,71
14	42,13	42,10	41,69	41,74	41,10	41,01	29,72	29,71
15	26,65	26,63	26,12	26,16	26,60	26,27	29,72	29,71
16	28,14	28,12	26,91	26,96	37,10	36,87	29,72	29,65
17	33,78	33,77	32,48	32,51	31,00	30,68	29,48	29,48
18	59,13	59,10	47,21	47,26	44,30	44,15	31,96	31,94
19	39,65	39,63	46,77	46,81	34,30	34,20	22,71	22,70
20	39,70	39,68	31,08	31,09	28,40	28,33	14,11	14,12
21	31,29	31,27	34,72	34,76	43,00	42,01	-	-
22	41,58	41,56	37,13	37,17	36,90	36,70	-	-
23	28,13	28,12	28,39	28,41	28,10	28,08	-	-
24	16,84	16,83	16,73	16,79	16,80	16,78	-	-
25	15,75	15,74	16,79	16,79	20,00	19,88	-	-
26	16,91	16,89	15,69	15,56	18,90	18,91	-	-
27	23,27	23,25	25,94	25,97	25,00	24,70	-	-
28	28,77	28,76	28,74	28,76	31,60	31,51	-	-
29	17,52	17,51	33,33	33,34	34,70	34,72	-	-
30	21,40	21,40	23,69	23,66	33,20	33,01	-	-
1'	173,68	173,68	-	-	-	-	-	-
2'	34,87	34,88	-	-	-	-	-	-

1- Dados de ¹³C da porção terpênica e dos carbonos C1 e C2 da porção graxa de 3 α -esteariloxi-urs-12-eno.

2- Dados de ¹³C da porção terpênica de 3 β -O-acetil- β -amirina.

3- Dados de ¹³C da porção terpênica de 3 β -O-acetil-isomultiflorenol.

5.4.9 MF5: 3 β -araquidoiloxi-11-oxo-ursan-12-eno

MF5 foi isolado como uma graxa ligeiramente amarelada que quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard, apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 78, pág. 104) apresentou vários sinais entre δ_{H} 0,79 e 2,1, um simpleto em δ_{H} 2,35, um duplo duplete em δ_{H} 4,52 (dd, $J=4,8; 11,6$ Hz, hidrogênio carbinólico) e um simpleto largo em δ_{H} 5,54 referente a hidrogênio olefínico. Comparando estes dados com a literatura (Miranda, 2007), chegou-se à hipótese que MF5 tratava-se de um triterpeno pentacíclico da classe dos ursanos. Além disso, um sinal intenso em δ_{H} 1,26 de hidrogênios metilênicos de cadeia alifática longa e um tripleto δ_{H} 2,29 (t, $J=7,2$ Hz) característico de grupo metilênico α -carbonílico de ácido/éster graxo indicaram a presença de cadeia graxa em MF5, e suspeitou-se, então, que poderia se tratar de um ursano esterificado.

Corroborando com os dados de RMN de ^1H , a análise dos espectros de RMN de ^{13}C e no subespectro DEPT-135 (Figuras 79 e 80, pág. 104 e 105) revelou a presença de um sinal em δ_{C} 199,70 que coincide com deslocamento químico de grupo carbonila de cetona, um sinal em δ_{C} 173,70 característico de carbonila de éster; dois sinais em 164,94 e 130,43 indicativo de carbonos olefínicos, um sinal em δ_{C} 80,32 referente à carbono oxigenado e um sinal intenso de carbonos metilênicos na região de δ_{C} 29,70. Estes dados confirmaram a hipótese de se tratar de um ursano esterificado e com cadeia graxa provavelmente ligada ao oxigênio em C3.

A confrontação das informações de deslocamento químico do carbono carbonílico (δ_{C} 173,70) de MF5 com dados de 3 β -esteariloxi-ursan-12-eno (Miranda, 2006) revelou grande similaridade entre os valores, ocorrendo o mesmo com os sinais de C2' (δ_{C} 34,87), C3' (δ_{C} 25,18), C16' (δ_{C} 31,94), C17' (δ_{C} 22,70), C18' (δ_{C} 14,12) e C3 (δ_{C} 80,32). Com a finalidade de determinar o tamanho da cadeia ligada ao grupo éster, foi obtido um espectro de RMN de ^{13}C quantitativo (Figura 79, pág. 104) com *delay* de 10 s para permitir a relaxação completa de todos os carbonos. As áreas dos sinais de carbono referentes à cadeia graxa mostraram presença de 20 carbonos, o que permitiu concluir que MF5 tratava-se de um araquidoiloxi-ursan-12-eno.

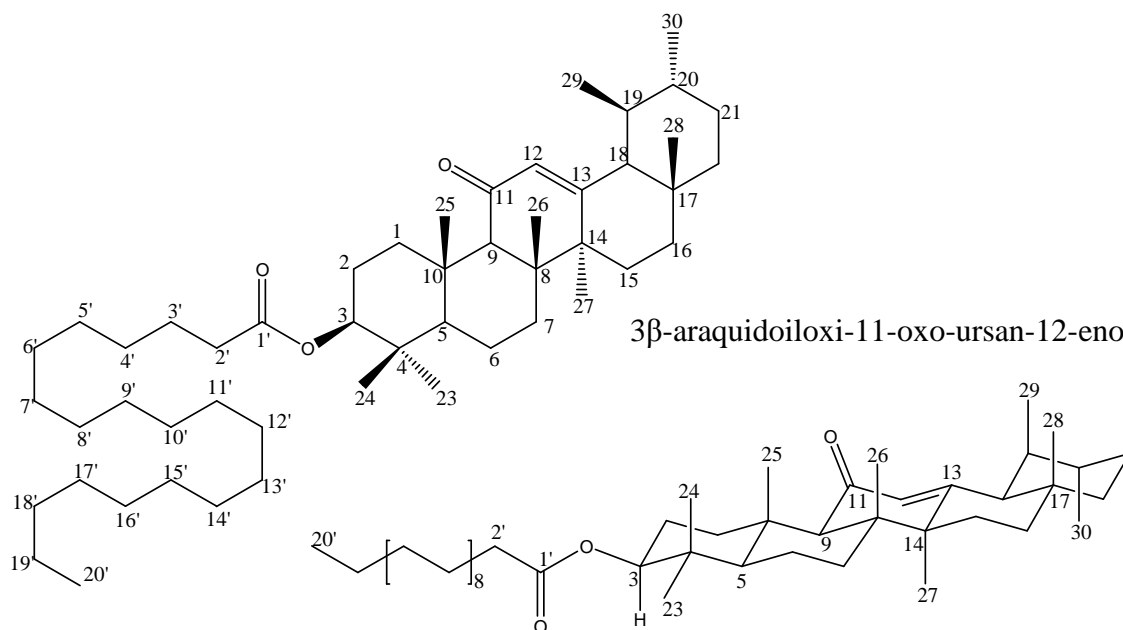
A análise do mapa de contornos HSQC (Figuras 81, 82 e 83, pág. 105 e 106), associada aos dados da literatura (Mahato, 1994; Miranda, 2006) e do mapa de contornos HMBC, permitiu atribuir o deslocamento químico dos hidrogênios, bem

como associá-los aos seus respectivos carbonos. Foi possível, em uma análise inicial, realizar a atribuição dos deslocamentos químicos de C3 (δ_C 80,31; δ_H 4,52), C5 (δ_C 55,03; δ_H 0,81), C9 (δ_C 61,46; δ_H 2,35), C12 (δ_C 130,43; δ_H 5,54) e C2' (δ_C 34,87; δ_H 2,29).

No mapa de contornos HMBC (Figuras 84 e 85, pág. 107) constatou-se que H9 (δ_H 2,35) correlacionou com C8 (δ_C 45,15), C10 (δ_C 36,85), C11 (δ_C 199,69), C25 (δ_C 16,56), C26 (δ_C 18,55). C14 (δ_C 43,67) correlacionou com H9 (δ_H 2,35), H12 (δ_H 5,54), H26 (δ_H 1,15), H27 (δ_H 1,29) e o sinal de H2' (δ_H 2,29) correlacionou com o sinal de carbono C1' (δ_C 173,69), C3' (δ_C 25,18) e com um sinal em δ_C 29,20 (C4') referente a CH_2 da cadeia alifática do éster. Os dados confirmaram, portanto, a posição da carbonila e da dupla em C11 e C12, respectivamente, além de mostrar que o grupo éster está ligado no carbono 3 (δ_C 80,31).

A posição em β para a ligação da cadeia graxa em C3 foi determinada com base nos valores das constantes de acoplamento de H3/H2eq ($J=4,8$ Hz) e H3/H2ax ($J=11,6$ Hz) que coincidem com valores de J para acoplamentos de hidrogênios ax/eq e ax/ax (Silverstein, 2005), respectivamente, e com a comparação dos dados de deslocamento químico de C3 com a literatura (Miranda, 2006).

Estes dados associados aos dados da literatura (Miranda, 2006) possibilitaram propor a estrutura do 3 β -araquidoiloxi-11-oxo-ursan-12-eno para MF5, e este é o primeiro relato de isolamento desse composto na literatura. A Tabela 8 (pág. 108) apresenta a comparação entre dados de RMN de ^{13}C de MF5 com os da literatura para o 3 β -esteariloxi-ursan-12-eno e o ácido araquídico (Miranda, 2006; SBDS, 2007).



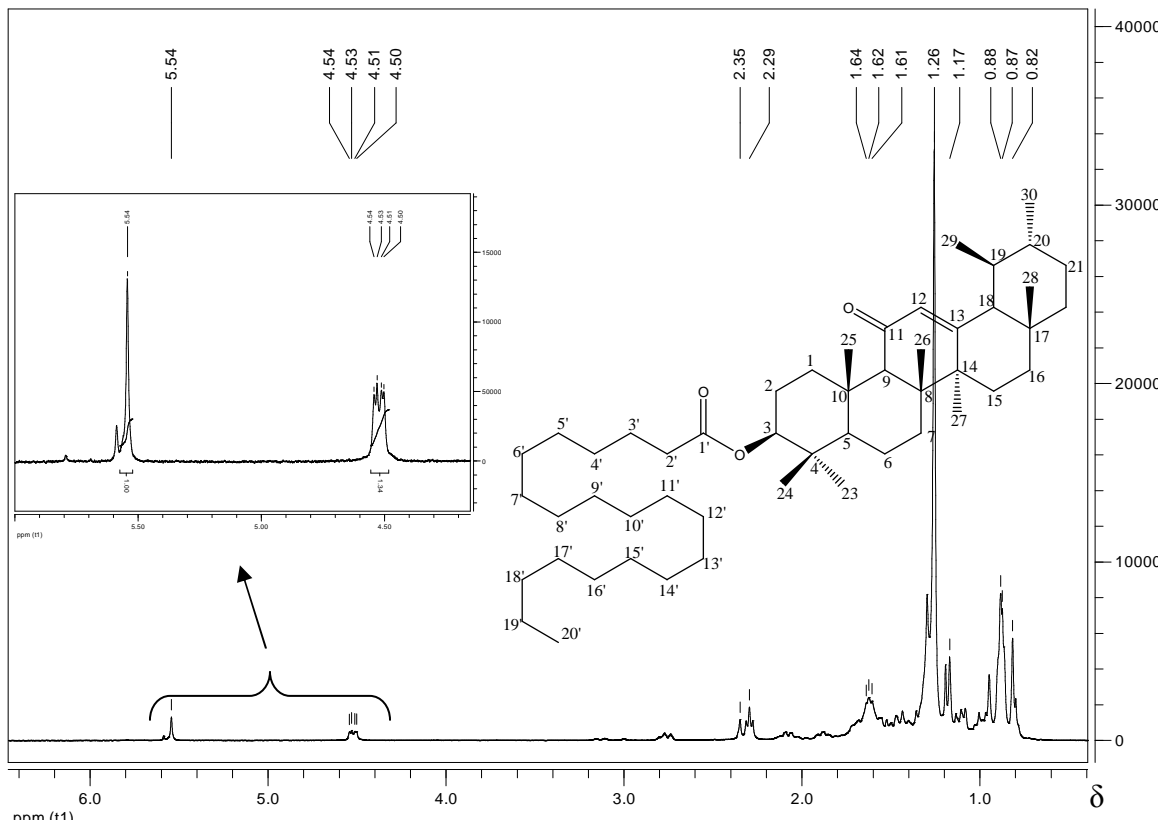


Figura 78: Espectro de RMN de ^1H de MF5 (CDCl_3 ; 400 MHz).

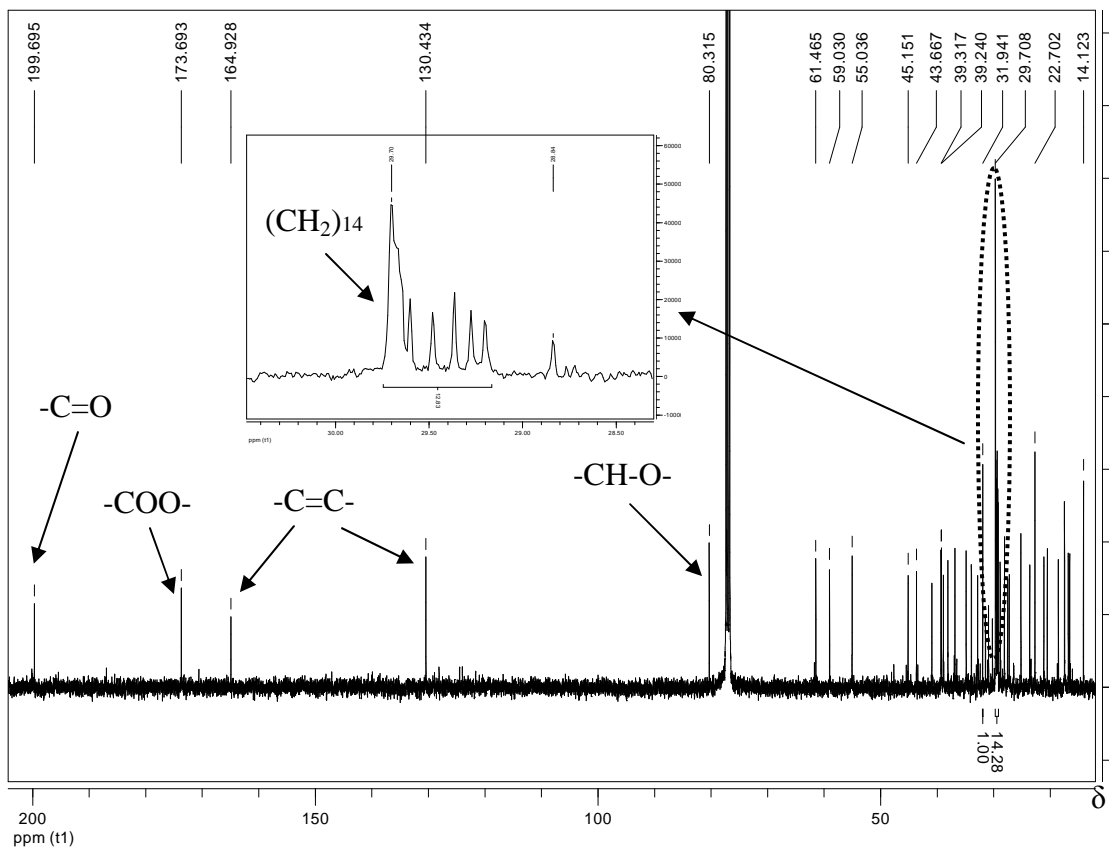


Figura 79: Espectro de RMN de ^{13}C quantitativo de MF5 (CDCl_3 , 100 MHz).

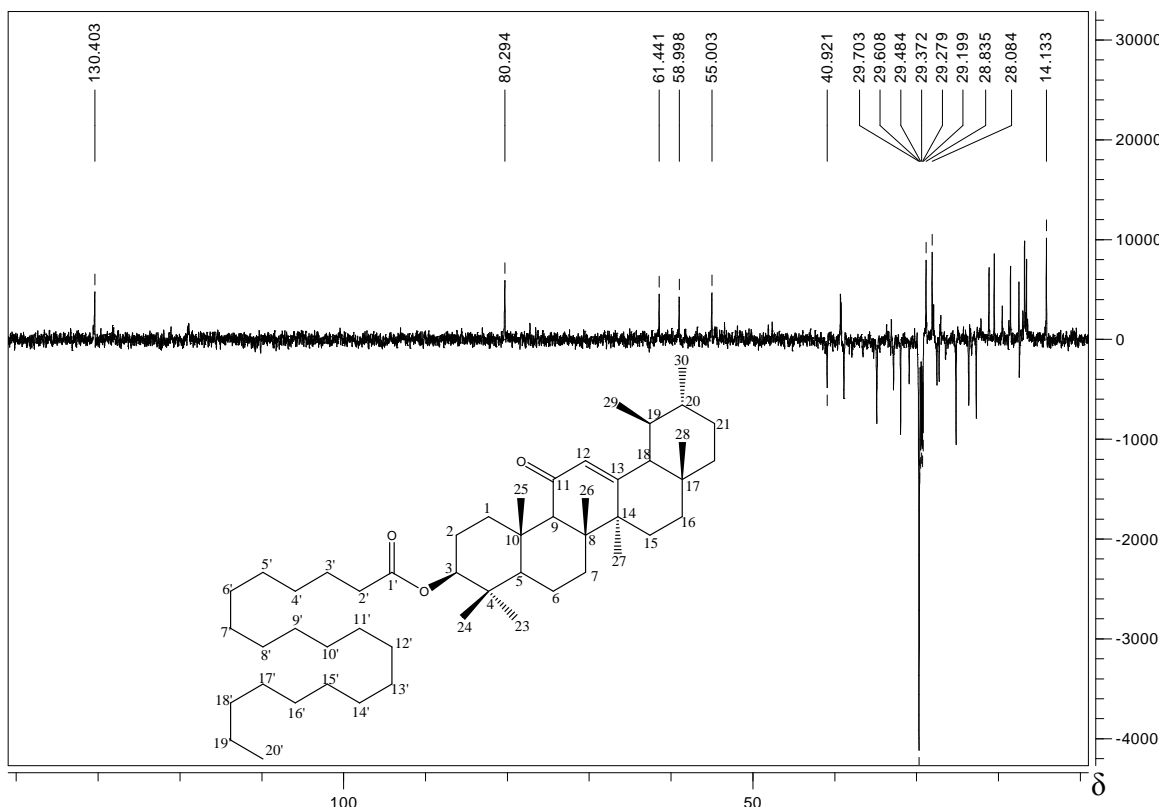


Figura 80: Subespectro DEPT-135 de MF5 (CDCl₃, 100 MHz).

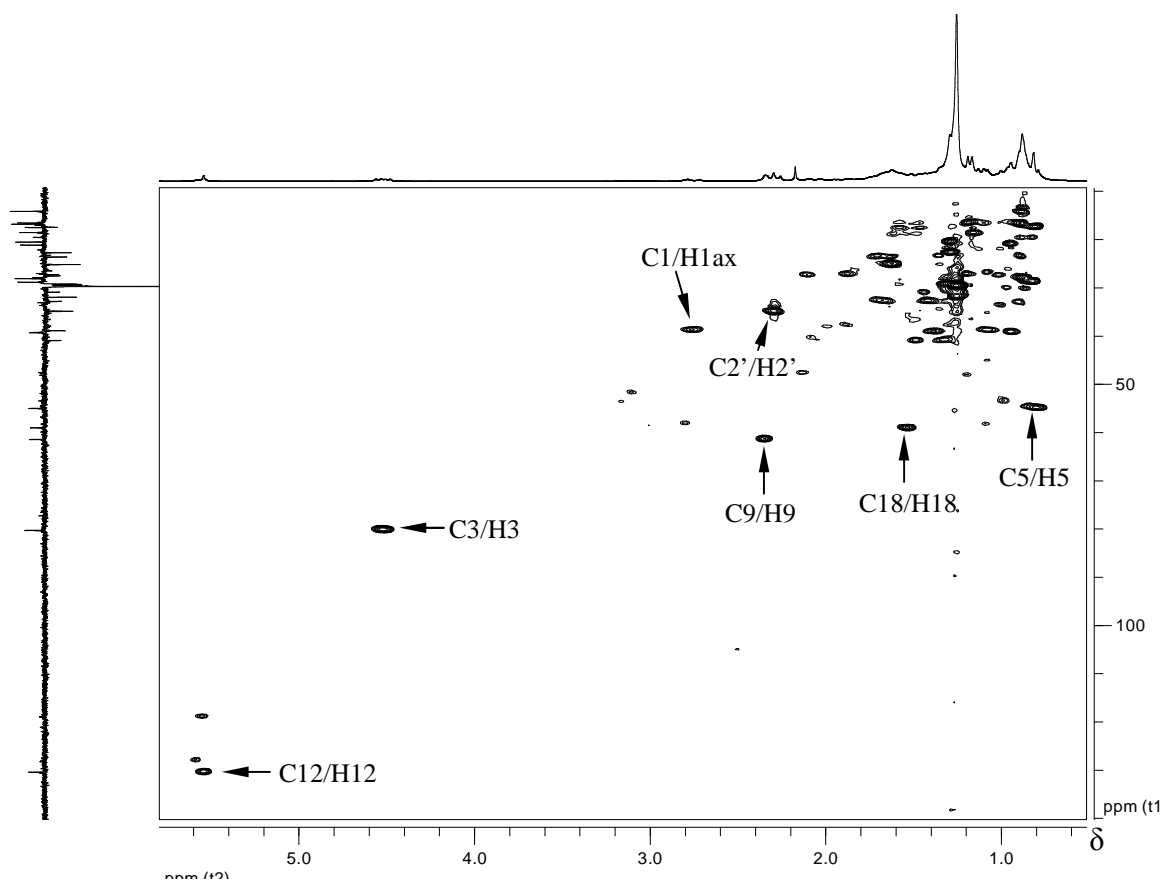


Figura 81: Mapa de contornos HSQC de MF5 (CDCl₃, 100 MHz).

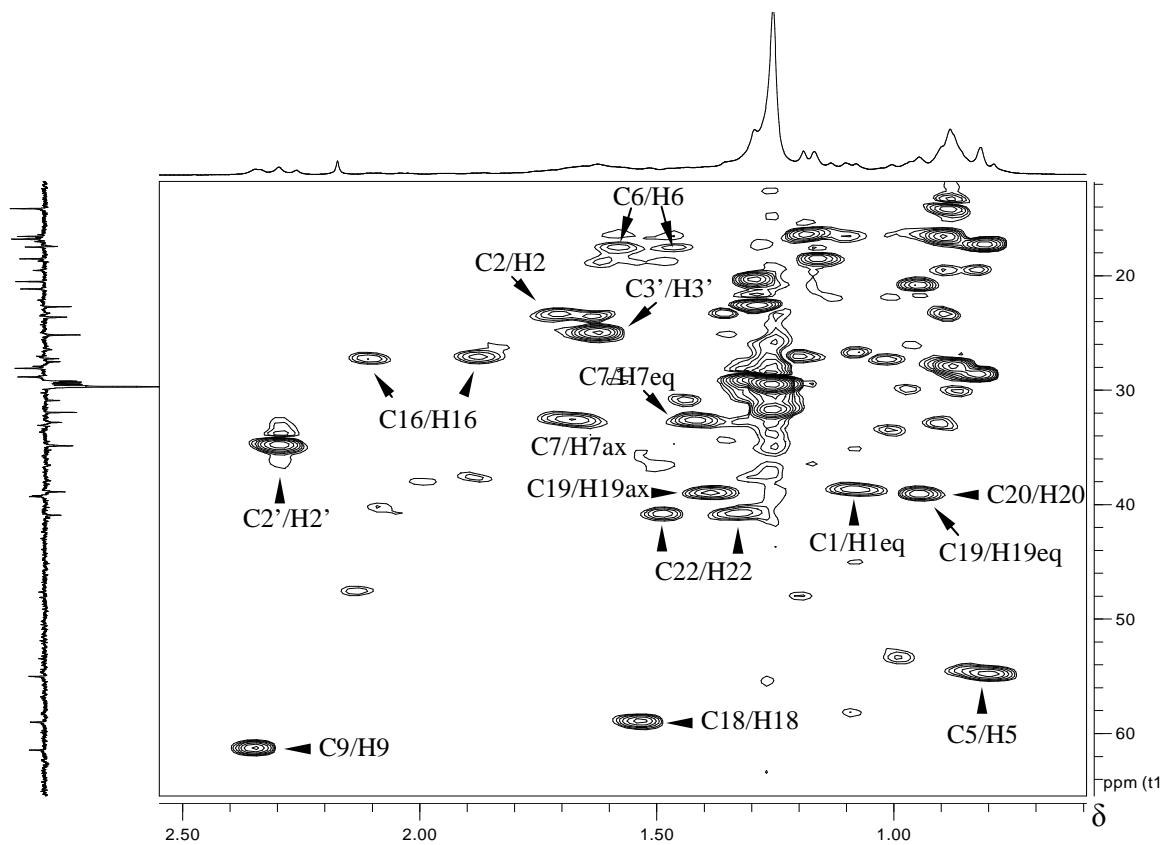


Figura 82: Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF5 (CDCl_3 , 100 MHz):
 δ_c 12 a 64.

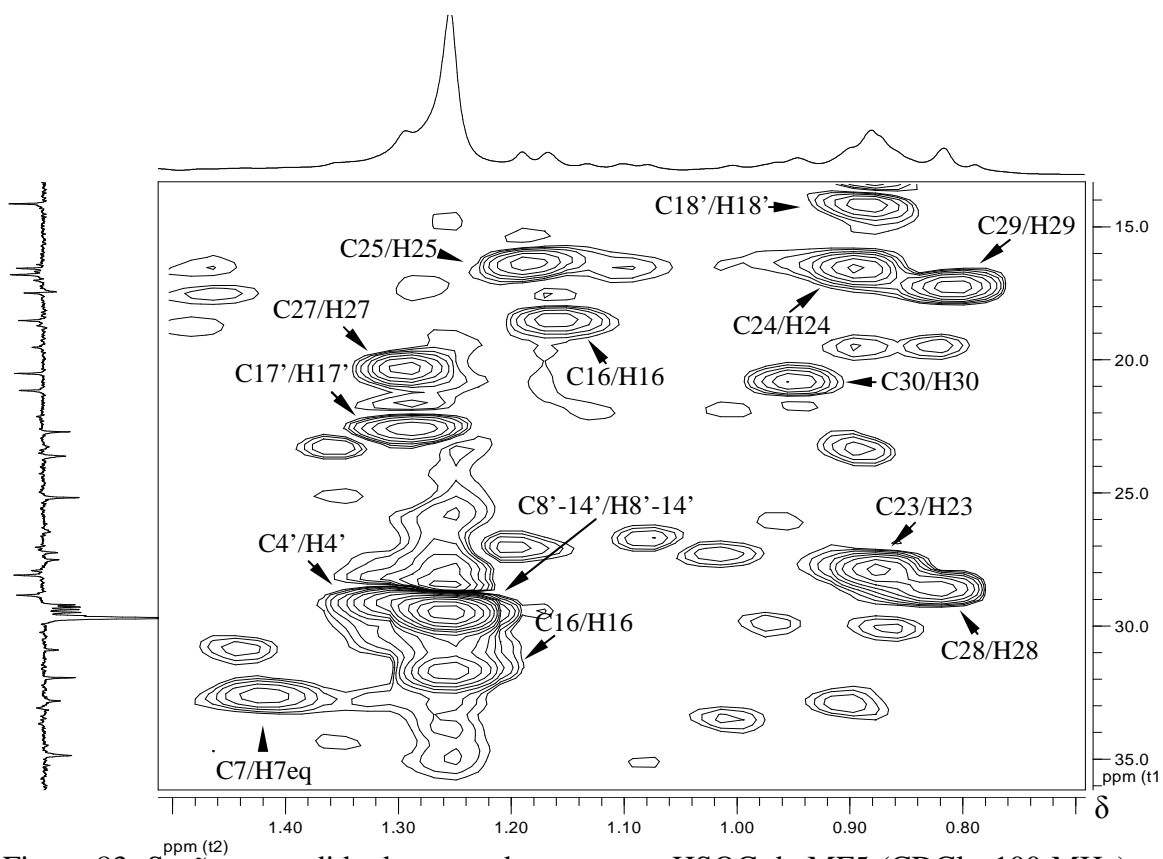


Figura 83: Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF5 (CDCl_3 , 100 MHz):
 δ_c 14 a 36.

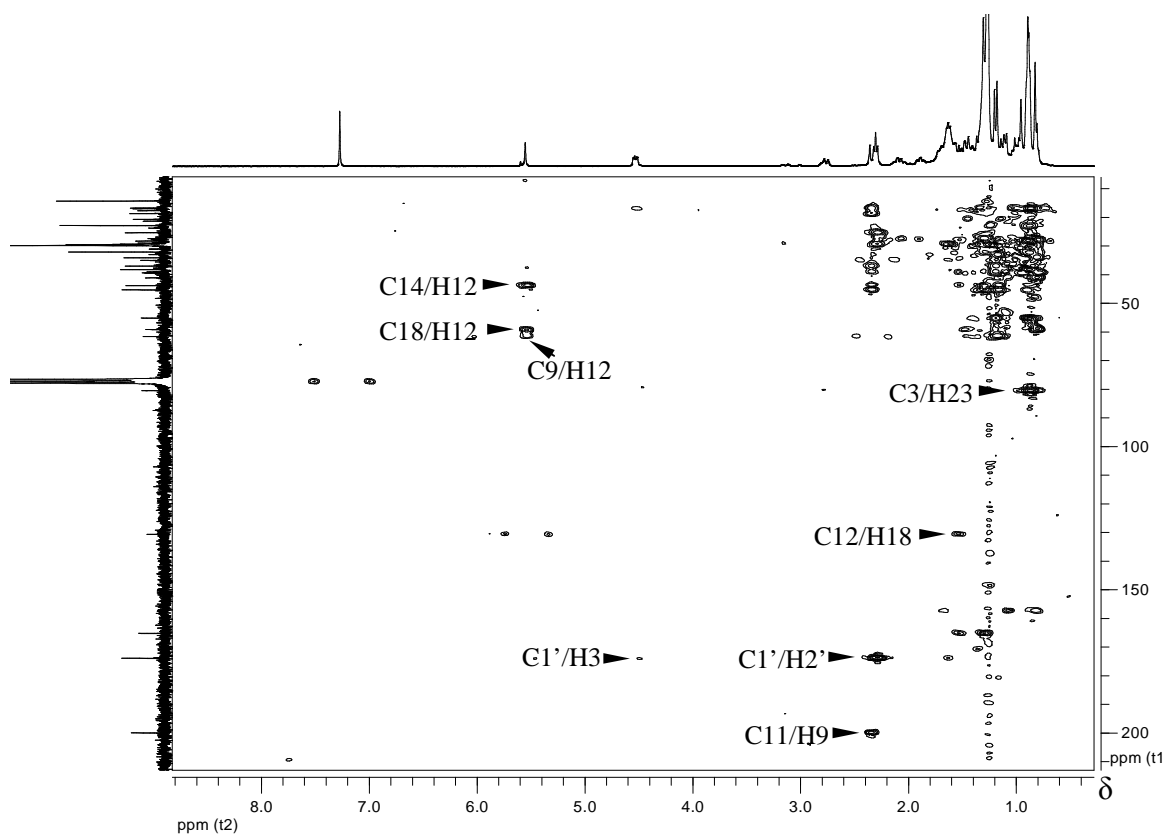


Figura 84: Mapa de contornos HMBC de MF5 (CDCl_3 , 100 MHz).

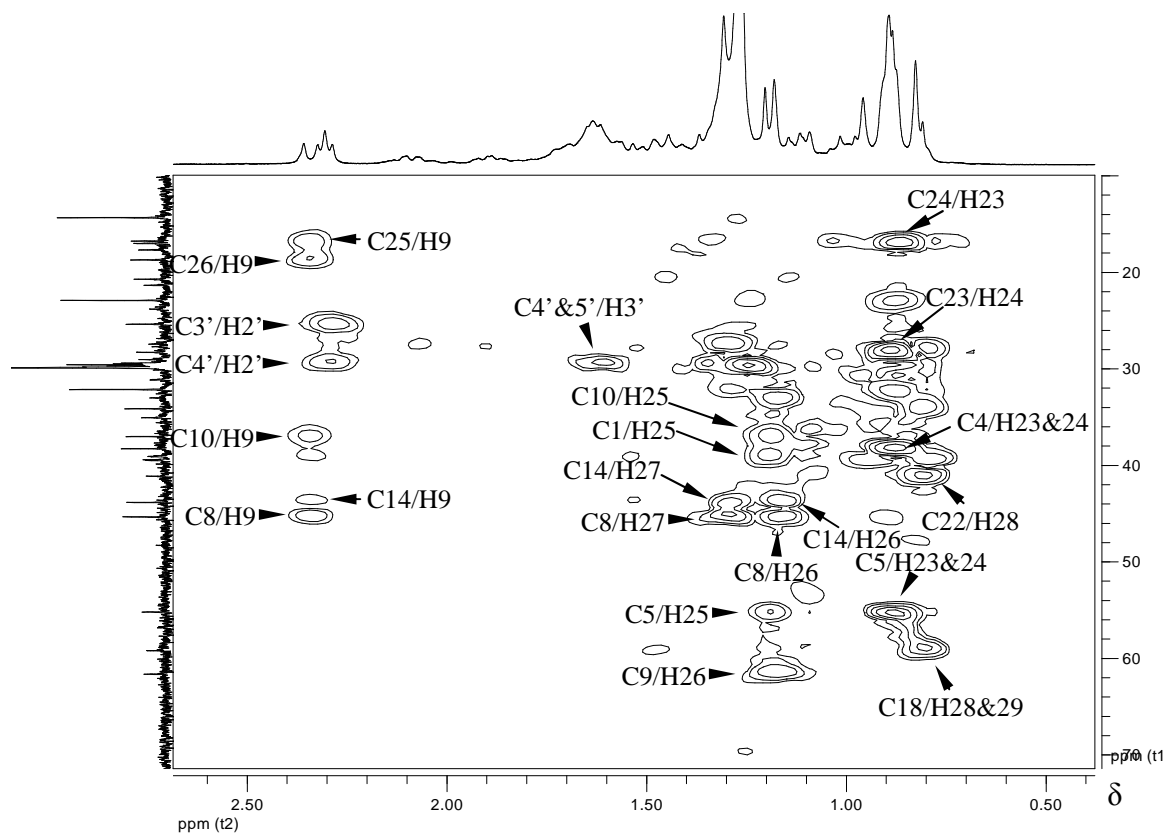


Figura 85: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF5 (CDCl_3 , 100 MHz):
 δ_c 10 a 70.

Tabela 8: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF5 com dados da literatura (Miranda, 2006; SBDS, 2007)

C _n	α -amirina ¹ esterificada	MF5	δ_H (J em Hz)	HMBC	C _n	Cadeia ² alifática	MF5	δ_H (J em Hz)	HMBC
1	38,51	38,91	1,08 eq, m 2,77 ax, m	9, 25	1'	179,83	173,69	-	2', 3
2	23,68	23,63	1,71 m	-	2'	34,03	34,87	2,29;t J=7,2	-
3	80,64	80,31	4,52; dd, J = 4,8; 11,6	23	3'	24,72	25,18	1,63	2'
4	37,77	38,09	-	-	4'	29,10	29,21	1,26	2', 3'
5	55,32	55,03	0,81; m	23, 24, 25	5'	29,28	29,28	1,26	3'
6	18,29	17,48	0,94; m	-	6'	29,40	29,37	1,26	-
7	32,92	32,84	1,45 eq, m 1,69 ax, m	-	7'	29,72	29,61	1,26	-
8	40,09	45,15	-	9, 26, 27	8'	29,72	29,71	1,26	-
9	47,69	61,46	2,35; m	12, 25, 26	9'	29,72	29,71	1,26	-
10	36,85	36,85	-	9, 25	10'	29,72	29,71	1,26	-
11	23,41	199,69	-	9	11'	29,72	29,71	1,26	-
12	124,38	130,43	5,54; s	18	12'	29,72	29,71	1,26	-
13	139,67	164,93	-	-	13'	29,72	29,71	1,26	-
14	42,13	43,67	-	12, 26, 27	14'	29,72	29,71	1,26	-
15	26,65	27,26	1,20 eq, m 1,88 ax, m	-	15'	29,72	29,71	1,26	-
16	28,14	27,53	1,01 eq, m 2,11 ax, m	27	16'	29,72	29,71	1,26	-
17	33,78	33,95	-	-	17'	29,48	29,48	1,26	-
18	59,13	59,02	1,55; m	12, 28, 29	18'	31,96	31,94	1,26	-
19	39,65	39,24	0,97 eq, m 1,40 ax, m	-	19'	22,71	22,69	1,29	-
20	39,70	39,32	0,97; m	-	20'	14,11	14,12	0,89	19'
21	31,29	31,94	1,48; m	-					
22	41,58	40,94	1,34 eq, m 1,49 ax, m	-					
23	28,13	28,10	0,89; s	24					
24	16,84	16,81	0,89; s	23					
25	15,75	16,56	1,19; s	9					
26	16,91	18,55	1,15; s	9					
27	23,27	20,52	1,29; s	-					
28	28,77	28,84	0,82; s	-					
29	17,52	17,48	0,82; s	-					
30	21,40	21,14	0,96; s	-					

1- Dados de ¹³C da porção terpênica de estearato de α -amirina.

2- Dados de ¹³C do ácido eicosanóico.

5.4.10 MF6: 3 β -esteariloxi-D:C-friedoleanan-7-eno (estearato de multiflorenol)

MF6 foi isolado como um sólido de coloração esbranquiçada. Quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard, apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 86, pág. 111) apresentou um simpleto largo em δ_{H} 5,46 correspondente a hidrogênio olefínico. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 86, pág. 112) apresentou sinais em δ_{C} 147,60 (C) e 117,52 (CH). Comparando os deslocamentos químicos de MF6 com os dados disponíveis na literatura (Mahato, 1994), chegou-se à hipótese que MF6 tratava-se de um triterpeno pentacíclico da classe dos D:C-friedoleananos.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 86, pág. 111) revelou nove simpletos localizados em δ_{H} 0,76; 0,85; 0,88; 0,94; 0,97; 0,98 1,06; 1,07 e 1,09, correspondentes a nove grupos metila. Um duplo duplete em δ_{H} 4,52 ($J=4,4$; 11,2Hz) indicou a presença de hidrogênio ligado a um carbono oxigenado, um tripleto deformado em δ_{H} 2,30 (t, $J=7,6$ Hz) e um sinal intenso em δ_{H} 1,25, sugeriram a presença de uma cadeia lateral contendo grupo carbonila.

O espectro de RMN de ^{13}C e no subespectro DEPT-135 (Figura 87 e 88, pág. 112) indicou a presença de um sinal em δ_{C} 173,68 característico de carbonila de éster; um sinal em δ_{C} 80,81 referente à carbono oxigenado e um sinal intenso correspondente a carbonos metilênicos em δ_{C} 29,70. Os dados obtidos sugeriram que MF5 tratava-se de um multiflorenol esterificado com cadeia graxa provavelmente ligada ao oxigênio em C3.

A comparação do deslocamento químico do carbono carbonílico (δ_{C} 173,68) de MF5 com dados de 3 β -esteariloxi-ursan-12-eno (Miranda, 2007) mostrou que o carbono carbonílico de MF5 apresentou-se com o deslocamento químico muito similar, ocorrendo o mesmo com os sinais de C2 (δ_{C} 24,23) e C3 (δ_{C} 80,81). Com a finalidade de determinar o tamanho da cadeia ligada ao grupo éster, foi obtido um espectro de RMN de ^{13}C quantitativo (Figura 86, pág. 111) com *delay* de 10 s para permitir a relaxação completa de todos os carbonos. As áreas dos sinais de carbono referentes à cadeia graxa indicaram um total de 18 carbonos, o que permitiu concluir que MF3 tratava-se do estearato de multiflorenol.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 89 e 90, pág. 113), associada aos dados da literatura (Mahato, 1994; Miranda, 2007) e do mapa de contornos HMBC

(Figura 91, 92 e 93, pág. 114 e 115), permitiu atribuir o deslocamento químico dos hidrogênios, bem como associá-los aos seus respectivos carbonos. Foi possível, em uma análise preliminar realizar a atribuição dos deslocamentos químicos de C2 (δ_C 24,23; δ_H 2,25), C3 (δ_C 80,81; δ_H 4,52), C5 (δ_C 50,25; δ_H 1,33), C7 (δ_C 117,52; δ_H 5,46), C9 (δ_C 48,72; δ_H 2,15), C18 (δ_C 46,86; δ_H 1,52), e C2' (δ_C 34,86; δ_H 2,30).

No mapa de contornos HMBC (Figura 91, 92, 93 e 94, pág. 114 e 115) constatou-se que H3 (δ_H 4,52) correlacionou com C2 (δ_C 24,24), C4 (δ_C 37,74), C23 (δ_C 27,67), C24 (δ_C 16,04) e C1' (δ_C 173,68) e o sinal de H2' (δ_H 2,30) correlacionou com o sinal de carbono C1' (δ_C 173,68), confirmando que o grupo éster está ligado no carbono 3 (δ_C 80,81).

As posições das metilas foram determinadas com base no acoplamento de vários sinais de carbono, o que permitiu uma atribuição confiável destes sinais. O sinal do carbono C1 correlacionou com o sinal da metila em 25 (δ_H 0,76), o mesmo ocorrendo com C5 (δ_C 50,25), C9 (δ_C 48,72) e C10 (δ_C 35,07), o que confirmou a posição deste grupo. Os sinais das metilas em δ_C 27,67 (C23) e δ_C 16,04 (C24) foram atribuídos com base nos acoplamentos de C4 (δ_C 37,74) e C5 (δ_C 50,25) com H23 (δ_H 0,85) e H24 (δ_H 0,89). Os acoplamentos de C23/H24 e C24/H23 foram constatados, auxiliando na atribuição dos sinais. O sinal dos hidrogênios metílicos H27 (δ_H 1,08) correlacionou com o sinal de C13 (δ_C 37,02), C14 (δ_C 41,61) e C16 (δ_C 36,06). O sinal de H28 (δ_H 1,06) acoplou com o sinal de C17 (δ_C 30,95), C18 (δ_C 46,86) e C19 (δ_C 36,06). O sinal de H26 (δ_H 1,07) foi atribuído em virtude do acoplamento com C8 (δ_C 147,60) e C15 (δ_C 31,66), contudo o sinal de H21 (δ_H 0,96) foi atribuído devido ao acoplamento deste com C20 (δ_C 28,23) e de H30 (δ_H 0,98) em virtude de sua correlação com C29 (δ_C 33,88). Os demais sinais de MF5 foram atribuídos com base nos dados da literatura (Mahato, 1994; SBDS, 1997).

A posição em β para a ligação da cadeia graxa em C3 foi determinada com base nos valores das constantes de acoplamento de H3/H2eq ($J=4,4$ Hz) e H3/H2ax ($J=11,2$ Hz) coerentes para valores de J em acoplamentos ax/eq e ax/ax, respectivamente, e com a comparação dos dados de deslocamento químico de C3 com dados da literatura de 3 β -O-acetil- multiflorenol (Mahato, 1994; Silverstein, 2005).

A Tabela 9, pág. 116, apresenta a comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MF6 com os da literatura para o acetato de multiflorenol e para a cadeia graxa de 3 β -esteariloxi-urs-12-eno (Mahato, 1994; Miranda, 2006).

A obtenção estearato de multiflorenol a partir do extrato em hexano de folhas de *Maytenus salicifolia* representa o primeiro D:C-friedoleanos isolado de uma espécie da família *Celastraceae* e um composto inédito na literatura.

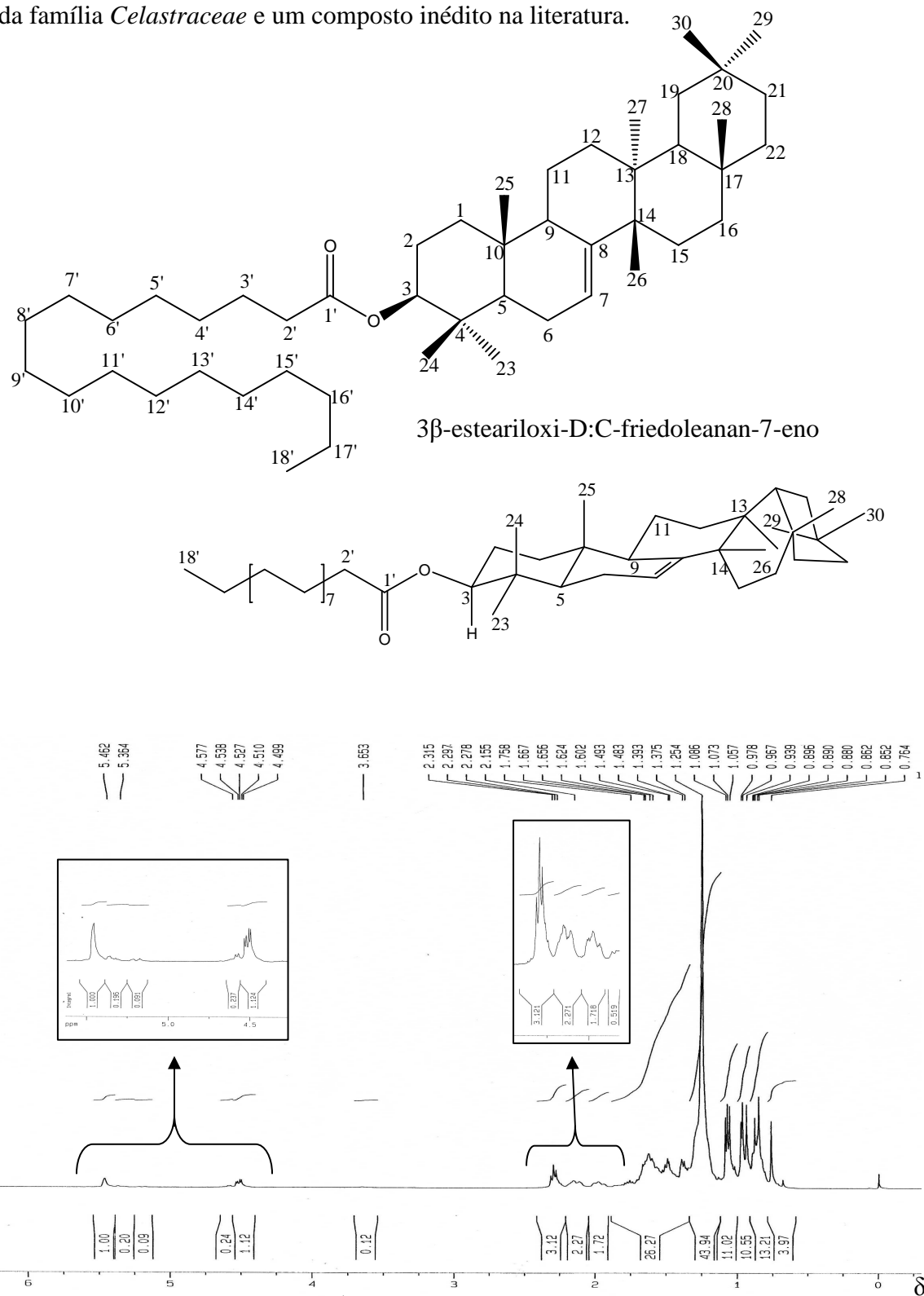


Figura 86: Espectro de RMN de ¹H de MF6 (CDCl₃, 400MHz).

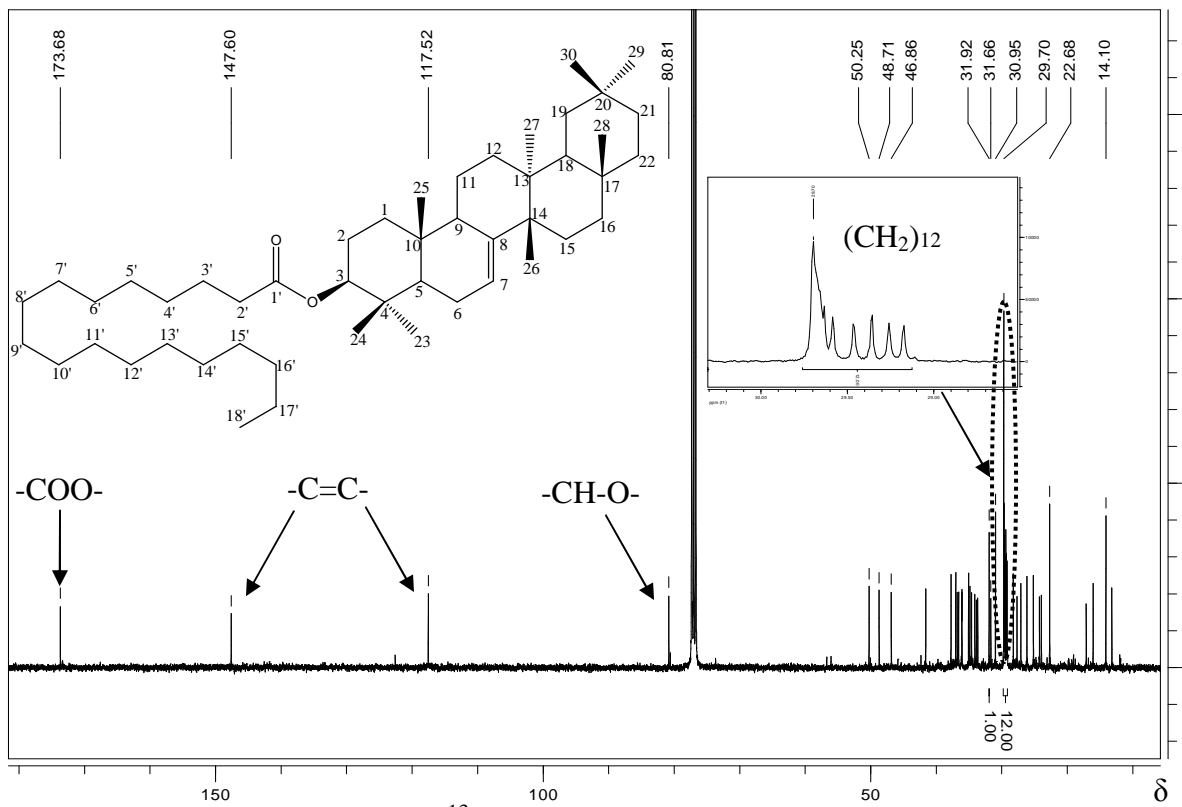


Figura 87: Espectro de RMN de ^{13}C quantitativo de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz).

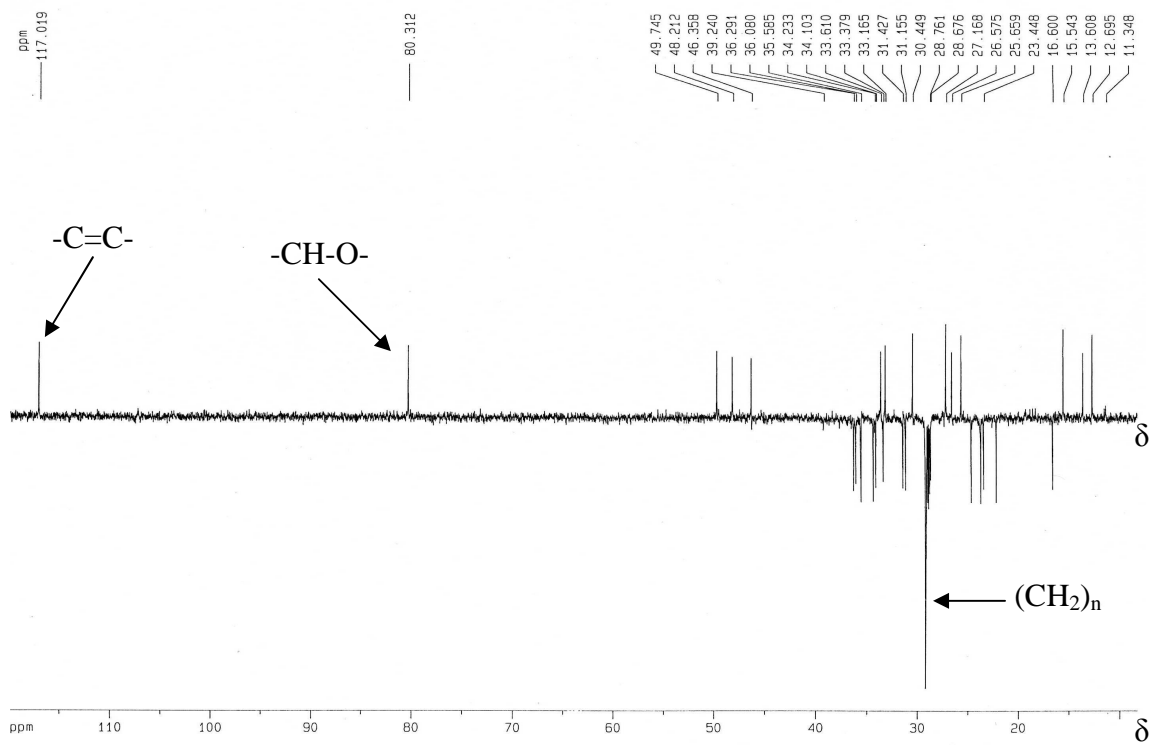


Figura 88: Subespectro DEPT-135 de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz).

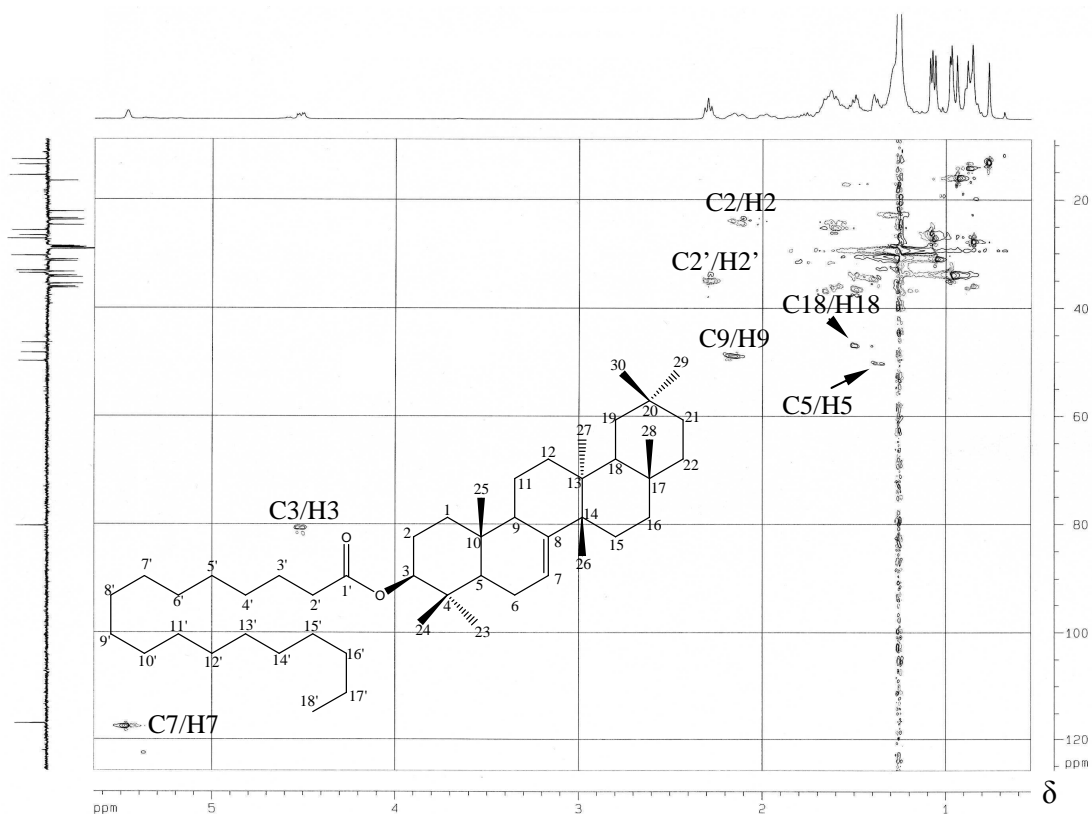


Figura 89: Mapa de contornos HSQC de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz).

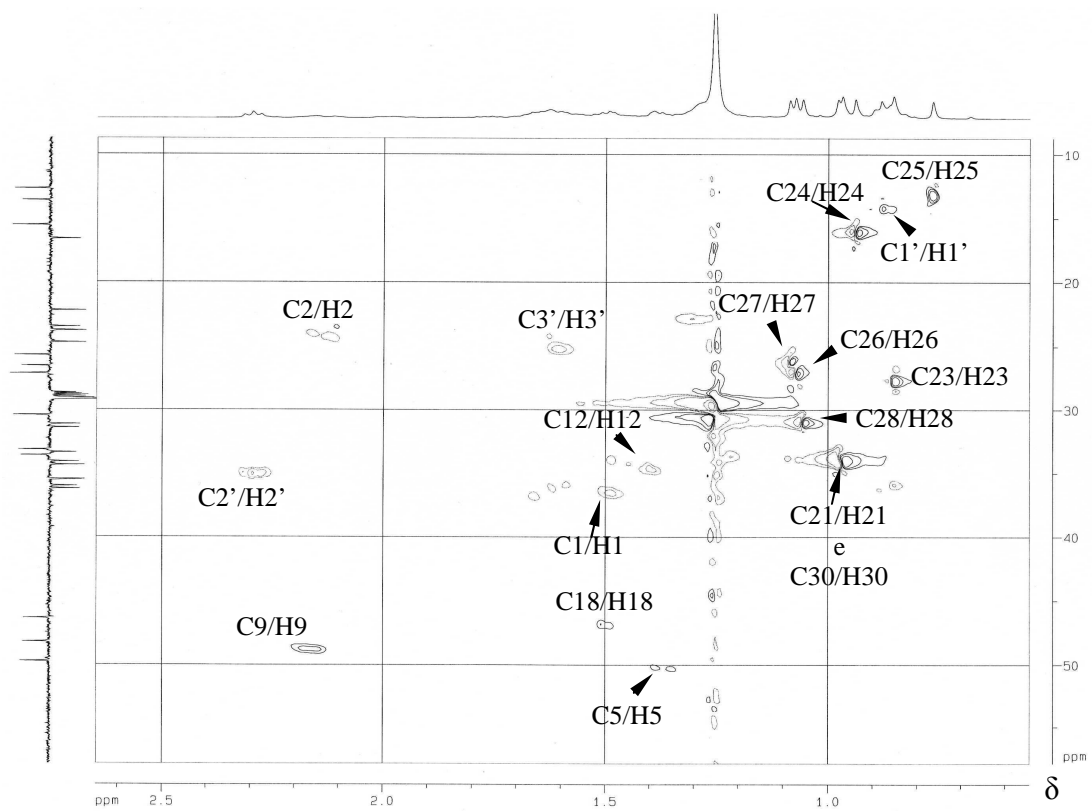


Figura 90: Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 10 a 55.

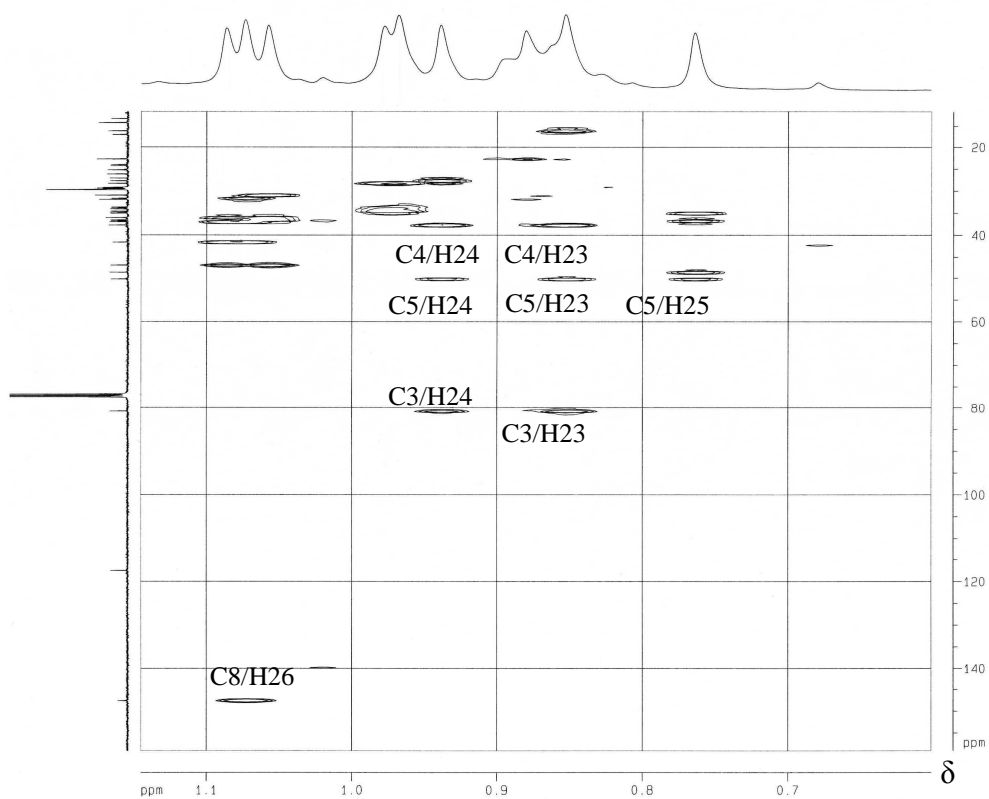


Figura 91: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz):
 δ_c 20 a 150.

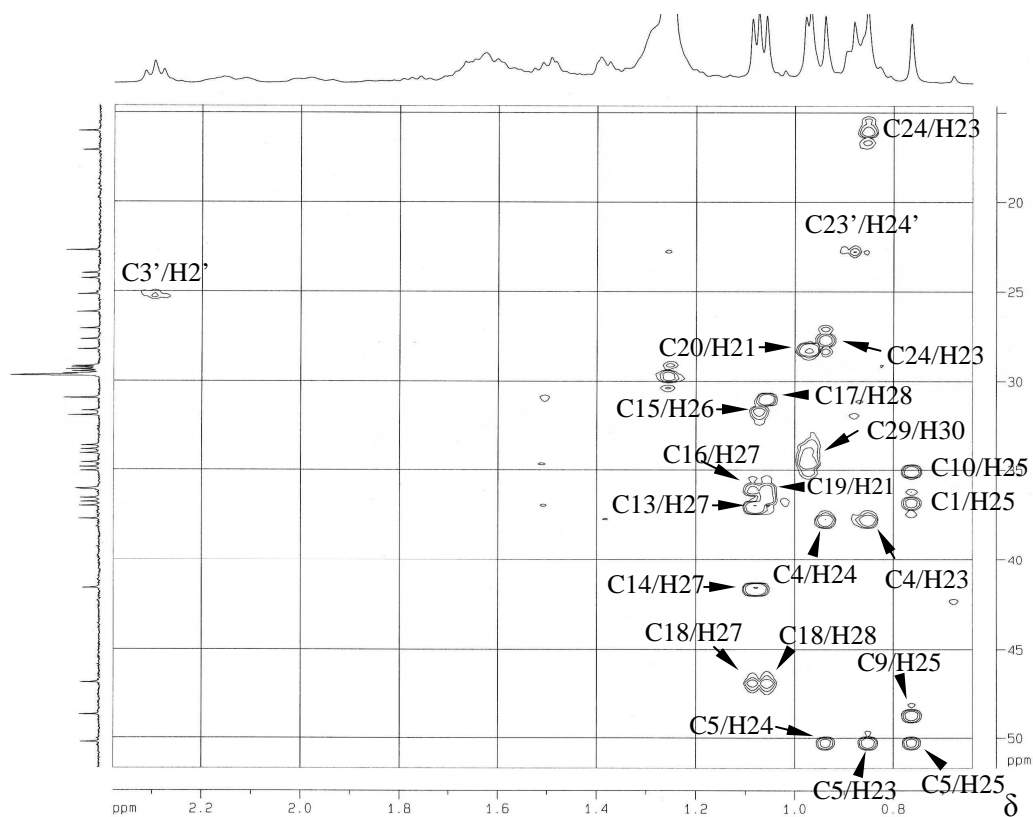


Figura 92: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz):
 δ_c 15 a 50.

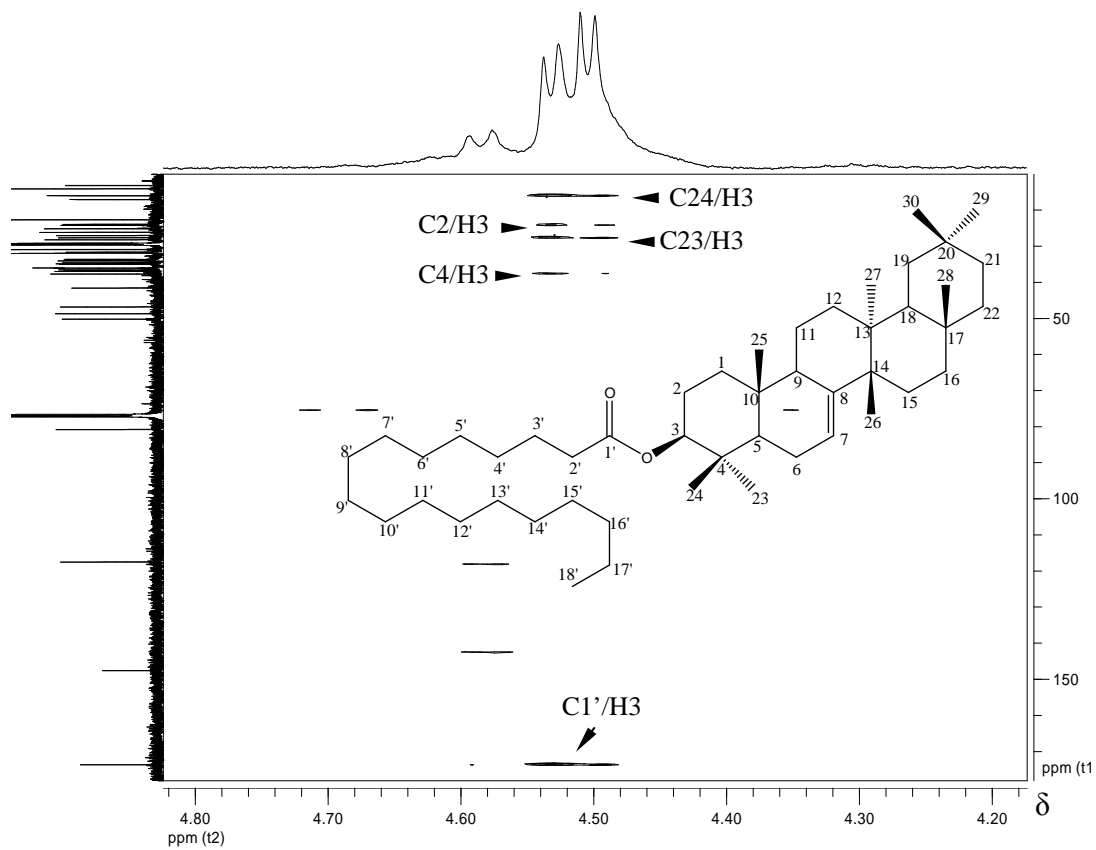


Figura 93: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz):
 δ_c 10 a 180.

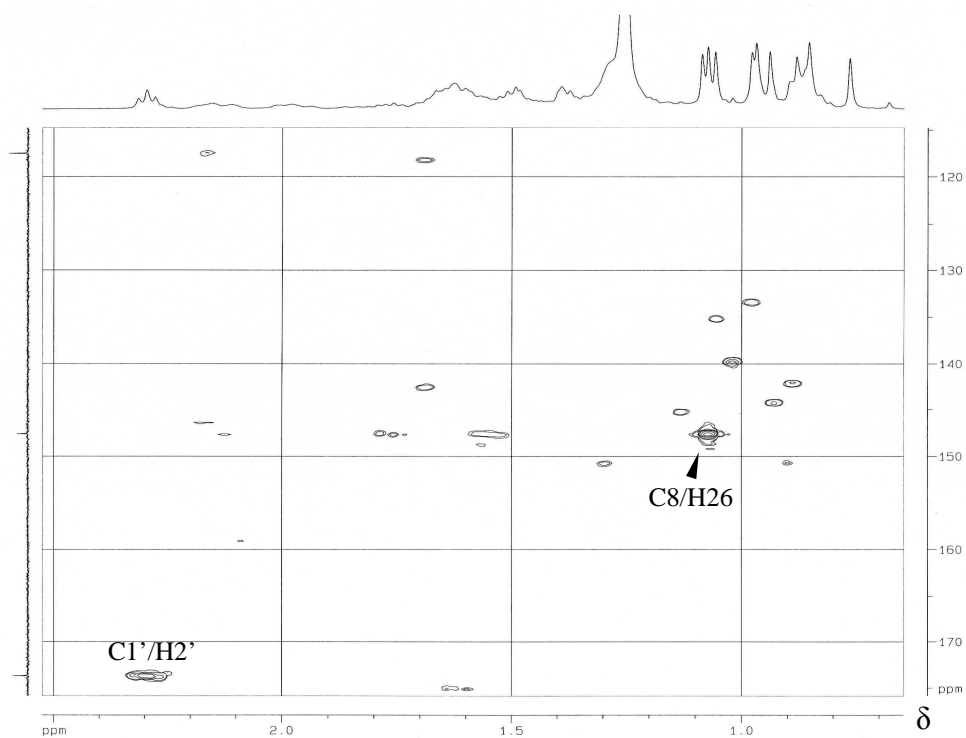


Figura 94: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF6 (CDCl_3 , 100 MHz):
 δ_c 115 a 175.

Tabela 9: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF6 com dados da literatura (Mahato, 1994; SBDS, 1997)

C _n	multifloreinol esterificado ¹	MF6	δ _H (J em Hz)	HMBC	C _n	Cadeia alifática ²	MF6	δ _H (J em Hz)	HMBC
1	36,6	36,80	1,49; m	2, 25	1'	173,68	173,68	-	2', 3
2	24,2	24,24	2,15 m	1	2'	34,87	34,87	2,30;t J=7,6	-
3	81,1	80,81	4,52; dd, J =11,2; 4,4	23, 24	3'	25,20	25,17	1,63	2'
4	37,7	37,74	-	23, 24	4'	29,20	29,18	1,25	-
5	50,2	50,25	1,33; m	23, 24, 25	5'	29,28	29,26	1,25	-
6	24,0	23,95	2,20; m	-	6'	29,38	-	1,25	-
7	117,5	117,52	5,46; s	-	7'	29,60	-	1,25	-
8	147,6	147,60	-	26	8'	29,68	29,36	1,25	-
9	48,7	48,72	2,15; m	25	9'	29,69	29,46	1,25	-
10	35,1	35,07	-	25	10'	29,71	29,70	1,25	-
11	17,1	17,10	0,94; m	-	11'	29,72	29,70	1,25	-
12	34,6	34,61	1,37; m	27	12'	29,72	29,70	1,25	-
13	37,0	37,02	-	-	13'	29,72	29,70	1,25	-
14	41,6	41,61	-	-	14'	29,66	29,64	1,25	-
15	31,7	31,66	1,65 eq, m 1,68 ax, m	16	15'	29,49	29,59	1,25	-
16	36,1	36,06	1,67; m	18, 27	16'	31,95	31,93	1,25	-
17	30,9	30,95	-	28	17'	22,70	22,69	1,25	18'
18	46,9	46,86	1,52; m	27, 28	18'	14,12	14,11	0,87	-
19	36,1	36,06	1,63; m	-					
20	28,2	28,23	-	29, 30					
21	33,9	34,10	0,96; m	-					
22	36,8	36,58	1,71; m	16					
23	27,6	27,67	0,85; s	24					
24	16,0	16,04	0,89; s	23					
25	13,2	13,20	0,76; s	-	-	-	-	-	-
26	27,1	27,08	1,07; s	-	-	-	-	-	-
27	26,1	26,16	1,08; s	-	-	-	-	-	-
28	31,7	30,95	1,06; s	-	-	-	-	-	-
29	34,1	33,88	0,97; s	-	-	-	-	-	-
30	33,7	33,67	0,98; s	-	-	-	-	-	-

1- Dados de ¹³C da porção terpênica de 3β-O-acetil-multifloreinol.

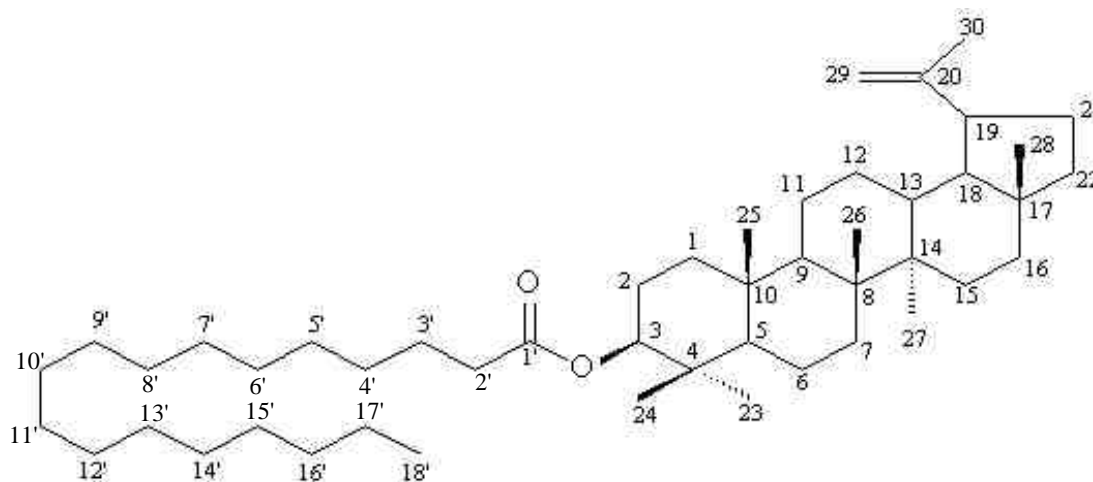
2- Dados de ¹³C da porção graxa de 3β-esteariloxi-urs-12-eno.

5.4.11 MF7: 3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno

O composto denominado de MF7, isolado a partir do extrato em hexano de folhas, apresentou-se como uma graxa translúcida e quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard obteve resultado positivo para triterpeno pentacíclico.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 95, pág. 118) apresentou sinais em δ_{H} 0,79; 0,81; 0,84; 0,87; 0,90; 0,94 e 1,03, referente a sete grupos metila e dois simpletos em δ_{H} 4,57 e 4,68 característicos de hidrogênio de dupla ligação terminal. Um multiplete em δ_{H} 4,48 corresponde a hidrogênio carbinólico, um tripleto em δ_{H} 2,28 ($J=7,0$ Hz), e um sinal intenso em δ_{H} 1,25 sugeriram a presença de uma cadeia lateral ligada ao carbono oxigenado (Miranda, 2007).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 96, pág. 118) mostrou sinais em δ_{C} 109,36 (CH) e 150,98 (C) correspondentes à dupla ligação característica de triterpeno da série lupânica. Observou-se, também, um sinal em δ_{C} 173,75 característico de carbonila de éster, um sinal em δ_{C} 80,64, referente à carbono oxigenado e sinais intensos entre δ_{C} 29,19 e 29,71 referentes a carbonos metilênicos. Estes dados, comparados a literatura (Tabela 10, pág. 119), sugerem que MF7 tratava-se de um triterpeno do tipo lupano, o lupeol, e que apresentava o esterificado na posição 3. Constatou-se, posteriormente, calculando-se o número de carbonos da cadeia lateral pela integração dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C e comparando com dados de Miranda (2007) que MF7 era o 3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno.



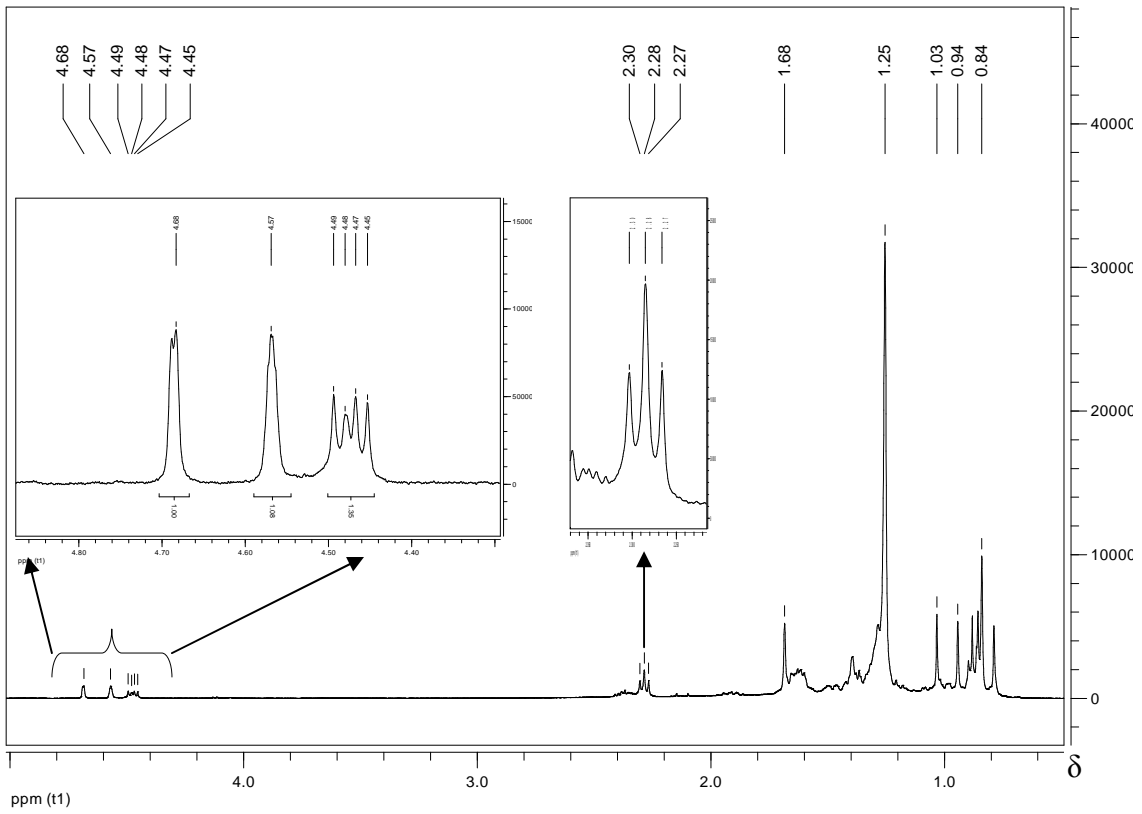


Figura 95: Espectro de RMN de ^1H de MF7 (CDCl_3 ; 400 MHz).

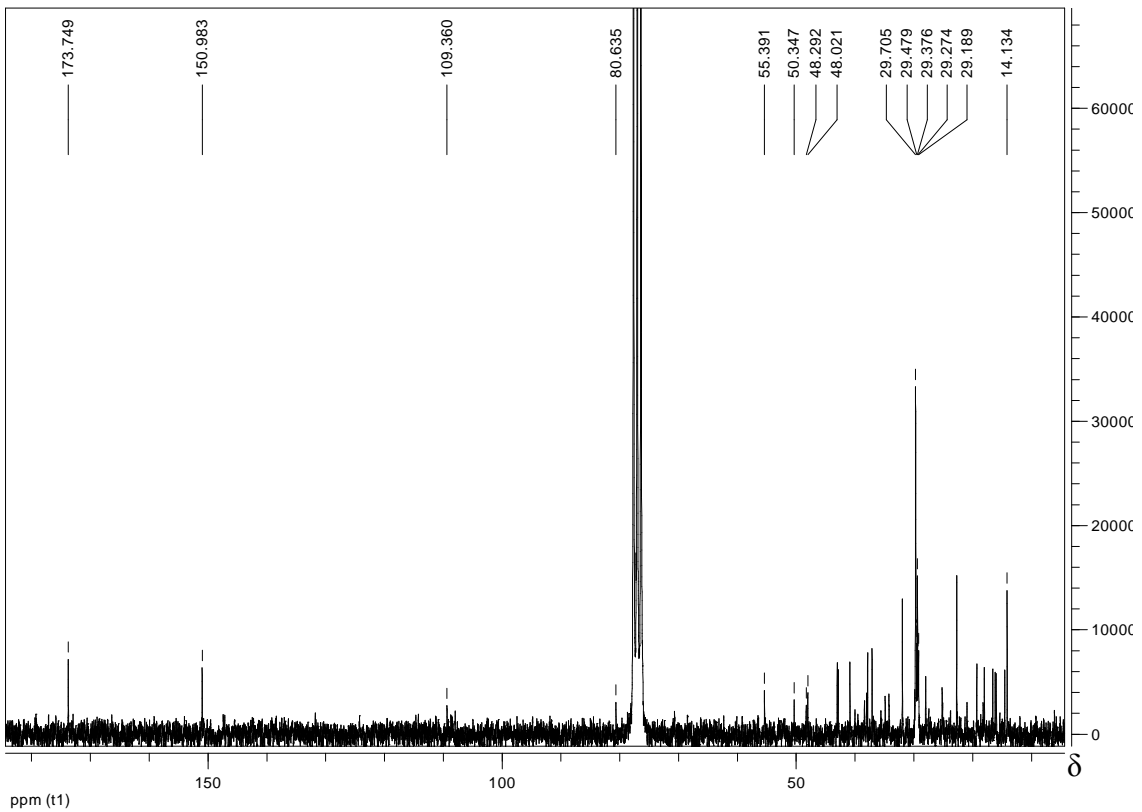


Figura 96: Espectro de RMN de ^{13}C de MF7 (CDCl_3 ; 100 MHz).

Tabela 10: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio de MF7 com dados da literatura para o 3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno (Miranda, 2007)

C _n	3 β -esteariloxi-lup-20(29)-eno	MF7	C _n	Cadeia Alifática	MF7
1	38,43	38,44	1'	173,69	173,75
2	23,78	23,78	2'	34,88	34,88
3	80,65	80,64	3'	25,19	25,19
4	37,87	37,85	4'	29,19	29,19
5	55,44	55,39	5'	29,27	29,27
6	18,24	18,23	6'	29,37	29,37
7	34,27	34,28	7'	29,60	29,60
8	40,91	40,90	8'	29,69	29,69
9	50,40	50,35	9'	29,71	29,71
10	37,14	37,10	10'	29,71	29,71
11	20,99	21,00	11'	29,71	29,71
12	25,15	25,15	12'	29,71	29,71
13	38,11	38,10	13'	29,71	29,71
14	42,88	42,84	14'	29,65	29,65
15	27,48	27,48	15'	29,48	29,48
16	35,65	35,63	16'	31,94	31,94
17	43,03	43,01	17'	22,70	22,71
18	48,35	48,29	18'	14,11	14,13
19	48,04	48,02			
20	150,96	150,98			
21	29,88	29,87			
22	40,03	40,00			
23	28,00	28,01			
24	16,59	16,58			
25	16,18	16,18			
26	16,01	15,98			
27	14,55	14,53			
28	18,03	18,01			
29	109,36	109,36			
30	19,31	19,29			

5.4.12 MF8: 3 α -hidroxi-ursan-12-eno (*epi*- α -amirina), 3 α -hidroxi-olean-12-eno (*epi*- β -amirina) e 3 α -hidroxi-D:C-friedolean-7-eno), (*epi*-multiflorenol)

MF8 se apresentou como um sólido de cor esbranquiçada, que ao ser submetido ao teste de Liebermann-Burchard apresentou resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. A análise em cromatografia em camada delgada revelou uma única mancha, mesmo mudando-se a polaridade do eluente.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 98, pág. 121) apresentou vários sinais entre δ_{H} 0,70 e 2,00, dois sinais em δ_{H} 3,41 e 3,46 referentes a hidrogênios carbinólicos e três sinais em δ_{H} 5,13, 5,18 e 5,48 de hidrogênios olefínicos. A proporção entre as áreas dos sinais e seu número induziram à suspeita de que se tratava de uma mistura.

O espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 (Figura 99 e 100, pág. 121) mostraram a existência de mais de 50 sinais de carbono. O espectro apresentou sinais em δ_{C} 117,75 (CH), 121,80 (CH), 124,49 (CH), 139,58 (C), 145,20 (C) e em δ_{C} 147,80 (C) referentes a carbonos olefínicos hidrogenados e não hidrogenados, respectivamente. Estes dados estão coerentes com os deslocamentos químicos dos carbonos insaturados dos compostos α -amirina, β -amirina e multiflorenol. No entanto, o valor de deslocamento químico do carbono carbinólico C3 sugere que os compostos obtidos sejam epímeros destes compostos, em virtude de valores de deslocamento químico próximos a δ_{C} 80 serem coerentes com valores para hidroxila em beta e valores ao redor de δ_{C} 76 indicarem hidroxila em alfa (Agrawal, 1992; Mahato, 1994; Nakano, 1997). Portanto, os valores de δ_{C} para C3 mostraram-se compatíveis com os correspondentes deslocamentos dos compostos *epi*- α -amirina, *epi*- β -amirina e *epi*-multiflorenol (Tabela 11, pág. 122).

Os sinais de carbono e os valores da literatura estão listados na Tabela 11, pág. 122 (Agrawal, 1992; Mahato, 1994; Nakano, 1997).

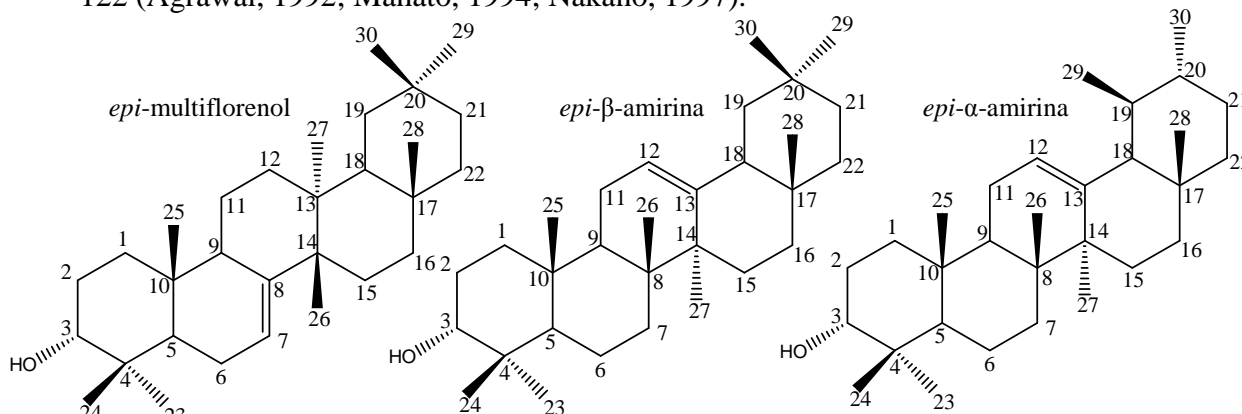


Figura 97: Compostos identificados em MF8 por RMN de H^1 e C^{13} .

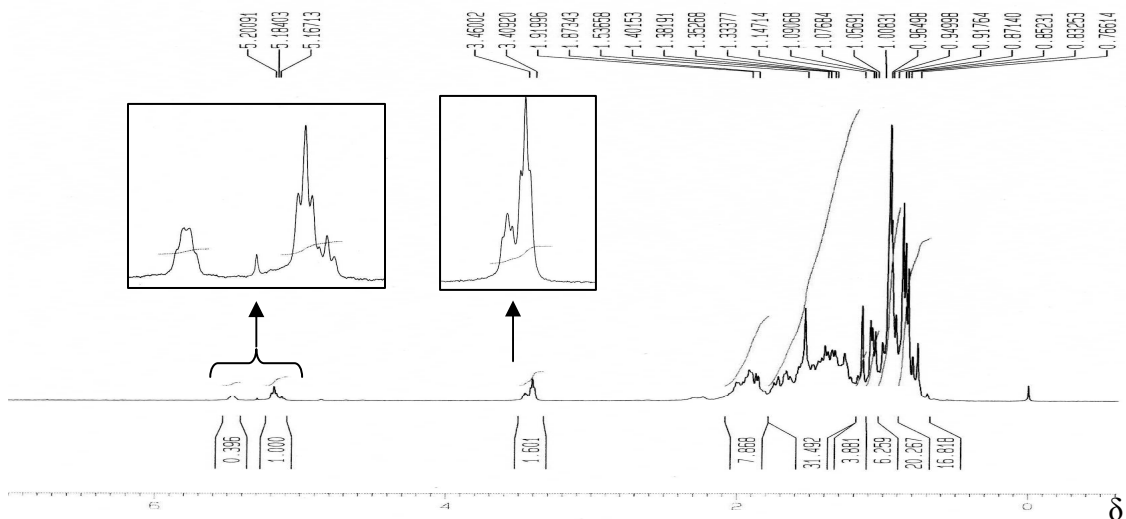


Figura 98: Espectro de RMN de ^1H de MF8 (CDCl_3 , 400MHz).

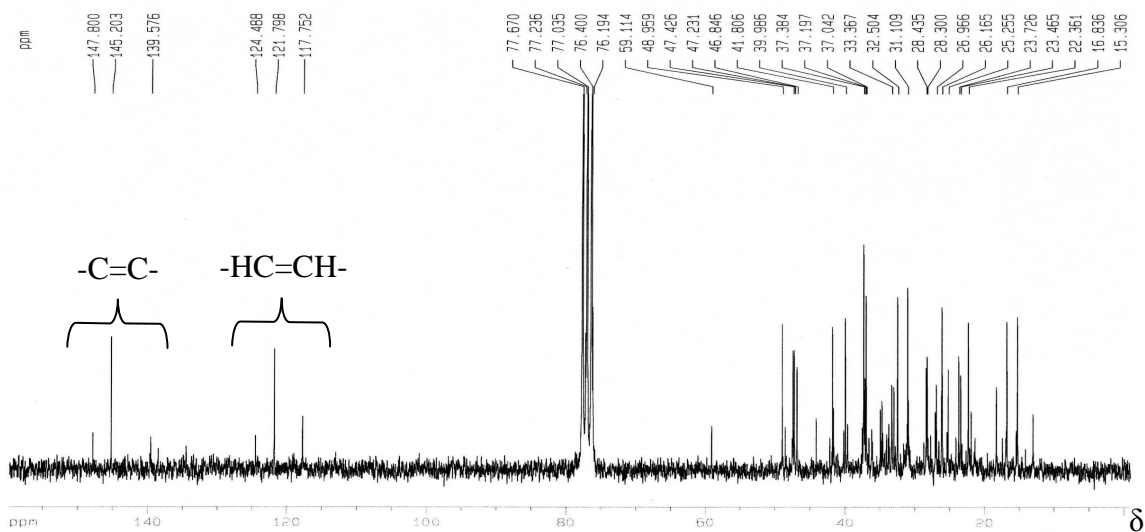


Figura 99: Espectro de RMN de ^{13}C de MF8 (CDCl_3 , 100 MHz).

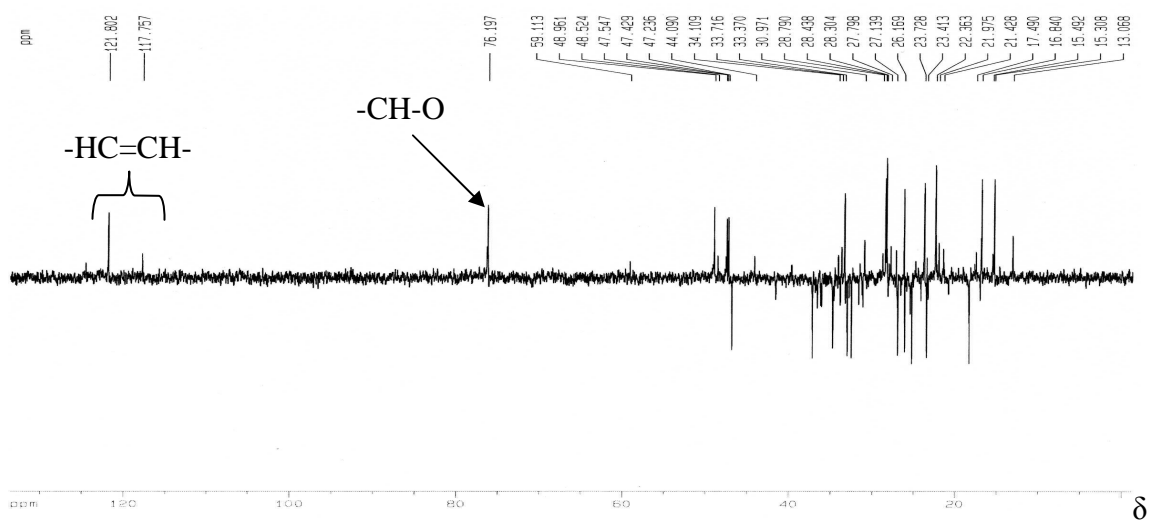


Figura 100: Subespectro DEPT-135 de MF8 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 11: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF8 com dados da literatura (Agrawal, 1992; Mahato, 1994; Nakano, 1997)

Nº	α -amirina	MF8	<i>epi</i> - β -amirina	MF8	multiflorenol ¹	MF8
1	38,7	33,02	33,0	32,50	37,6	32,51
2	27,2	25,41	25,2	25,22	27,6	26,08
3	78,3	76,19	76,1	76,19	79,3	76,19
4	38,7	37,14	37,3	37,29	39,2	37,35
5	55,2	48,92	48,9	48,92	50,7	44,05
6	18,3	18,34	18,3	18,34	24,5	24,10
7	32,9	32,50	32,5	32,55	117,6	117,72
8	40,0	40,17	39,9	39,96	145,7	147,76
9	47,7	47,51	47,4	47,40	48,3	48,50
10	36,9	37,20	37,0	37,04	35,5	34,96
11	23,3	23,38	23,4	23,43	17,5	17,45
12	124,3	124,49	121,8	121,80	33,3	33,33
13	139,3	139,58	145,2	145,20	37,3	37,26
14	42,0	42,15	41,7	41,81	42,5	42,15
15	28,7	28,75	26,1	26,16	30,9	30,96
16	26,6	26,56	26,9	26,97	37,3	37,26
17	33,7	33,77	32,5	32,55	31,6	30,96
18	58,9	59,11	47,2	47,23	45,8	46,81
19	39,6	39,65	46,8	46,85	30,9	36,20
20	39,6	39,65	31,1	31,11	40,6	28,23
21	31,2	31,18	34,7	34,77	29,5	33,86
22	41,5	41,65	37,2	37,38	36,0	36,57
23	28,1	28,22	28,3	28,30	27,8	27,55
24	15,6	15,49	22,3	22,36	15,0	15,46
25	15,6	15,49	15,3	15,31	13,4	13,03
26	16,8	16,84	16,8	16,84	25,2	27,10
27	23,3	23,38	26,1	26,12	27,8	26,09
28	28,1	28,26	28,4	28,44	31,5	31,07
29	17,4	17,45	33,3	33,37	182,8	34,06
30	21,3	21,40	23,7	23,73	33,5	33,74

1- Dados de ¹³C do ácido 3 β -hidroxi-D:C-friedolean-7-en-29-óico.

5.4.13 MF10: 3 β -hidroxi-olean-12-eno (β -amirina) e 3 β -hidroxi-D:C-friedolean-7-eno), (multiflorenol)

MF10 apresentou-se como um sólido de cor esbranquiçada apresentando resultado positivo para triterpenos pentacíclicos quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard. A análise em CCDS revelou uma única mancha, mesmo quando eluído em diferentes misturas de solventes.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 101, pág. 124) revelou a presença de vários sinais entre δ_{H} 0,74 e 2,17, um sinal largo em δ_{H} 3,25 referentes a hidrogênios carbinólicos e dois sinais em δ_{H} 5,18 e 5,48 correspondentes a hidrogênios olefínicos. A proporção dos sinais e seu grande número induziram à suspeita de que se tratava de uma mistura.

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (Figura 102 e 103, pág. 124) sugeriram a existência de mais de 30 sinais de carbono. O espectro apresentou sinais em δ_{C} 117,73 (CH), 121,76 (CH), 145,21 (C) e 147,49 (C) referentes carbonos olefínicos e não hidrogenados, respectivamente.

Os dados obtidos da análise do espectro de RMN de ^1H sugeriram tratar-se de uma mistura de triterpenos pentacíclicos e comparação dos dados de RMN de ^{13}C de MF10 com a literatura (Agrawal, 1992; Mahato, 1994; Nakano, 1997) permitiu inferir que MF10 é constituído principalmente de β -amirina e multiflorenol.

A comparação dos dados de deslocamento químico de ^{13}C dos sinais de multiflorenol identificado em MF10 e estearato de multiflorenol revelou uma concordância entre vários sinais. Isso indica que estes compostos apresentam uma origem biossintética comum, sendo o multiflorenol precursor do estearato de multiflorenol.

No valor da integração dos sinais dos hidrogênios olefínicos, e na altura relativa dos sinais de carbonos olefínicos, foi possível confirmar a existência de β -amirina e multiflorenol e sugerir a proporção aproximada de 1:1 destes constituintes na mistura.

Os sinais de carbono e os valores da literatura estão listados na Tabela 12, pág. 125 (Agrawal, 1992; Mahato, 1994; Nakano, 1997).

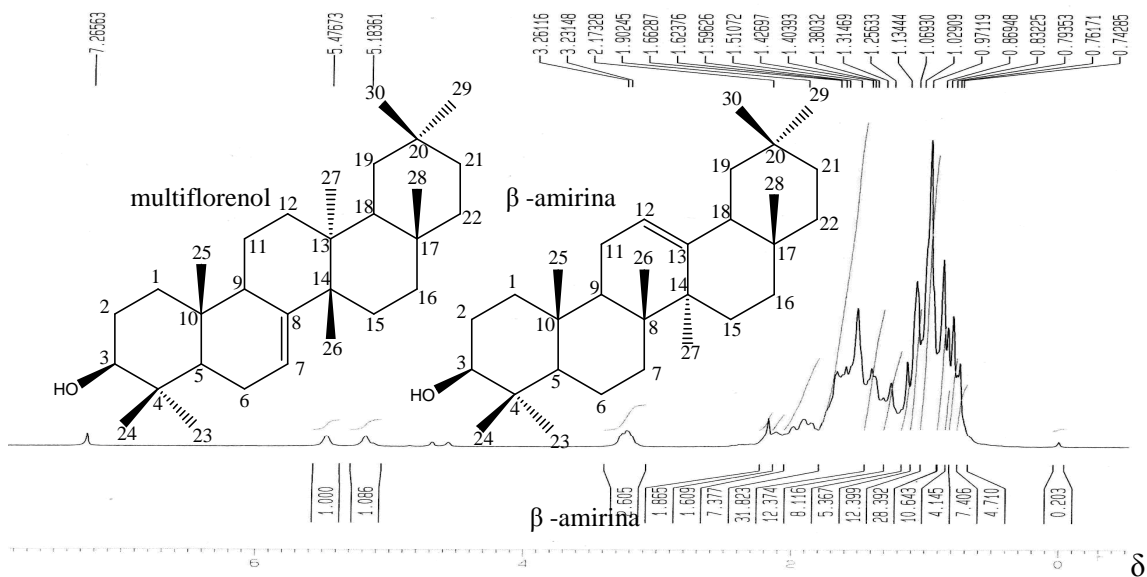


Figura 101: Espectro de RMN de ¹H de MF10 (CDCl₃, 400MHz).

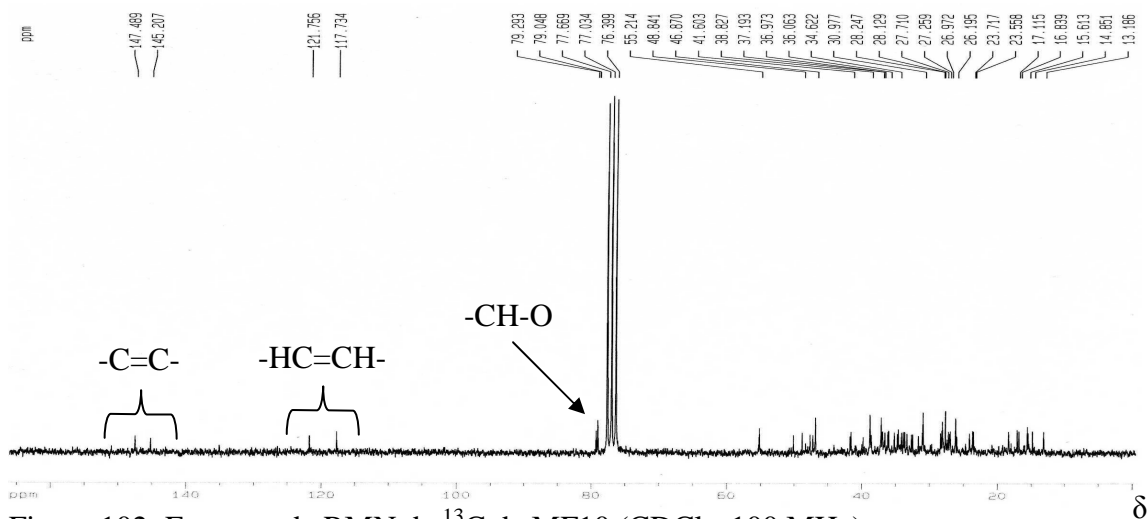


Figura 102: Espectro de RMN de ¹³C de MF10 (CDCl₃, 100 MHz).

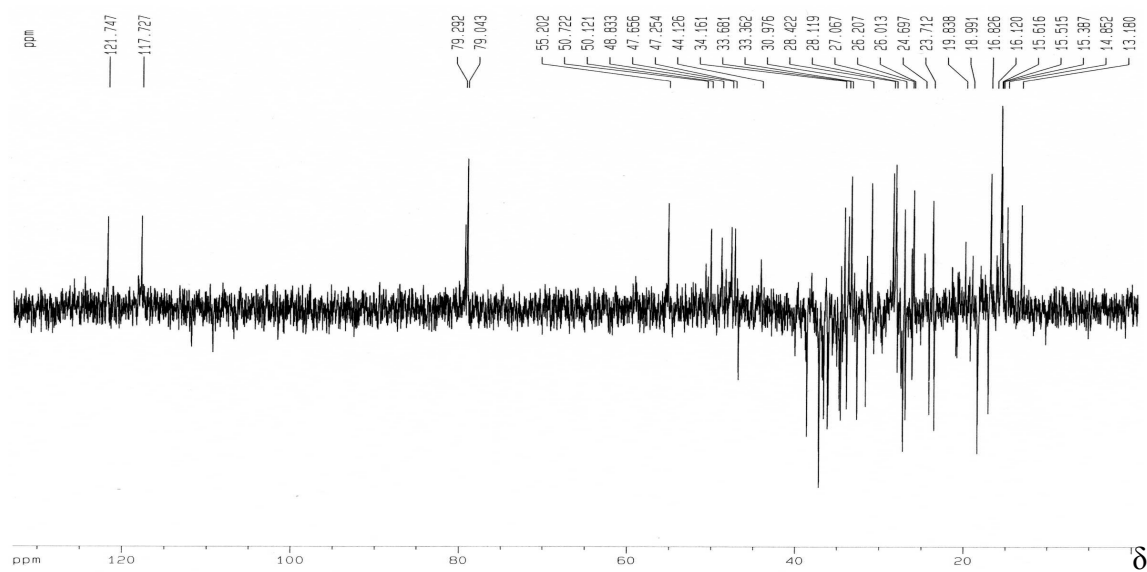


Figura 103: Subespectro DEPT-135 de MF10 (CDCl₃, 100 MHz).

Tabela 12: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF10 com dados da literatura (Agrawal, 1992; Mahato, 1994, Nakano, 1997)

Nº	β -amirina	MF10	multiflorenol ¹	multiflorenol ²	MF10
1	38,7	38,62	37,6	36,6	37,20
2	27,3	27,26	27,6	24,2	27,71
3	79,0	79,04	79,3	81,1	79,29
4	38,8	38,81	39,2	37,7	38,83
5	55,3	55,20	50,7	50,2	50,72
6	18,5	18,99	24,5	24,0	24,70
7	32,8	32,69	117,6	117,5	117,73
8	38,8	38,82	145,7	147,6	147,49
9	47,7	47,66	48,3	48,7	48,83
10	37,6	37,62	35,5	35,1	35,22
11	23,6	23,56	17,5	17,1	17,11
12	121,8	121,75	33,3	34,6	34,62
13	145,1	145,21	37,3	37,0	36,97
14	41,8	41,75	42,5	41,6	41,60
15	26,2	26,19	30,9	31,7	31,66
16	27,0	27,09	37,3	36,1	36,06
17	32,5	32,51	31,6	30,9	31,10
18	47,4	47,25	45,8	46,9	46,87
19	46,9	46,87	30,9	36,1	36,17
20	31,1	31,10	40,6	28,2	28,24
21	34,8	34,76	29,5	33,9	33,90
22	37,2	37,19	36,0	36,8	36,61
23	28,2	28,24	27,8	27,6	27,71
24	15,5	15,51	15,0	16,0	15,38
25	15,6	15,61	13,4	13,2	13,18
26	16,9	16,82	25,2	27,1	27,07
27	26,0	26,01	27,8	26,1	26,01
28	28,4	28,42	31,5	31,7	31,66
29	33,3	33,36	182,8	34,1	34,14
30	23,7	23,72	33,5	33,7	33,68

1- Dados de ¹³C do ácido 3 β -hidroxi-D:C-friedolean-7-en-29-óico.

2- Dados de ¹³C da porção terpênica de 3 β -O-acetil-multiflorenol.

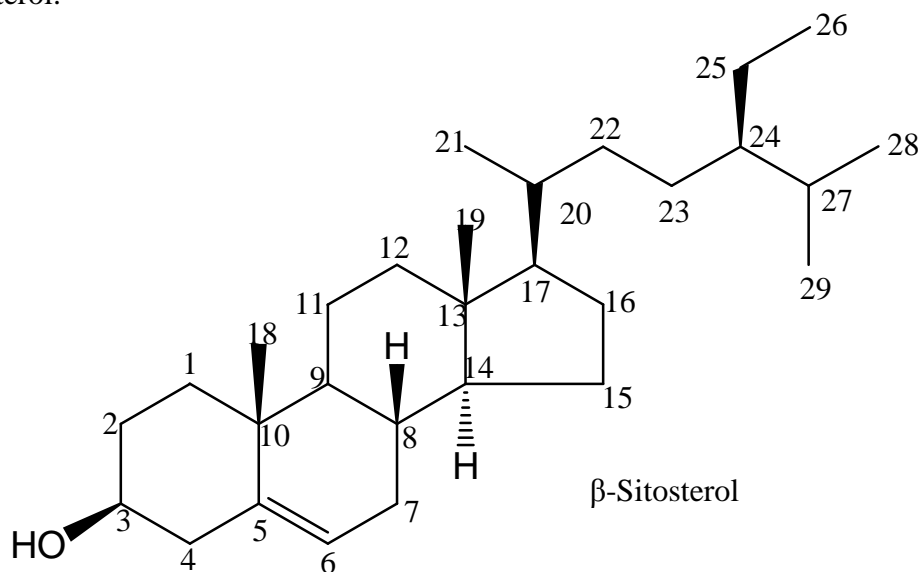
5.4.14 MF11: 3 β -hidroxi-estigmast-5-eno (β -Sitosterol)

MF11 foi obtido do extrato em hexano das folhas, apresentando-se como um sólido branco de ponto de fusão 127,5-129,1 °C. Quando submetido ao teste de Liebermann-Burchard, apresentou coloração azul passando para o verde, resultado característico de esteróides. A análise por CCDS mostrou Rf coincidente para MF9 e padrão de β -sitosterol previamente isolado (Miranda, 2004, Valladão, 2005).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 104, pág. 127) apresentou múltiplos sinais na região de δ_{H} 0,68 a 2,28, que foram atribuídos a hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. O multiplete em δ_{H} 3,52 foi atribuído ao hidrogênio carbinólico H3 e o duplete em δ_{H} 5,35 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H6 (Miranda, 2004, Valladão, 2005).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (Figura 105 e 106, pág. 127 e 128) revelaram a presença de 28 sinais de carbono, sendo 7 metílicos, 11 metilênicos, 8 metínicos e 2 não hidrogenados. Os sinais em δ_{C} 121,71 (CH) e 140,76 (C) foram atribuídos aos carbonos olefínicos C6 e C5, respectivamente, e o sinal em δ_{C} 71,81 (CH) foi atribuído à C3. A atribuição dos demais sinais de carbono deu-se por comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de MF11 com dados da literatura, mostrados na Tabela 13, pág. 128 (Valladão, 2005).

A obtenção do espectro de massas de MF11 por CG/EM (Figura 107, pág. 129) e a comparação com os dados da biblioteca do equipamento possibilitou a confirmação dos dados de RMN, que indicou a identidade deste composto como sendo do esteróide β -sitosterol.



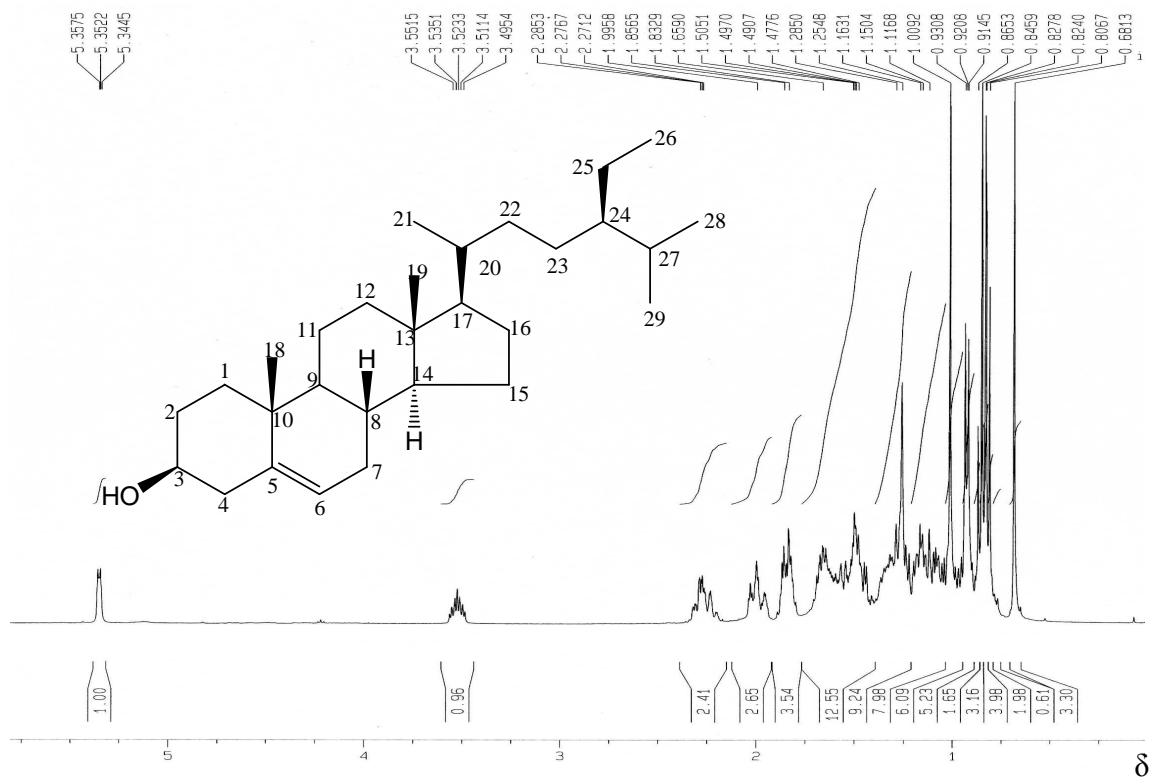


Figura 104: Espectro de RMN de ¹H de MF11 (CDCl₃, 400MHz).

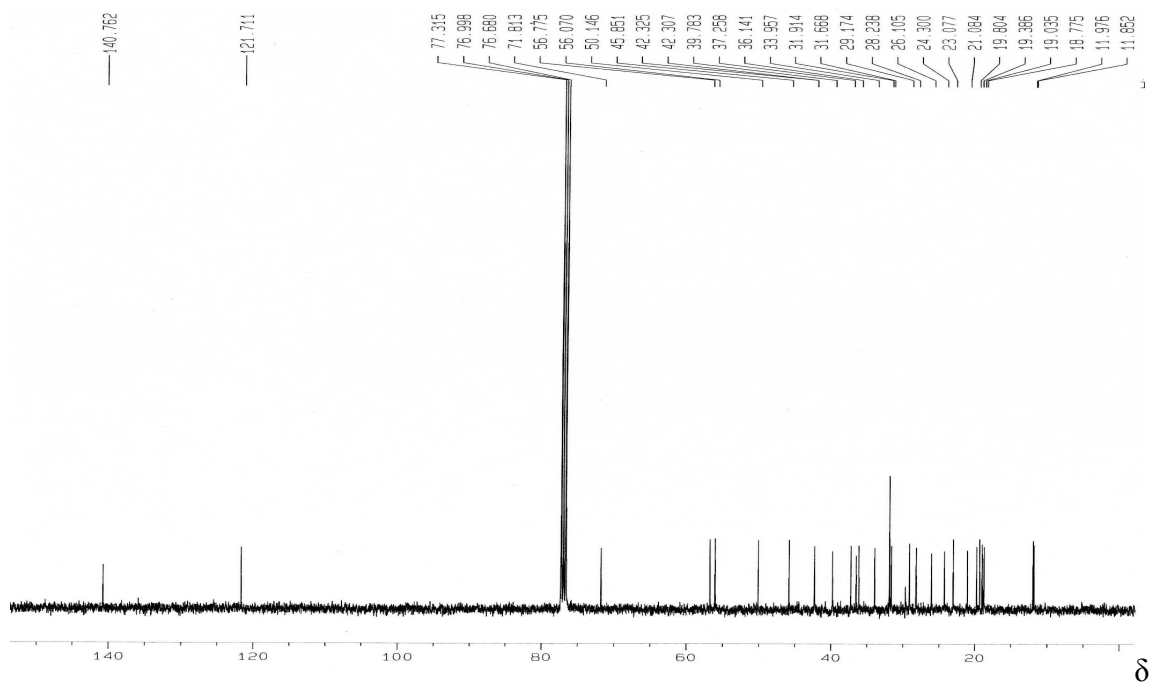


Figura 105: Espectro de RMN de ¹³C de MF11 (CDCl₃, 100 MHz).

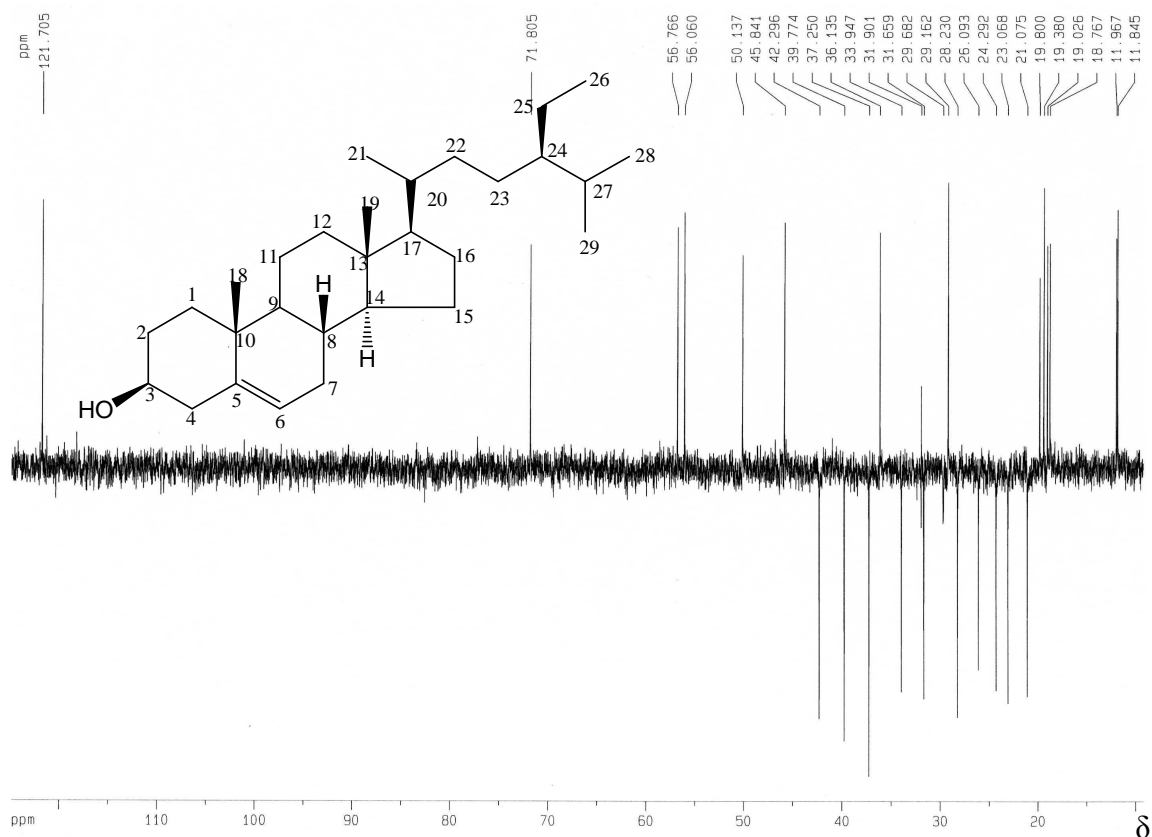


Figura 106: Subespectro DEPT-135 de MF11 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 13: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF11 (β -sitosterol) com dados da literatura (Valladão, 2005)

C_n	MF11	β -sitosterol	C_n	MF11	β -sitosterol
1	37,28	37,25	16	28,26	28,25
2	31,69	31,65	17	56,09	56,05
3	71,74	71,80	18	11,99	11,86
4	42,35	42,32	19	19,41	19,40
5	140,78	140,75	20	36,17	36,15
6	121,73	121,72	21	18,80	18,78
7	31,94	31,89	22	33,98	33,94
8	31,94	31,92	23	26,13	26,06
9	50,17	50,13	24	45,88	45,89
10	36,53	36,50	25	29,20	29,14
11	21,10	21,08	26	19,83	19,83
12	39,80	39,77	27	19,06	19,03
13	42,33	42,32	28	23,10	23,06
14	56,80	56,76	29	11,99	11,98
15	24,32	24,31			

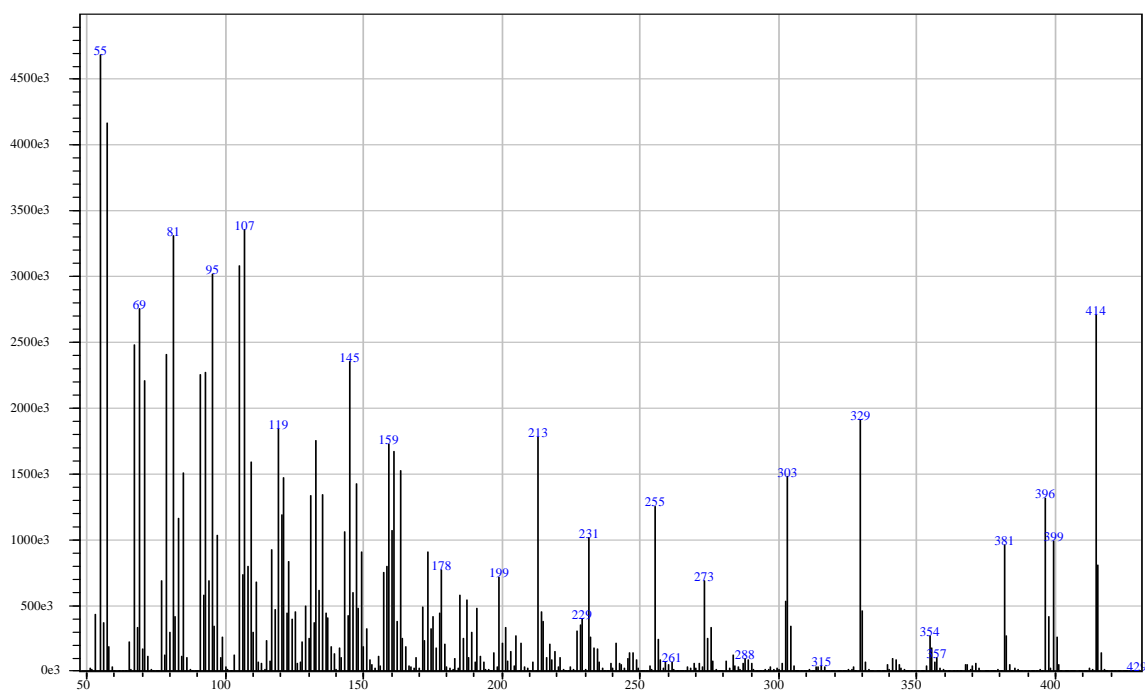


Figura 107: Espectro de massas obtido de MF11 por CG/EM.

5.4.15 MF12: Campesterol

A análise de MF11 por CG/MS (Figura 108) obtido do extrato em hexano das folhas, revelou uma impureza. O espectro de massas desta substância (Figura 109, pág. 130) foi confrontado com os dados do banco de dados do *software* (NIST147 e NIST25) que identificaram a impureza como sendo o campesterol. A comparação dos dados de fragmentação obtidos com os da literatura (Cortez, 1998) mostrou que realmente se tratava do esteróide campesterol.

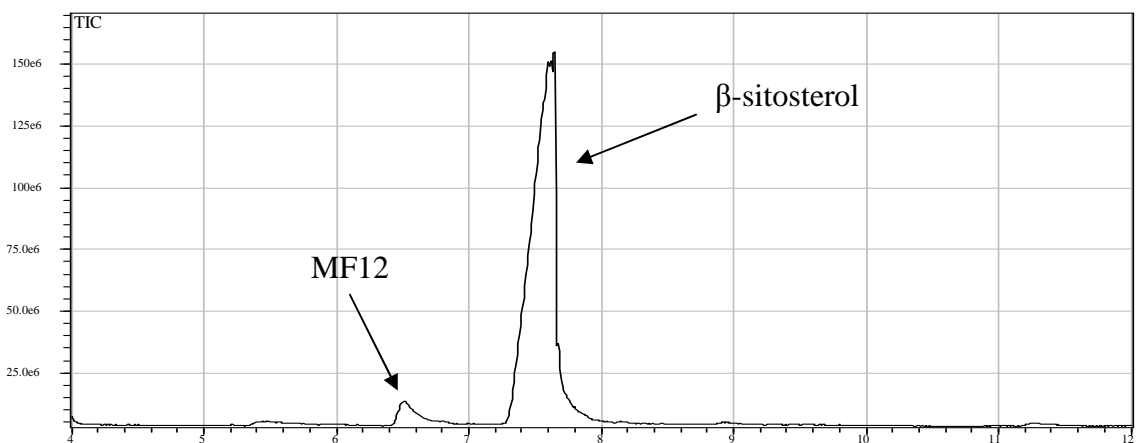


Figura 108: Cromatograma obtido de MF12 por CG/EM.

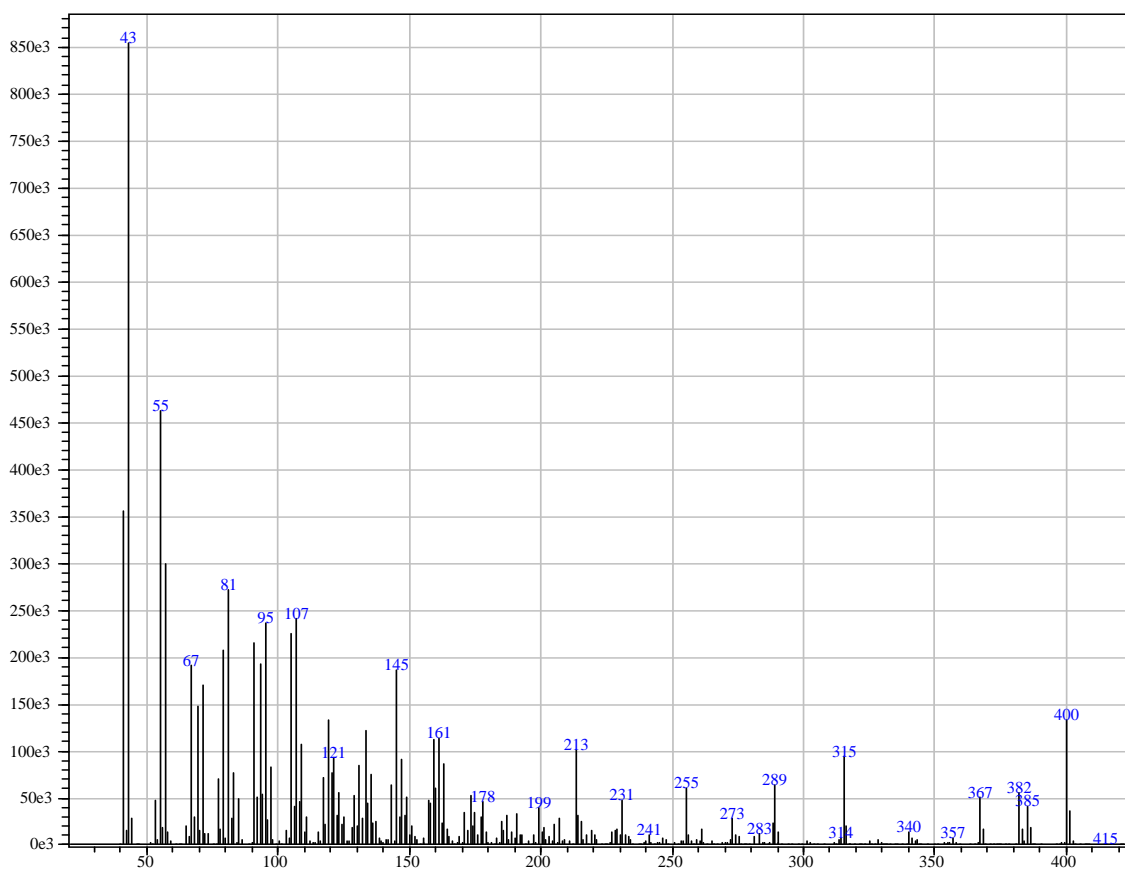
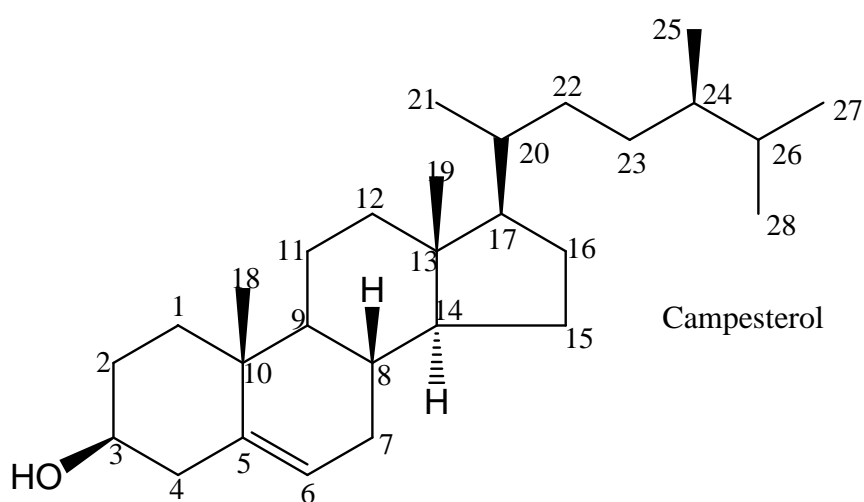


Figura 109: Espectro de massas obtido de MF12 por CG/EM.



5.4.16 MF13: 1 β ,3 α -dihidroxi-D:C-friedoleanan-7-eno (1 β -hidroxi-*epi*-multiflorenol)

MF13 apresentou-se como um sólido branco com ponto de fusão de 250-254°C que submetido ao teste de Liebermann-Burchard resultou positivo para triterpeno pentacíclico.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 110, pág. 133) apresentou um duplete em δ_{H} 5,48 ($J=3,6$ Hz) e o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 111, pág. 133) apresentou sinais em δ_{C} 147,76 (C) e 117,72 (CH). Comparando estes dados com os da literatura (Mahato, 1994), chegou-se à conclusão que MF10 tratava-se de um triterpeno pentacíclico da classe dos D:C-friedoleanano.

Uma análise detalhada do espectro de RMN de ^1H (Figura 110, pág. 133) revelou oito simpletos localizados em δ_{H} 0,82; 0,91; 0,94; 0,96; 0,98 1,05; 1,09 e 1,10, correspondentes a oito metilas. Um duplo duplete em δ_{H} 4,00 ($J=10,8$ e 5,6 Hz) e um tripleto deformado em δ_{H} 3,57 ($J=3,2$ Hz) indicaram a presença de dois hidrogênios ligados a dois carbonos oxigenados.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figura 111 e 112, pág. 133 e 134) foram observados dois sinais em δ_{C} 77,10 e 73,13, referentes a dois carbonos oxigenados. Os dados obtidos sugeriram que MF10 tratava-se de um D:C-friedoleanano dihidroxilado.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figuras 113 e 114, pág. 134 e 135) associada aos dados da literatura (Mahato, 1994) e do mapa de contornos HMBC (Figuras 114, 115 e 116, pág. 135 e 136) permitiram atribuir os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios aos seus respectivos carbonos. Foi possível, em uma análise preliminar efetuar a confirmação dos valores de deslocamento químico de C1 (δ_{C} 73,13; δ_{H} 4,00), C3 (δ_{C} 77,10; δ_{H} 3,57), C5 (δ_{C} 43,57; δ_{H} 1,85), C7 (δ_{C} 117,72; δ_{H} 5,48), C9 (δ_{C} 49,35; δ_{H} 2,50) e C18 (δ_{C} 46,96; δ_{H} 1,52).

No mapa de contornos HMBC (Figuras 115, 116 e 117, pág. 135 e 136) constatou-se que o sinal de C3 (δ_{C} 77,10) correlacionou com o sinal de H23 (δ_{H} 0,94) e H24 (δ_{C} 0,91), e o sinal de C1 (δ_{C} 73,13) correlacionou com o sinal de H25 (δ_{H} 0,82) confirmando que as duas hidroxilas estavam localizadas nos carbonos 1 e 3. As posições das metilas foram determinadas com base no acoplamento de vários sinais de carbono, o que permitiu uma atribuição confiável destes sinais. O carbono C1 (δ_{C} 73,13) correlacionou com o sinal dos hidrogênios do grupo metila C25 (δ_{H} 0,82). O sinal de H25 correlacionou também com os carbonos C5 (δ_{C} 43,57), C9 (δ_{C} 49,35) e C10 (δ_{C}

41,08), o que possibilitou confirmar a posição da metila C25 (δ_C 7,28). Os sinais dos hidrogênios dos grupos metila em C23 e C24 foram atribuídos com base nos acoplamentos com C4 (δ_C 37,35) e C5 (δ_C 43,57). Os acoplamentos C23/H24 e C24/H23 também foram constatados, o que permitiu uma fiel atribuição desses sinais. O sinal dos hidrogênios H27 (δ_H 1,05) correlacionou com o sinal de C13 (δ_C 36,58) e C18 (δ_C 46,96), e o sinal de H28 acoplou com o sinal de C17 (δ_C 30,95) e C18 (δ_C 46,96). O sinal de H30 (δ_H 0,96) foi atribuído em virtude do acoplamento com o sinal de C20 (δ_C 28,21) e C29 (δ_C 34,38). O sinal de H29 (δ_H 0,98) acoplou com o sinal de C20 (δ_C 28,21). O sinal de hidrogênios de H26 (δ_H 1,10) correlacionou com o sinal de C8 (δ_C 147,76), C13 (δ_C 36,58) e C15 (δ_C 31,69). Por fim, os demais sinais de deslocamento químico foram atribuídos por análise detalhada dos mapas de contorno HMBC e por comparação com dados da literatura.

O experimento NOESY (Figura 118, pág. 137), realizado para confirmar a estereoquímica do composto revelou interações entre os hidrogênios H1/H5, H1/H6 e H1/H9. O sinal do hidrogênio H3 interagiu com H23 e H24, e o hidrogênio H7 correlacionou com H6 e H15. Por outro lado, o hidrogênio H9 correlacionou com H5, o que já era de se esperar, e correlacionou, também, com H27. O acoplamento H9/H27 indicou que a metila C27 encontrava-se em posição alfa.

A comparação dos dados de deslocamento químico de ^{13}C dos sinais de *epi*-multiflorenol presente na mistura denominada por MF8 e 1 β -hidroxi-*epi*-multiflorenol revelou uma concordância entre vários sinais. Isso indica que estes compostos apresentam uma origem biossintética comum, sendo o *epi*-multiflorenol precursor de 1 β -hidroxi-*epi*-multiflorenol.

A análise do espectro de massas de MF13 por CG/EM (Figura 119, pág. 137) corroborou com a hipótese de uma triterpeno dihidroxilado para o composto MF13.

A Tabela 14 (pág. 138) apresenta a comparação entre dados de RMN de ^{13}C de MF13 com os da literatura para o multiflorenol (Mahato, 1994). Não foram encontrados relatos na literatura referente ao diol isolado de *M. salicifolia*.

A identificação de multiflorenol e *epi*-multiflorenol presente em duas misturas, juntamente com tetracosanoato de multiflorenol e 1 β -hidroxi-*epi*-multiflorenol, constituem uma grande contribuição para o estudo quimiotaxonômico da família *Celastraceae*, uma vez que são os primeiros D:C-friedoleananos isolados de uma espécie da família *Celastraceae*.

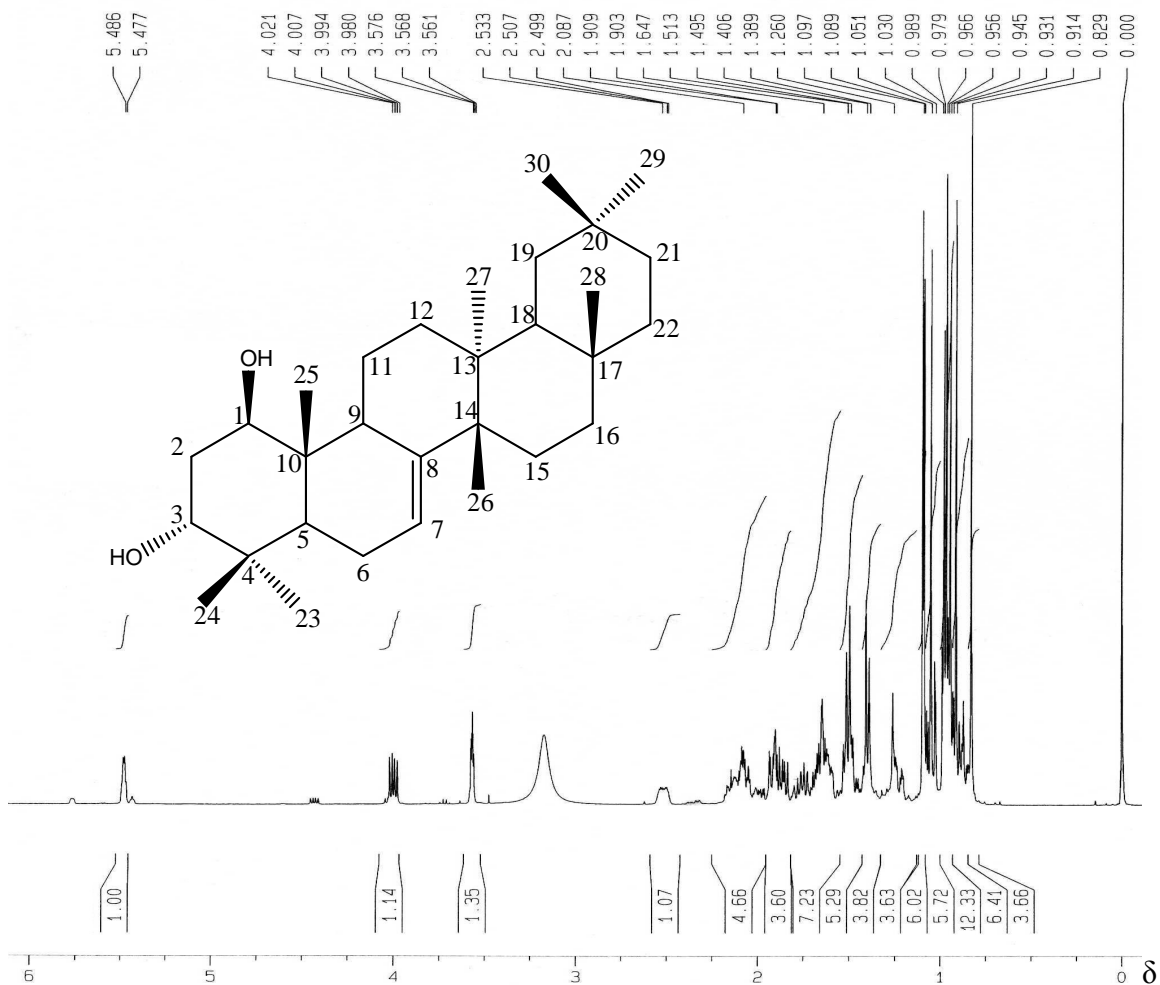


Figura 110: Espectro de RMN de ^1H de MF13 (CDCl_3 , 400MHz).

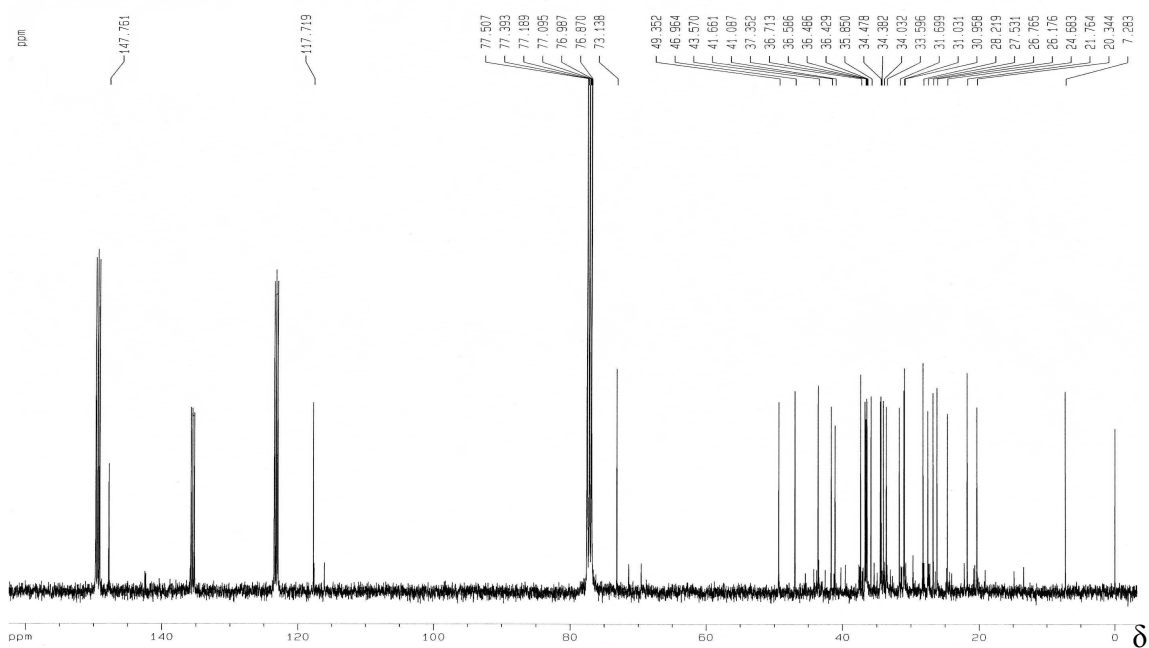


Figura 111: Espectro de RMN de ^{13}C de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz).

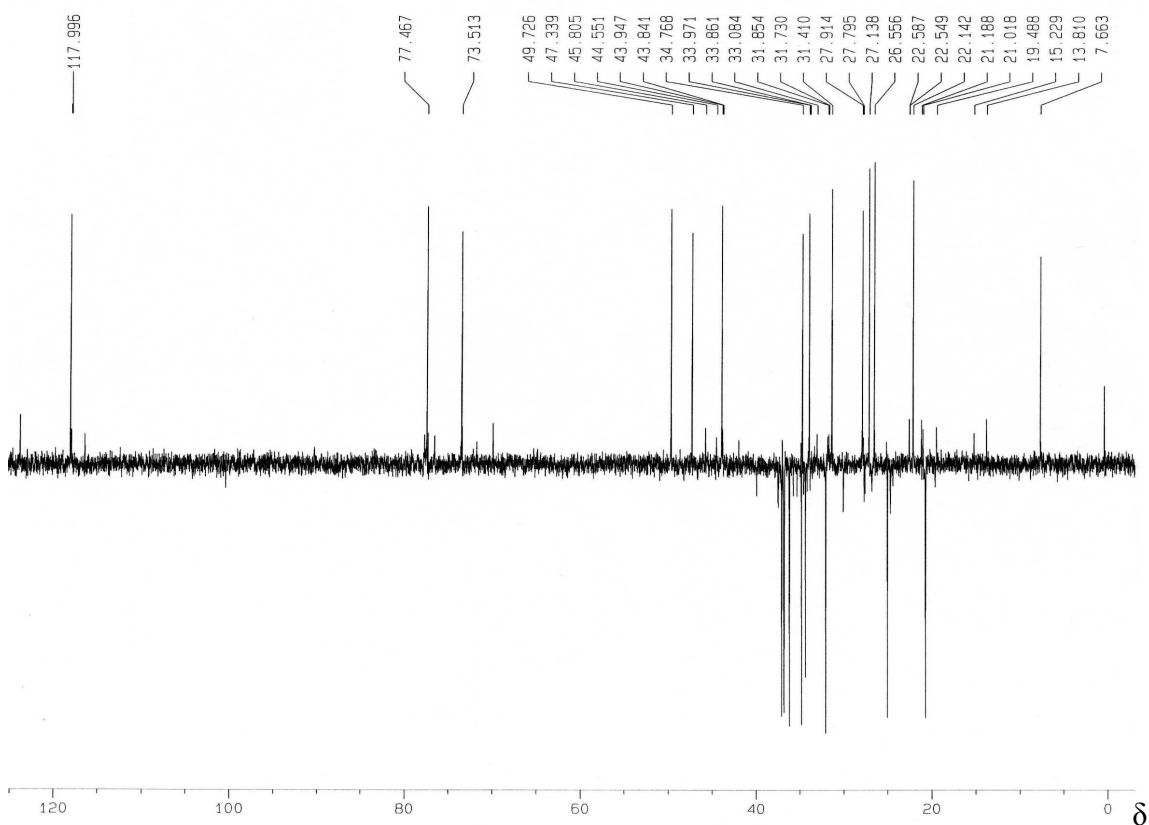


Figura 112: Subespectro DEPT-135 de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz).

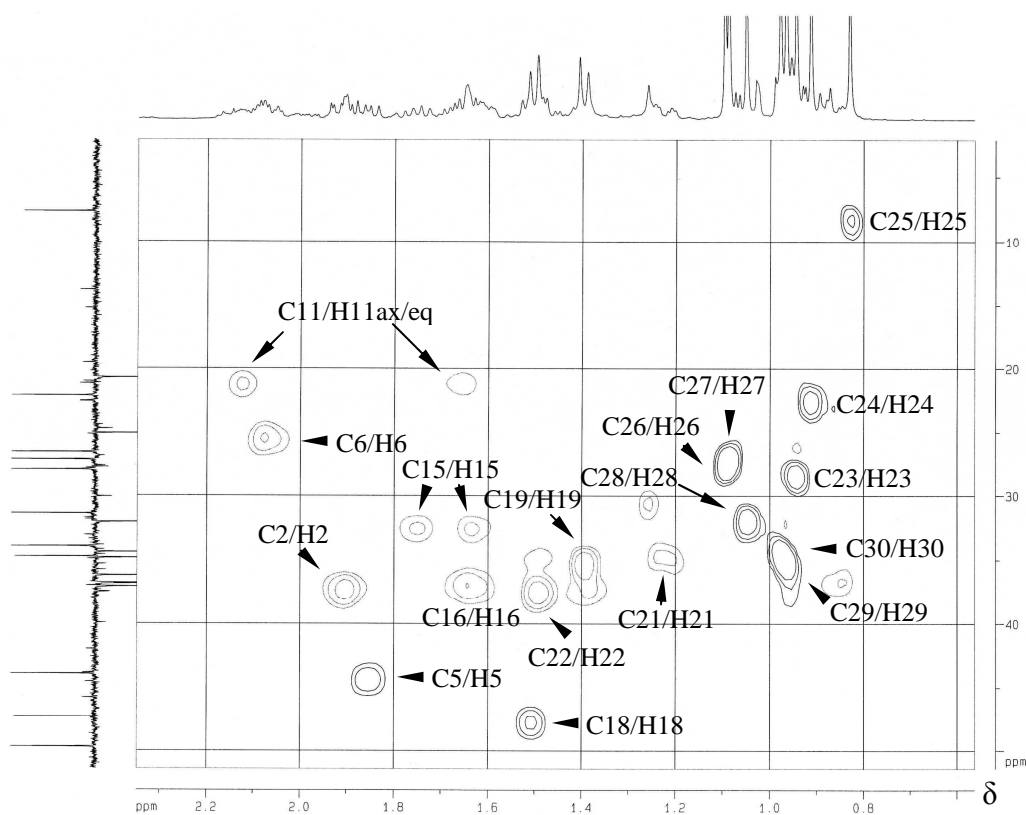


Figura 113: Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 0 a 50.

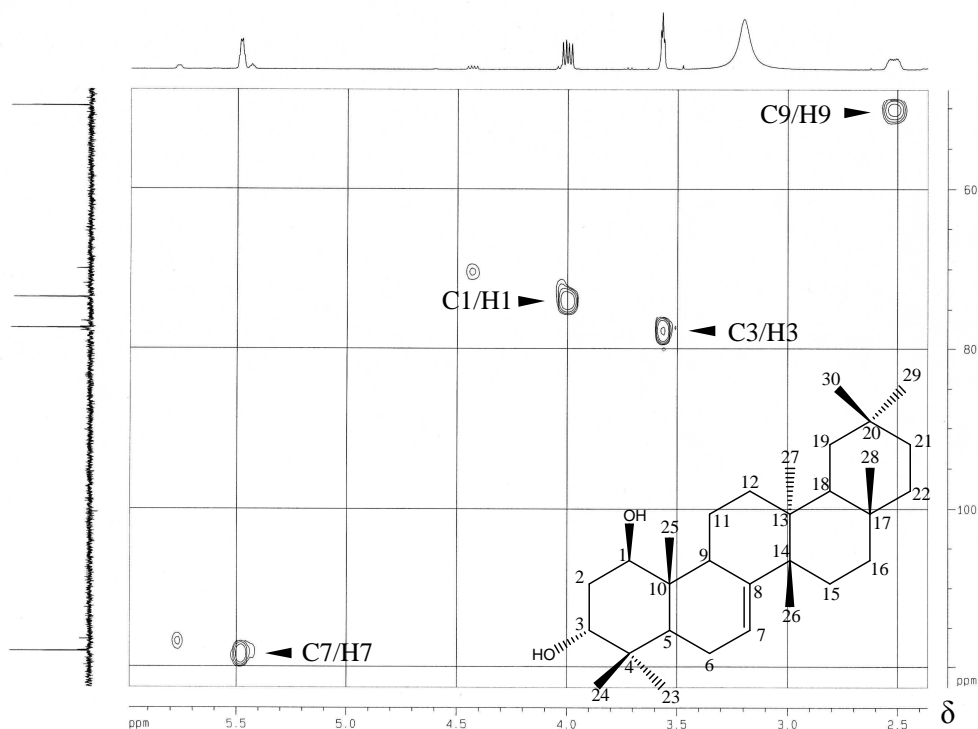


Figura 114: Seção expandida do mapa de contornos HSQC de MF10 (CDCl₃, 100 MHz): δ_c 45 a 150.

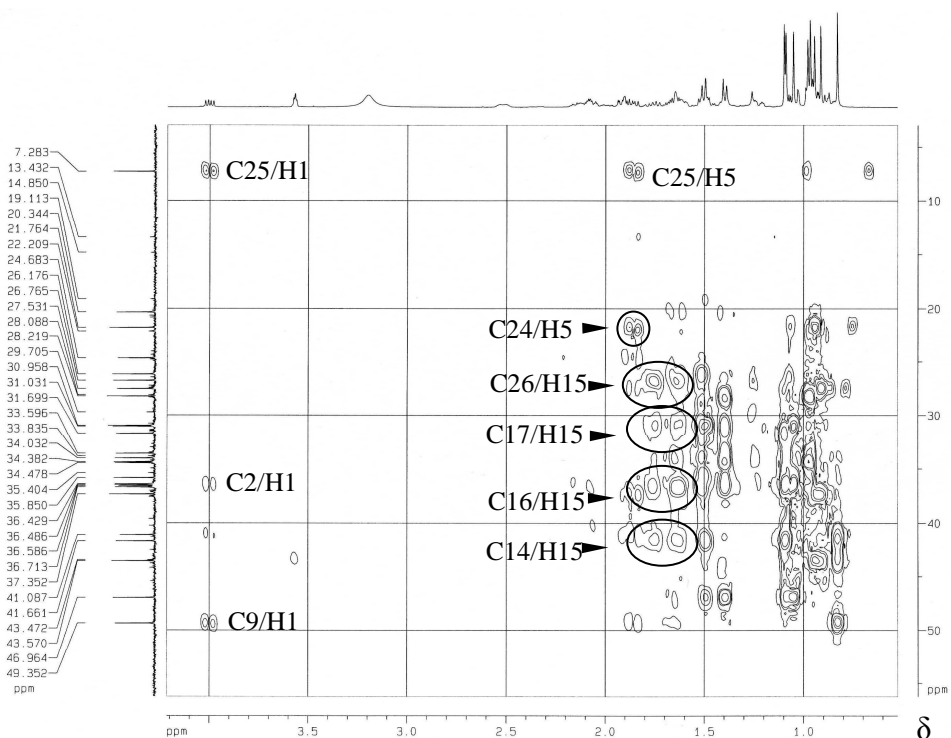


Figura 115: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF13 (CDCl₃, 100 MHz): δ_c 5 a 55.

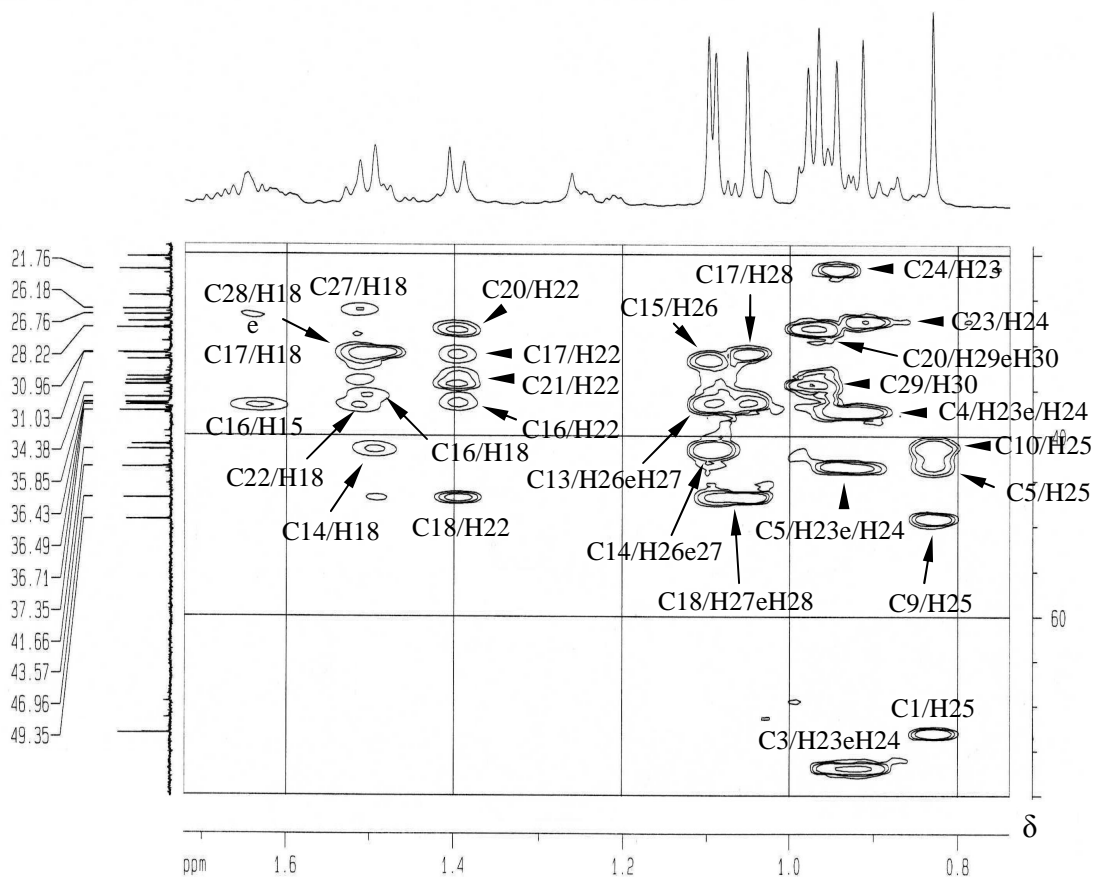


Figura 116: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 20 a 80.

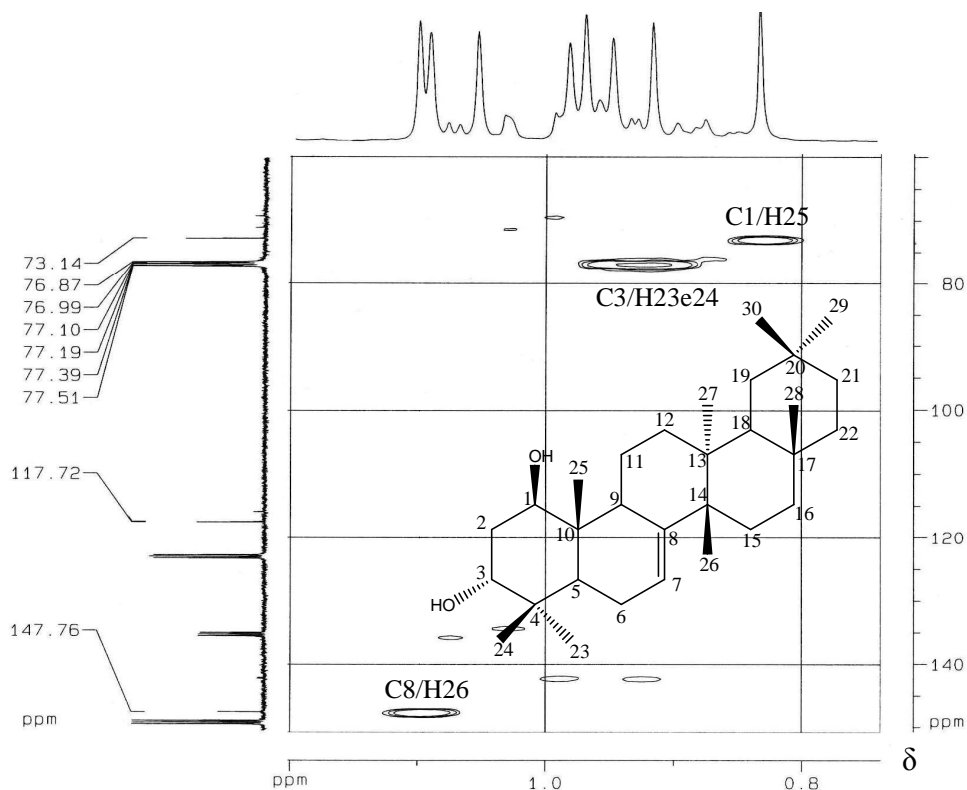


Figura 117: Seção expandida do mapa de contornos HMBC de MF13 (CDCl_3 , 100 MHz): δ_c 60 a 150.

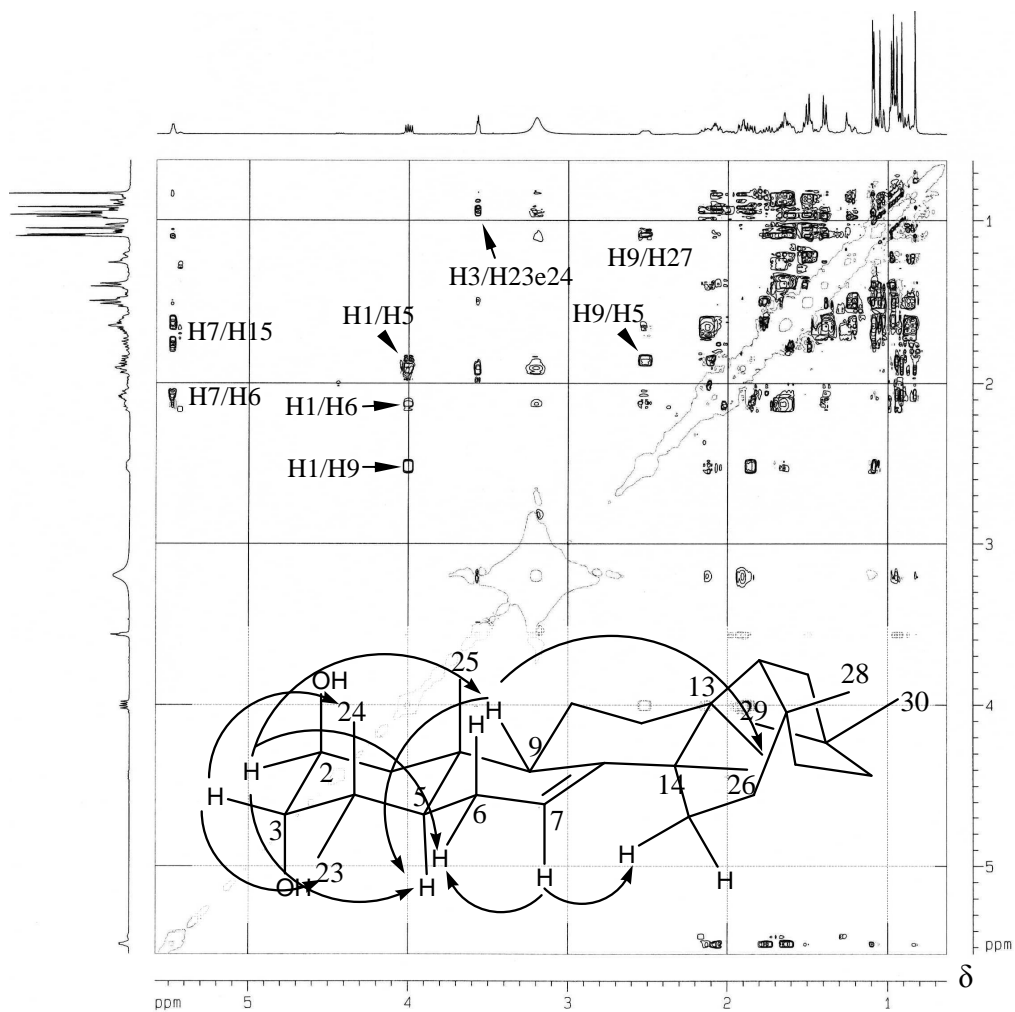


Figura 118: Mapa de contornos NOESY de MF13 (CDCl₃, 100 MHz).

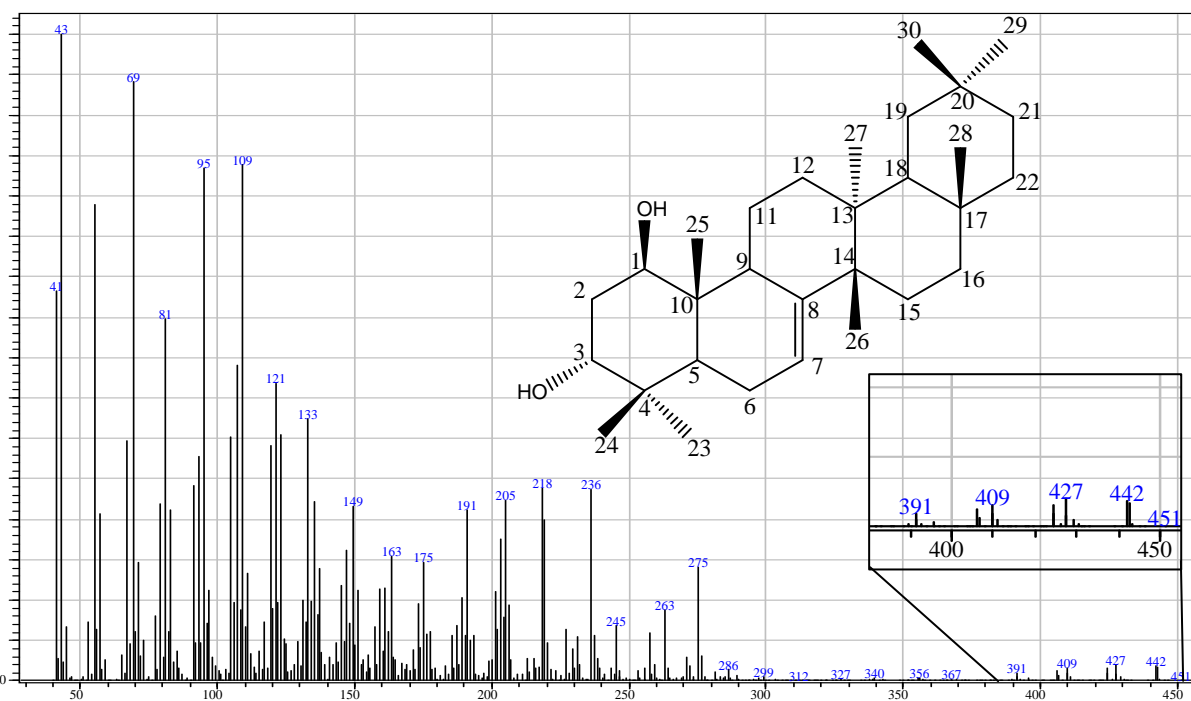


Figura 119: Cromatograma e espectro de massas obtido de MF13 em análise por CG/EM.

Tabela 14: Comparação dos deslocamentos químicos de carbono de MF13 com dados da literatura (Mahato, 1994; Nakano, 1997)

C _n	multiflorenol ¹	MF13	δ _H (J em Hz)	DEPT-135	HMBC
1	37,6	73,13	4,00; dd, J = 10,8; 5,6	CH	25
2	27,6	36,42	1,90; m	CH ₂	1
3	79,3	77,10	3,57; t, J = 3,2	CH	23, 24
4	39,2	37,35	-	C	23, 24
5	50,7	43,57	1,85; m	CH	23, 24, 25
6	24,5	24,68	2,07; m	CH ₂	-
7	117,6	117,72	5,48; d J=3,6 Hz	CH ₂	
8	145,7	147,76	-	C	26
9	48,3	49,35	2,50; m	CH	1, 25
10	35,5	41,08	-	C	25
11	17,5	20,34	1,65 eq, m 2,12 ax, m	CH ₂	-
12	33,3	34,47	1,39; m	CH ₂	
13	37,3	36,58	-	CH	26, 27
14	42,5	41,66	-	C	15, 18
15	30,9	31,69	1,62 eq, m 1,75 ax, m	CH ₂	26
16	37,3	36,48	1,64; m	CH	15, 18, 22
17	31,6	30,95	-	C	15, 18, 22, 28
18	45,8	46,96	1,52; m	C	22, 27, 28
19	30,9	35,85	1,40; m	CH ₂	-
20	40,6	28,21	-	CH ₂	22, 29, 30
21	29,5	34,03	1,22; m	CH ₂	22
22	36,0	36,71	1,50; m	C	18
23	27,8	27,53	0,94; s	CH ₃	24
24	15,0	21,76	0,91; s	CH ₃	5, 23
25	13,4	7,28	0,82; s	CH ₃	1, 5
26	25,2	26,76	1,10; s	CH ₃	15
27	27,8	26,17	1,05; s	CH ₃	18
28	31,5	31,03	1,09; s	CH ₃	18
29	182,8	34,38	0,98; s	CH ₃	30
30	33,5	33,59	0,96; s	CH ₃	-

1- Dados de ¹³C do ácido 3β-hidroxi-D:C-friedoleanan-7-en-29-óico.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram estudados os perfis químicos e histológicos de três populações de *Maytenus* coletadas nos municípios de Belo Horizonte, Caeté e Ouro Branco.

A utilização de métodos cromatográficos (CG/EM e CLAE/UV), assim como os estudos histoquímicos, mostraram-se de grande valia para auxiliar na distinção entre os grupos e contribuir para estudos de taxonomia vegetal.

Através da aplicação desses métodos ao estudo quimiotaxonômico comparativo, realizado nesse trabalho, foi possível observar peculiaridades entre as populações de *Maytenus* existentes em Belo Horizonte (BH), Caeté (CA) e Ouro Branco (OB), e estabelecer distinções entre os grupos estudados.

A análise dos perfis cromatográficos obtidos por CLAE/UV mostrou diferenças significativas entre a população de BH e as populações OB e CA. Notou-se a presença de picos comuns entre as três populações estudadas e a análise mais detalhada dos cromatogramas revelou a existência de uma maior similaridade entre os grupos OB e CA, e certa semelhança destes dois, com a população BH. Por outro lado, a análise dos cromatogramas obtidos por CG-EM mostrou uma acentuada diferença de OB e CA, com a população BH.

Utilizando o protocolo de análise definido no estudo por CG/EM, os triterpenos friedelina e β -friedelinol foram encontrados em CA e OB, com picos intensos, o que não foi observado no cromatograma de BH. Com base nesses dois triterpenos, a distinção entre os grupos CA e OB, em relação à população BH é bastante nítida, visto que foram feitas análises em momentos sazonais diferentes.

A friedelina foi isolada de BH em quantidade pouco expressiva (3,0 mg) comparativamente à quantidade obtida em estudos fitoquímicos de folhas realizados anteriormente com OB (~360,0 mg) e CA (~60,0 mg). A não detecção do β -friedelinol por CG/EM e o não isolamento deste composto distancia o grupo BH das outras populações estudadas.

Os dados acima reforçam a distinção entre as populações e indicam a existência de uma divergência evolutiva entre os grupos estudados.

A análise da relação entre a altura dos picos correspondentes à rutina nos cromatogramas de ambos os grupos trabalhados não mostrou diferenças muito acentuadas. Esse dado contrasta com o que foi relatado por Mendonça (1997), que, através de CCDS verificou uma concentração significativamente maior deste flavonóide no grupo BH em comparação com CA. A discrepância desses resultados pode ser explicada em função das técnicas utilizadas, visto que a CLAE apresenta uma resolução mais apurada do que a CCDS. O aparecimento de uma mancha de coloração mais intensa na cromatoplaça, em virtude de uma co-eluição de compostos com estrutura similar à rutina, pode ter induzido Mendonça a uma conclusão equivocada em relação à concentração deste flavonóide.

Pelo estudo histoquímico constatou-se a presença de lignina e de lipídeos e ausência de acúmulo de amido e de compostos fenólicos nos cortes das folhas representativas de todos os grupos. Não foram encontrados dados morfológicos, que salientassem uma diferença significativa entre as populações.

Os resultados divergentes obtidos pelas análises histoquímicas e cromatográficas podem ser justificados por diferenças nos fatores ambientais aos quais cada população pesquisada está submetida, tais como, o tipo de solo, clima e altitude. As características peculiares em cada um dos *habitats* estudados determinam os fatores de estresses e influenciam drasticamente na cobertura vegetal, moldando anatômica, morfológica e quimicamente as espécies da flora local.

Com base nas informações obtidas através do estudo quimiotaxonômico das três populações de *Maytenus*, associadas aos dados edáficos, climáticos e altimétricos das regiões de coleta, sugere-se que as populações OB e CA representam membros de uma espécie, sendo a população BH pertencente à outra espécie.

Podem-se citar como importantes informações para a conclusão do trabalho que a classificação das espécies *M. gonoclada* e *M. salicifolia* foram realizadas por naturalistas distintos, Martius e Reissek, respectivamente. Os métodos tradicionais de classificação morfológica apóiam-se na rigidez das folhas (dureza das folhas) para distinguir estas duas espécies de *Maytenus*. E, conforme relatado por Carvalho-Okano (1992), aparentemente as duas espécies não co-habitam os mesmos tipos de *habitat*, sendo *M. gonoclada* um arbusto de campos rupestres e matas de altitude e *M. salicifolia* considerada uma espécie arbórea encontrada em matas de interior, que são vegetações características de altitudes menores.

Como a população CA foi primeiramente identificada pelo naturalista pioneiro no Brasil, Carl Friederich Von Martius, como *Maytenus gonoclada* propõe-se que a população OB também pertença a essa espécie. Consequentemente sugere-se, também, que a população BH seja mesmo classificada como *Maytenus salicifolia* Reissek.

A continuidade do estudo fitoquímico da polpa de fruto de *M. salicifolia* BH propiciou o isolamento e a identificação dos triterpenos lupeol e glutinol e dos flavonóides rutina e epicatequina.

Do extrato em hexano de folhas isolou-se o tanaceteno ou (2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,11-trimetildodeca-2,6,10-trieno. A presença desse composto demonstra a capacidade da *M. salicifolia* de sintetizar um sesquiterpeno cuja rota biossintética envolve o acoplamento de pirofosfato de γ,γ -dimetilalila com pirofosfato de geranila.

Além do tanaceteno, foram isolados e identificados pela primeira vez na família *Celastraceae* o 3β -esteariloxi-D:C-friedolean-7-eno e o $1\beta,3\alpha$ -dihidroxi-D:C-friedoleanan-7-eno, que também são formados por rota diferente daquelas utilizadas na biossíntese dos compostos que são comumente isolados de *Maytenus* sp. Sugere-se que o multiflorenol seja o precursor do composto 3β -esteariloxi-D:C-friedolean-7-eno e o *epi*-multiflorenol de $1\beta,3\alpha$ -dihidroxi-D:C-friedoleanan-7-eno, ambas as substâncias obtidas do extrato hexânico de folhas de *M. salicifolia* BH.

Através dos estudos fitoquímicos também foram identificados: araquidato de α -amirina, araquidato de β -amirina, araquidato de isomultiflorenol, *epi*- α -amirina, *epi*- β -amirina, β -amirina, lupeol, campesterol e β -sitosterol.

Também foi isolado e identificado um composto pertencente à classe dos lupanos, o 3β -esteariloxi-lup-20(29)-eno, e um da classe dos ursanos ainda não relatado na literatura, o 3β -araquidoiloxi-11-oxo-ursan-12-eno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, I. **Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes**. Natural Product Reports, vol. 24, p. 1311–1331, 2007.
- ABNT-INMETRO. **Guia Para a Expressão da Incerteza de Medição**. 3ª ed. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, p. 131, 2003.
- AGRAWAL, P.K. **¹³C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids**. Progress in NMR Spectroscopy, vol. 24, p. 1-90, 1992.
- ALBERTON, M.D. **Avaliação da autenticidade de amostras comerciais à base de Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek) comercializadas na região de Tubarão – SC**. XI Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, IX congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos e III Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, código A5.02, 2002. (Resumo).
- ALMG. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **O Estado: municípios mineiros**. Disponível em: < <http://www.almg.gov.br> > Acesso em 15 de ago. 2009.
- APG II. Angiosperm Phylogeny Group. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants**. Botanical Journal of the Linnean Society, vol. 141, p. 399–436, 2003.
- ARAÚJO, A.O.; SOUZA, V.C.; CHAUTEEMS, A. **Gesneriaceae da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil**. Revista Brasileira de Botânica, vol. 28 (1), p.109-135, 2005.
- BAILLIE, J.E.M.; HILTON-TAYLOR, C.; STUART, S.N. (Editors). **IUCN Red List of Threatened Species: A Global Species Assessment**. Margate: Thanet Press Limited, 191 pp, 2004.
- BARROSO, G. M., et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Vol. 1, 2ª ed. Viçosa: Editora da UFV, p. 17-37, 2002.
- BEAMAN, J. H. **Plant taxonomy**. Clinics in Dermatology, vol. 4, (2), p. 23-30, 1986.
- BELL, P. R.; HEMSLEY, A. R. **Green plants : their origin and diversity**. 2ª ed. Cambridge: University Press, p. 269-316, 2000.
- BENDEROTH, M. et al. **Positive selection driving diversification in plant secondary metabolism**. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 103, p. 9118–9123, 2006.
- BLATT, C.T.T.; SANTOS, M.D. **Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado**. Revista Brasileira de Botânica, vol. 21, p. 135-140 , 1998.
- BOLZANI, V. S. et al. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas**. Química Nova, vol. 25 (supl. 1), p. 45-61, 2002.
- BRAGA, A.S. **Os gêneros *Machaerium* e *Dalbergia*: química, quimiotaxinomia e biossíntese**. Departamento de Química, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, 1967 (Tese, doutorado em química).
- BRASIL. **Resolução - RDC nº 48**. 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada.
- BRONDZ, I.; OLSEN, I. **Microbial chemotaxonomy. Chromatography, electrophoresis and relevant profiling techniques**. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, vol. 379, p. 367-411, 1986.

- CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* MOL. Emend. Mol. (*Celastraceae*) do Brasil extra-amazônico.** Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p 117-217, 1992. (Tese, doutorado em Ciências Biológicas).
- CARVALHO-OKANO, R.M. ***Maytenus littoralis* Carvalho-Okano (*Celastraceae*), uma nova espécie para o Brasil.** Hoehnea, vol. 32, p. 467-469, 2005.
- CHEN, S.B. et. al. **High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of isoflavonoids for distinguishing between *Radix Puerariae Lobate* and *Radix Puerariae Thomsonii*.** Journal of Chromatography A, vol. 1121 (1), p. 114-119, 2006.
- CHENG, Y.Y. et. Al. **Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines.** Analytica Chimica Acta, vol. 555, p. 217–224, 2006.
- CORTEZ, D.A.G. **Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell. (*Meliaceae*).** Acta Scientiarum, vol. 20, p. 243-245, 1998.
- COSTA, F.B. et. al. **Quimiosistemática e filogenia de *Viguiera* (*Asteraceae*)** (Resumo). XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, pág. 69, 1999.
- CRONQUIST, A. **Chemistry in Plants Taxonomy: an assessment of where we stand.** In: BISBY F. A. et al. **Chemotaxonomy: Principles and Practice.** The Systematics Association Special Volume, nº 16. London: Academic Press Inc., 1980.
- CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants.** 2ª ed. The New York Botanical Garden. New York: Columbia University Press, p. 261-448, 1988.
- DAVID, J.P.L. et al. **Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos.** Infarma, vol.16, p. 71-76, 2004.
- DHARMASSREE, B. T. et al. **Triterpenes from *Gymnosporia emarginata*.** Phytochemistry, vol. 21, p. 2422-2423, 1982.
- DIXIT, V.K.; YADAV, N.P. **Recent approaches in herbal drug standardization.** International Journal of Integrative Biology, vol. 2 (3), p. 195– 203, 2008.
- DJINGOVA, R; KULEFF, I; MARKERT, B. **Chemical fingerprinting of plants.** Ecological Research, vol. 19, p. 3–11, 2004.
- DRUMMOND, G.M. et al. **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação.** 2ª ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, p. 94–109, 2005.
- EBIZUKA, Y. et al. **β -Amyrin synthase: Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants.** European Journal of Biochemistry, vol. 256 (1), p. 238-244, 1998.
- EBIZUKA, Y. et al. **Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases.** European Journal of Biochemistry, vol. 266 (3), p. 302-307, 1999.
- EBIZUKA, Y. et al. **Mutational studies on triterpene synthases: engineering lupeol synthase into β -amyrin synthase.** Journal of the American Chemical Society, vol. 122 (29), p. 6816-6824, 2000.
- EVANS, W.C. **Trease and Evan`s pharmacognosy.** 14ª ed. London: WB Saunders, p. 612, 1996.
- FALKENBERG, M.B. **Introdução à análise fitoquímica.** In: SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 575, 2001.

- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 575, 2001.
- FILHO, O.B.A.; BUENO, G.T. **A base física**. In: Banco de desenvolvimento de Minas Gerais. **Minas Gerais do século XXI: reinterpretando o espaço mineiro**. Belo Horizonte: Rona Editora, vol II, p. 11-32, 2002.
- FORNI-MARTINS, E.R. **Poliploidia, uma processo evolucionário**. In: Cavalcanti, T.B., et al. **Tópicos Atuais em Botânica: palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica**. Brasília: Embrapa, recursos Genéticos e Biotecnológicos/Sociedade Botânica do Brasil, p. 29-34, 2000.
- FOX, M.H. **Chemical Taxonomy**. Nature, vol. 157, p. 511-511, 1946.
- FRALISH, J. S.; FRANKLIN, S. B. **Taxonomy and Ecology of Woody Plants in North American Forests: Excluding Mexico and Subtropical Florida**. San Francisco: WileyBlackwell, p. 1-4, 2002.
- FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. **The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi**. Mycological research, vol. 112 (2), p.231-240, Feb 2008.
- GBO. Global biodiversity outlook. **Status and Trends of Global Biodiversity**. Secretariat of the Convention on Biological Diversity (CBD). United Nation Environment Programme (UNEP), chapter 1, p. 59-62, 2002.
- GIBBS, R. D. History of Chemical Taxonomy. In: Swain, T. (Ed.) **Chemical Plant Taxonomy**. London: Academic Press, p. 41-. 88 ,1963.
- GINGERICH, P.D. et al. **Global change at the Paleocene-Eocene boundary: climatic and evolutionary consequences of tectonic events**. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, vol. 79, p. 117-128, 1990.
- GODOY, S.A.P.; FIDELIS, A.T. **Structure of cerrado stricto sensu at the Glebe Cerrado Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro, SP**. Acta Botanica Brasilica, vol. 17(4), p. 531-539, 2003.
- GOOGLE. **Google Earth, 2009**. Versão 5.0. Disponível em: < <http://earth.google.com/intl/pt/> > Acesso em 10 de março 2009.
- GOTTLIEB, O.R. et al. **Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in angiosperms**. Phytochemistry, vol. 40, p. 99-113, 1995.
- GOTTLIEB, O.R. **Evolução química vegetal**. Ciência e Cultura, vol. 39, p. 357-360, 1987.
- GRADSTEIN, F.M.; Ogg, J.G. **The geologic time scale**. In: Hedges, S.B.; Kumar, S. (Editors). **The timetree of life**. New York: Oxford University Press, p. 25-34, 2009.
- GRANDI, T.S.M. **Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil**. Acta Botânica Brasilica, vol. 3, p. 185-219, 1989.
- HEGNAUER, R. **Chemical characters in plant taxonomy: some possibilities and limitations**. Pure and applied chemistry. Vol. 14(1), p. 173-187, 1967.
- HEGNAUER, R. **Chemotaxonomic observations. VI. Phytochemistry & systems; a forward & backward glance at the development of chemotaxonomy**. Pharmaceutica Acta Helvetiae, vol. 33 (7); p. 287-305, 1958.
- HEGNAUER, R. **Chemotaxonomic study of the Leguminosae**. Netherlands Pharmazie, vol. 11; p. 638-652, 1956.
- HILLIG K. W. **A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in Cannabis**. Biochemical Systematics and Ecology, vol. 32 (10), p. 875-891, 2004.

- HRISTOZOV, D. P. **Machine learning techniques applied to chemotaxonomy and ligand-based virtual screening**. The Natural Science Faculties, Friedrich-Alexander University, 2007 (thesis, doctorate in natural science).
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de clima do Brasil**. Escala 1:5 000 000, 2002. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/tem.php> Acesso em 12 de fev. 2009.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapas interativos**. 2005. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br>> Acesso em 18 de jan. 2009.
- IUPAC; IUB. International Union of Pure and Applied Chemistry; International Union of Biochemistry . **Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides**. Joint Commission On Biochemical Nomenclature (JCBN). Pure and Applied Chemistry, vol. 56 (5), p. 595—624, 1984.
- JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 12^a ed. São Paulo: Editora Nacional, p. 266-595, 1998.
- KAUL, V.K. et al. **Sesquiterpene and long chain ester from Tanacetum longifolium**. Phytochemistry, vol. 61, p. 913–917, 2002.
- KEOGH, J. S. **The importance of systematic in understanding the biodiversity crisis: the role of biological educators**. Journal of Biological Education, vol. 29 (4), p. 293-300, 1995.
- KLINKENBERG, B. (Ed.). **E-Flora BC: Electronic Atlas of the Plants of British Columbia**. Lab for Advanced Spatial Analysis, Department of Geography, University of British Columbia, Vancouver, 2008. Disponível em: <<http://www.eflora.bc.ca>> Acesso em 15 de out. 2008.
- KNOBLOCH E.; MAI D.H. **Evolution of Middle and Upper Cretaceous Floras in Central and Western Europe**. Jahrbuch der geologischen Bundesanstalt, vol. 134, p. 257-270, 1991.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora da Universidade Rural. Rio de Janeiro: Seropédica, p. 198, 1997.
- LEHNINGER, A.L. et. al. **Princípios de bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Savier, p. 1119, 2002.
- LERDAU, M.; THEIS, N. **The evolution of function in plant secondary metabolites**. International Journal of Plant Sciences, vol. 164 (supl. 3), p. S93-S102, 2003.
- LI, C.S. et al. **Wuyunanthus gen. nov., a flower of Celastraceae from the Palaeocene of north-east China**. Botanical Journal of the Linnean Society, vol. 136, p. 323–327, 2001.
- LIMA, H.R.P. et al. **Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas**. Floresta e Ambiente, vol. 10, p.71 – 77, 2003.
- LIMA, M.P. et. al. **Constituintes químicos de *Spathelia excelsa* e suas correlações quimiotaxonômicas** (Resumo). XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, pág. 70, 1999.
- LINNÉ, C. **Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis**. 12^a ed. Estocolmo: Laurentii Salvii, vol. 1, p. 1-20, 1766.
- MACHADO, R.B. et al.. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservação Internacional, Brasil. Relatório técnico não publicado, 2004. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br>> Acesso em 15 de dez. 2008.
- MAGALHÃES, M.N.; LIMA, A.C.P. **Noções de probabilidade e estatística**. 6^a ed., 1^a reimpressão. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 94-188, 2007.

- MAGALLÓN, S.; SANDERSON, M.J. **Absolute diversification rates in angiosperm clades.** *Evolution*, vol. 55, p. 1762–1780, 2001.
- MAHATO, S.B.; Jundi, A. P. **¹³C-NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features.** *Phytochemistry*, vol. 37, p. 1517-1575, 1994.
- MANTOVANI, J.E.; PEREIRA, A. **Estimativa da integridade da cobertura vegetal de cerrado através de dados tm/landsat.** Anais IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, p. 1455-1466, 1998.
- MARQUES, J.J. **Solos do cerrado.** Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras. Disponível em: <<http://www.dcs.ufla.br>> Acesso em 10 de jan. 2009.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental.** 2^a ed. Fortaleza: Editora da UFC, p. 126, 1997.
- MCLOUGHLIN, S.; VAJDA, V. **Extinction and recovery patterns of the vegetation across the Cretaceous-Palaeogene boundary — a tool for unraveling the causes of the end-Permian mass-extinction.** *Review of Palaeobotany and Palynology*, in press, corrected proof, 2006.
- MCNAIR, J. B. **A study of some characteristics of vegetable oils.** *Botanical Series*, vol. 10 (2), p. 47-54, 1930.
- MEIRA-NETO, J.A.A. et al. **Grupos Ecológicos da sere sucessional de uma Floresta Estacional Semidecidual Submontana, Zona de Amortecimento do Parque Estadual do Rio Doce, MG.** *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 5 (s2), p. 222-224, 2007.
- MELO, E. **Polygonaceae da cadeia do espinhaço, Brasil.** *Acta Botanica Brasilica*, vol. 14(3), p. 273-300, 2000.
- MENDONÇA, M.P. **Morfoanatomia e química ecológica de folhas de *Maytenus gonoclada* Mart. e *Maytenus salicifolia* Reiss.(*Celastraceae*).** Instituto de Ciências Biológicas, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. (Dissertação, mestrado em ecologia).
- MEYER, S.T. et al. **Composição florística da vegetação arbórea de um trecho de floresta de galeria do Parque Estadual do Rola-Moça na Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG, Brasil.** *Acta Botanica Brasilica*, vol. 18(4), p. 701-709, 2004.
- MINUZZI, R.B. et al. **Climatologia do comportamento do período chuvoso da região sudeste do Brasil.** *Revista Brasileira de Meteorologia*, vol. 22 (3), p. 338-344, 2007.
- MIRANDA, R R S. et al. **Structural determination of 3β-stearoyloxy-urs-12-ene from *Maytenus salicifolia* by 1D and 2D NMR and quantitative 13C NMR spectroscopy.** *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 44, p. 127-131, 2006.
- MIRANDA, R.R.S. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacêutico de *Maytenus salicifolia* Reiss. (*Celastraceae*).** Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007 (Tese, doutorado em química.).
- MOREIRA, A. et al. **Fertilidade do solo e estado nutricional da alfafa cultivada nos trópicos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 1^a ed., n° 67, 2007. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br>> Acesso em 18 de jan. 2009.
- MOTTA, R.S. **The economics of biodiversity in Brazil: the case of forest conversion.** Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). Texto para discussão n° 433, 1996.

- NAIK, V.N. **Taxonomy of Angiosperms**. 18^a ed. New Delhi: Tata McGraw-Hill, p. 153-157, 1985.
- NAKANO, K. et al. **A diterpenoid and triterpenes from tissue cultures of *Tripterygium wilfordii***. *Phytochemistry*, vol. 45, p. 293–296, 1997.
- NASCIMENTO, E.S.; TUROLA, M.S.R. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 42, p. 289-306, 2006.
- OLIVEIRA, M.L.G. **Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus gonoclada martius* (celastraceae) e obtenção de derivados nitrogenados da friedelina**. Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007 (Dissertação, mestrado em química).
- PASTENE, E.R. et al. **Uso de espectroscopia de RMN y MALDI-TOF MS en la elucidación estructural de flavonoides antioxidantes provenientes de la planta medicinal chilena *Cheilanthes glauca* (Cav.) mett.** *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, vol. 46, p. 449-457, 2001.
- PHAISANSUTHICHOL, S.; PHURUENGRAT, A. **Preliminary study of steroids in *Sericocalyx schomburgkii* (Craib) Bremek by GC-MS**. *Songklanakarin Journal Science and Technology*, vol. 28 (suppl. 1) p. 39-44, 2006.
- PICHERSKY, E.; GANG, D.R. **Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective**. *Trends in Plant Science Perspectives*, vol. 5, p. 439-445, 2000.
- POOLE, I.; WILKINSON, H.P. **A Celastraceae twig from the Eocene London Clay of south-east England**. *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 129, 165–176, 1999.
- POSER, G.L.; MENTZ, A.L. **Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais**. In: Simões, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 63-76, 2001.
- QI, X. et al. **A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101 (21), p. 8233–8238, 2004.
- RAVEN, P. H. et al. **Biologia Vegetal**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 477-496, 2001.
- REYNOLDS, T. **The evolution of chemosystematics**. *Phytochemistry*, vol. 68 (22), p. 2887-2895, 2007.
- ROGERS, C. R. **A convenient thin layer chromatographic technique for chemotaxonomic application in *Maytenus* (Celastraceae)**. *South Africa Journal of Botany*, vol. 66, p. 7-9, 2000.
- RUBEL, F. et al. **World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated**. *Meteorologische Zeitschrift*, vol. 15 (3), p. 259-263, 2006.
- RUCHKYS, U.A. et al. Serra da Piedade, Quadrilátero Ferrífero, MG - da lenda do Sabarabuçu ao patrimônio histórico, geológico, paisagístico e religioso In: WINGE, M. (Ed.) **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. vol. II, sítio 129, p. 1-10, 2007. Disponível em: <<http://www.unb.br/ig/sigep/sitios.htm>> Acesso em 15 de fev. 2009.
- SANO, E.E.; JESUS, E.T.; BEZERRA, H.S. **Uso de um Sistema de Informações Geográficas para Quantificação de Áreas Remanescentes do Cerrado**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Comunicado Técnico, ed. 62, 2001.

- SANTOS, H.G. et al. **Propostas de revisão e atualização do Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Documentos nº 53. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, p. 56, 2003.
- SANTOS, N.P. et al. **Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil Imperial**. Química Nova, vol. 21, p. 666-670, 1998.
- SANTOS, N.P. **Theodoro Peckolt: a produção científica de um pioneiro da fitoquímica no Brasil**. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, vol. 12, p. 515-533, 2005.
- SAVOLAINEN, V. et al. **Darwin's abominable mystery: Insights from a supertree of the angiosperms**. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 101, p. 1904–1909, 2004.
- SBDS. **Spectral Database for Organic Compounds, 1997**. Disponível em: <<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS>> Acesso em 10 de jan. 2007.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. et al. **Citogenética de espécies arbóreas da subfamília caesalpinioideae – leguminosae do sul do brasil**. Ciência Florestal, vol. 15, p. 241-248, 2005.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. **Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas**. Revista Brasileira de Agrociência, vol.10, p. 151-157, 2004.
- SCHRADER, B. et al. **Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants**. Journal of Molecular Structure, vol. 509, p. 201–212, 1999.
- SEBERG, O. **The Future of Systematics: Assembling the Tree of Life**. The Systematist: Newsletter of the Systematics Association, n. 23, p. 2-8, 2004.
- SHAO, Y.; TAO, Y.; JIANG, F. **Fingerprinting quality control of Qianghuo by high-performance Liquid chromatography-photodiode array detection**. Journal of Ethnopharmacology, vol. 111 (2), p. 265–270, 2007.
- SHIOJIMA, K. et al. **Fern Constituents: Six New Triterpenoid Alcohols from *Adiantum capillus-veneris***. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, vol. 47, p. 543-547, 1999.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7ª ed. New York: John Wiley & Sons Inc p. 502, 2005.
- SIMMONS, M.P. et al. **Phylogeny of the *Celastraceae* Inferred from 26S Nuclear Ribosomal DNA, Phytochrome B, *rbcL*, *atpB*, and Morphology**. Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 19, p. 353–366, 2001a.
- SIMMONS, M.P. et al. **Phylogeny of the *Celastraceae* Inferred from Phytochrome B and Morphology**. American Journal of Botany, vol. 88, p. 313–325, 2001b.
- SINGH, G. **Plant systematics: an integrated approach**. 2ª ed. Enfield e Plymouth: Science Publishers, p. 10-29, 2004.
- SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C. **Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts**. Journal of Microbiological Methods, vol. 25, p. 5-17, 1996.
- SOLTIS, D.E. **Origin and Early Evolution of Angiosperms**. Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1133, p. 3–25, 2008.
- SOLTIS, D.E; SOLTIS, P.S.. **The origin and diversification of angiosperms**. American Journal of Botany, vol. 91, p. 1614–1626, 2004.
- SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. **Podzólicos / Argissolos**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Agência de Informação Embrapa, 2007. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acesso em 17 de dez. 2008.

- SOUZA, A.D.L. et al. **Chemical constituents of *Gustavia augusta* L. (*Lecythidaceae*)**. Química Nova, , vol. 24, p. 439-442, 2001.
- STERN, K et al. **Introductory Plant Biology**. 9^a ed. New York: McGraw-Hill Science/Engineering/Math, p. 286-289, 2003.
- STEVENS, P.F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 7, 2006. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Acesso em 15 de ago. 2006.
- TANAKA, J.C.A. et al. **Constituintes químicos de *Luehea divaricata* mart. (*Tiliaceae*)**. Química Nova, vol. 28, p. 834-837, 2005.
- TAO, Y.; JIANG, F.; SHAO Y. et al. **Fingerprinting quality control of Qianghuo by high-performanceliquid chromatography-photodiode array detection**. Journal of Ethnopharmacology, vol. 111, p.265–270, 2007.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis**. Pure Applied Chemistry, vol. 74 (5), p. 835-855, 2002.
- TRIGO, J.R. et. al. **Alcalóides pirrolizidínicos em senecio (*Asteraceae*, *Senecioneae*): importância taxonômica** (Resumo). XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, p. 73, 1999.
- TRIM, A. R. **Occurrence of Asperuloside in *Daphniphyllum macropodum* (*Euphorbiaceae*) and a closely related Glucoside in *Monotropa hypopitys* Walt. (*Pyrolaceae*)**. Nature, vol. 167, p. 485, 1951.
- UGAZ, O.L. **Investigación fitoquímica: Métodos de el estudio de productos naturales**. Pontificia Universidad Católica del Peru. Lima: Fondo Editorial, 1988.
- VALLADÃO, F.N. **Estudo quimiotaxonômico em folhas de espécies da classe Magnoliopsida e estudo fitoquímico em polpa de fruto de *Maytenus salicifolia* Rissek**. Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005 (Dissertação, mestrado em química).
- VAN DE PEER, Y. et al. **Genome duplication and the origin of angiosperms**. Trends in Ecology and Evolution, vol. 20, p. 591-597, 2005.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. (Editors). **Thin layer chromatography in phytochemistry. Chromatographic science series**. Boca Raton: CRC Press, p. 873, 2008.
- WHO. World Health Organization. **General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine**. Geneva, p. 74, 2000.
- WINK, M. **Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective**. Phytochemistry, vol. 64, p. 3–19, 2003.
- YUNES, R.A. et al. **Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Universidade do Oeste de Santa Catarina. Chapecó: Argos, p. 523, 2001.
- ZHAO, Z. et al. **Establishment of GC-MS Fingerprint of Fresh *Houttuynia cordata***. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 53 (11), p. 1484-1489, 2005.
- ZODROW, E.L. et al. **FTIR-derived characteristics of fossil-gymnosperm leaf remains of *Cordaites principalis* and *Cordaites borassifolius***. International Journal of Coal Geology, vol. 55, p. 95– 102, 2003.