

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação química e biológica de *Maytenus dasyclada* Mart. e
Maytenus cassineformis Reissek (Celastraceae)

MELISSA SCHWANZ

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação química e biológica de *Maytenus dasyclada* Mart. e
Maytenus cassineformis Reissek (Celastraceae)

Tese apresentada por **Melissa
Schwanz** para obtenção do TÍTULO
DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Amélia T. Henriques

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível doutorado acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 04.12.2012, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Edna Sayuri Suyenaga
FEEVALE

Prof. Dr. Mário Luiz Conte da Frota Junior
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Vânia Floriani Noldin
Universidade do Vale do Itajaí

Schwanz, Melissa
Avaliação química e biológica de *Maytenus dasyclada*
Mart. e *Maytenus cassineformis* Reissek
(Celastraceae) / Melissa Schwanz. -- 2012.
226 f.

Orientadora: Amélia T. Henriques.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Maytenus dasyclada*. 2. *Maytenus cassineformis*.
3. Gastroproteção. 4. Anti-inflamatório. 5.
Antioxidante. I. Henriques, Amélia T., orient. II.
Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), nas dependências do Laboratório de Farmacognosia e da Central Analítica (PPGCF), pertencentes à Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, RS. Alguns experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia *in vivo*, pertencente ao Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, SC.

À minha amada, querida e saudosa mãe.

Responsável pela formação do meu caráter e meus valores.

Saudade...

“...não saber como encontrar tarefas que lhe cessem o pensamento, não saber como frear as lágrimas diante de uma música, não saber como vencer a dor de um silêncio que nada preenche”.

Martha Medeiros

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Amélia T. Henriques pela oportunidade, incentivo e exemplo de postura científica.

A todas as pessoas que possibilitaram a realização deste trabalho, por meio da disponibilização de materiais e equipamentos, ou simplesmente por uma ideia iluminadora: Dr. Sérgio Faloni de Andrade, Dr. Altemir A.J.Mossi, Dr. Miriam Anders Apel e Dr. Sérgio Bordignon.

Aos colegas e amigos Leandro N. Francescato, Roger R. Dresch e a grande amiga Vanusa Manfredini pela disponibilidade e ajuda imensa na realização de alguns experimentos.

Durante todos estes anos, dividida entre o trabalho e o doutorado, alguns colegas e amigos do laboratório de Farmacognosia contribuíram muito na minha jornada. A estes um imenso agradecimento: Aline, Carolina, Marina e Renata. Outros, não menos importantes, proporcionaram momentos importantíssimos de descontração: Cláudia, Douglas, Eduardo, Grazielle, Júlia, Juliana, Letícia, Luís, Rafaela, Raquel e Tiago.

A todos os meus familiares pela atenção, apoio, carinho e cuidados tão especiais. Em especial as minhas tias-mães: Elaine e Vânia, e minha prima-irmã Priscila.

Ao meu pai, grande incentivador.

Ao meu irmão e amigo Thiago, pela disponibilidade e tentativa em ajudar.

Ao meu paciente, amoroso, carinhoso, solícito e compreensivo Cris, pelo companheirismo nos momentos difíceis.

A Deus por não me permitir esmorecer e colocar no meu caminho oportunidades e pessoas especiais.

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência”

Henry Ford

RESUMO

O gênero *Maytenus*, pertencente à família Celastraceae é um dos maiores da família, constituído por cerca de 225 espécies distribuídas nos trópicos. Espécies de *Maytenus* são utilizadas na medicina popular de diversos países. No Brasil, *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* são amplamente usadas pela população como antiulcerogênicas, anti-inflamatórias e antitumorais. Desta forma, este trabalho propôs-se a estudar as folhas das espécies vegetais *M. dasyclada* Mart. e *M. cassineformis* Reiss., nativas do Rio Grande do Sul, caracterizando-as quanto a aspectos químicos e biológicos. Para isso, obteve-se extratos das folhas das espécies utilizando o aparelho de soxhlet e os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e etanol, em ciclos de 12 horas consecutivas para cada solvente. Também foi obtido um extrato aquoso por decocção das folhas da espécie. Estes extratos foram analisados por técnicas cromatográficas (CLAE-UV e CLAE-UV-IES-MS) e quantificados através de espectroscopia no UV. Os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico, de ambas as espécies, foram caracterizados quanto as atividades antioxidante (ensaios de TRAP, inibição de radicais hidroxil e óxido nítrico, e inibição da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas) e anti-inflamatória (ensaio de quimiotaxia leucocitária), ambos *in vitro*. Através do ensaio cometa, *in vitro*, avaliou-se o potencial genotóxico dos extratos. Por fim, os mesmos foram testados quanto a atividade antiulcerogênica *in vivo*, por meio de indução de úlceras agudas por etanol e anti-inflamatórios não esteróides (AINEs). Parâmetros de secreção gástrica também foram avaliados (volume, pH e acidez total) pelo modelo de ligadura de piloro, e a produção de muco no conteúdo gástrico foi determinado. No intuito de elucidar possíveis mecanismos de ação gastroprotetor os ensaios de L-NAME e NEM foram desenvolvidos. As análises químicas revelaram a presença dos flavonoides quercetina e canferol nos extratos acetato de etila e etanólico das espécies, bem como a presença de derivados da galocatequina e derivados 3-7-O-diglicosilados de canferol e 3-O-triglicosilado de quercetina. O extrato acetato de etila de ambas as espécies demonstraram o maior conteúdo de polifenóis totais ($53,58 \pm 0,43$ e $43,65 \pm 0,80$ mg/g de ácido gálico equivalente) e o maior conteúdo de flavonoides totais ($3,72 \pm 0,27$ e $3,19 \pm 0,32$ mg/g de quercetina equivalente), para extratos de *M. cassineformis* e *M. dasyclada*, respectivamente. Os extratos das

duas espécies demonstraram ainda um efeito inibidor importante da migração de leucócitos, obtendo valores de IC₅₀ de 0,2594 µg/mL, 0,6114 µg/mL e 0,7560 µg/mL, para os extratos etanólico, acetato de etila e hexânico de *M. dasyclada*, respectivamente. Para *M. cassineformis* os valores de IC₅₀ foram de 0,3182 µg/mL, 0,3751 µg/mL e 0,2916 µg/mL, para os extratos etanólicos, acetato de etila e hexânico, respectivamente. A atividade antioxidante dos extratos acetato de etila e etanólico das duas espécies foi demonstrada nos ensaios de atividade antioxidante total (TRAP), em que houve inibição significativa da quimioluminescência formada pelo luminol; e atividade contra os radicais hidroxil demonstrando efeito significativo na prevenção da degradação da desoxirribose. Os extratos foram ainda capazes de inibir a peroxidação lipídica, pelo ensaio de formação de TBARS, e oxidação de proteínas, pelo método do carbonil. Nenhum dos extratos pesquisados evidenciou efeito genotóxico no ensaio cometa *in vitro*. Os extratos acetato de etila e etanólico de *M. dasyclada* exerceram atividade antiulcerogênica demonstrada nos ensaios de úlcera induzida por etanol e AINEs, interferindo na secreção de ácido, e, também, interferindo nos mecanismos citoprotetores, aumentando a secreção de muco. Os mecanismos gastroprotetores podem estar relacionados ao efeito antioxidante, demonstrados pela inibição de óxido nítrico e compostos sulfidríla. Os resultados obtidos neste trabalho representam as primeiras contribuições para elucidar compostos químicos e potenciais atividades biológicas das espécies *M. cassineformis* e *M. dasyclada*. Os extratos demonstraram atividades biológicas promissoras, relacionadas ao alto conteúdo de compostos fenólicos presentes nas espécies.

Palavras-chave: *Maytenus dasyclada*, *Maytenus cassineformis*, compostos fenólicos, antiúlcera, quimiotaxia, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Chemical and biological activities from Maytenus dasyclada Mart. and Maytenus cassineformis Reissek (Celastraceae)

The genus *Maytenus*, belonging to the Celastraceae family is one of the largest family, comprising about 225 species distributed in the tropics. *Maytenus* species are used in folk medicine in many countries. In Brazil, *M. ilicifolia* and *M. aquifolium* are widely used by the population as antiulcer, anti-inflammatory and antitumor. Thus, this project aimed to study the leaves of the plant species *M. dasyclada* Mart. and *M. cassineformis* Reiss., natives from Rio Grande do Sul, characterizing them as the chemical and biological aspects. Therefore, was held the extraction of the leaves of species using soxhlet and the following solvents: hexane, ethyl acetate and ethanol, in cycles of 12 hours consecutives for each solvent. Also an aqueous extract was obtained by decoction of the leaves of the species. These extracts were analyzed by chromatographic techniques (HPLC-DAD and HPLC-DAD-ESI-MS) and quantified by UV spectroscopy. The extracts hexane, ethyl acetate and ethanolic of both species were characterized for antioxidant activity (TRAP assay, inhibition of hydroxyl and nitric oxide radicals, and inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation) and anti-inflammatory (chemotaxis assay), both *in vitro*. Through the comet assay *in vitro*, we evaluated the genotoxic potential of the extracts. Finally, they were tested for antiulcer activity *in vivo*, by induction of acute ulcers by ethanol and anti-inflammatory drugs. Gastric secretion parameters were also evaluated (volume, total acidity and pH) at pylorus ligation model, and the production of mucus in the gastric contents was determined. In order to elucidate possible mechanisms of gastroprotective action assays of L-NAME and NEM were developed. Chemical analysis revealed the presence of flavonoids quercetin and kaempferol in ethyl acetate and ethanolic extracts of species and the presence of galocatechin derivatives and kaempferol 3-7-O-diglicosidic and quercetin 3-O-triglicosidic. The ethyl acetate extracts of both species showed the highest amount of total polyphenols (53.58 ± 0.43 and 43.65 ± 0.80 mg gallic acid equivalent/g) and highest content of flavonoids (3.72 ± 0.27 and 3.19 ± 0.32 mg quercetin equivalents/g), for *M. cassineformis* and *M. dasyclada* extracts, respectively. The extracts of both species also showed an inhibitory effect

on leukocyte migration importantly, getting IC₅₀ values of 0.2594 µg/mL, 0.6114 µg/mL and 0.7560 µg/mL for ethanolic, ethyl acetate hexane and *M. dasyclada* respectively. For *M. cassineformis* the IC₅₀ values were 0.3182 µg/mL, 0.3751 µg/mL and 0.2916 µg/mL, the ethanol extracts, ethyl acetate and hexane, respectively. The antioxidant activity of the ethyl acetate and ethanol extracts from both species was demonstrated in tests of total antioxidant activity (TRAP), in which there was significant inhibition of luminol chemiluminescence, and activity against hydroxyl radicals demonstrating significant effect in preventing the degradation of deoxyribose. The extracts were still able to inhibit lipid peroxidation by TBARS formation assay, and protein oxidation as measured by the carbonyl. Extract showed no genotoxic effects in the comet assay *in vitro*. The ethyl acetate and ethanolic *M. dasyclada* extracts exerted antiulcer activity demonstrated in the experimental ulcer induced by ethanol and NSAIDs, interfering in acid secretion, and also interfering with the cytoprotective mechanisms, increasing mucus secretion. Gastroprotector mechanisms may be related to antioxidant effects, demonstrated by the inhibition of nitric oxide and sulfhydryl compounds. The results obtained in this study represent the first contributions to elucidate chemical compounds and biological activities potential of the species *M. cassineformis* and *M. dasyclada*. The extracts showed promising biological activities, related to the high content of phenolic compounds present in the species.

Keywords: *Maytenus dasyclada*, *Maytenus cassineformis*, phenolic compounds, antiulcer, chemotaxis, antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 <i>Maytenus cassineformis</i> Reissek.....	42
Figura 1.2 <i>Maytenus dasyclada</i> Martius.....	43
Figura 1.3 Alcaloides piridínicos sesquiterpênicos poliésteres do tipo aquifoliuninas	47
Figura 1.4 Estruturas de triterpenos quinonametídicos em <i>Maytenus</i>	48
Figura 1.5 Triterpenos e esteroides descritos para <i>Maytenus</i>	49
Figura 1.6 Illicifolinosídeos isolados de <i>M. illicifolia</i>	49
Figura 1.7 Representação esquemática da rota biossintética dos flavonoides.....	52
Figura 1.8 Estruturas representativas de flavan-3-ols.....	53
Figura 1.9 Estruturas representativas de catequinas.....	53
Figura 1.10 Estruturas dos flavonoides trifolina e hiperina.....	54

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Cromatograma obtido por análise em CLAE do extrato hexânico de <i>M. cassineformis</i> no comprimento de onda de 254 nm, com representação do espectro de UV dos principais picos.....	83
Figura 2.2 Cromatograma obtido por análise em CLAE do extrato hexânico de <i>M. dasyclada</i> no comprimento de onda de 254 nm, com representação do espectro de UV dos principais picos.....	84

Figura 2.3 Cromatograma obtido por análise em CLAE do extrato acetato de etila de <i>M. cassineformis</i> no comprimento de onda de 254 nm, com representação do espectro de UV dos principais picos observados do tempo 0 a 40 minutos.....	86
Figura 2.4 Cromatograma obtido por análise em CLAE do extrato acetato de etila de <i>M. cassineformis</i> no comprimento de onda de 254 nm, com representação do espectro de UV dos principais picos observados do tempo 41 a 70 minutos.....	87
Figura 2.5 Cromatograma obtido por análise em CLAE do extrato acetato de etila de <i>M. dasyclada</i> no comprimento de onda de 254 nm, com representação do espectro de UV dos principais picos observados.....	87
Figura 2.6 Cromatogramas obtidos por análise em CLAE dos extratos acetato de etila de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i> , e os padrões quercetina e canferol no comprimento de onda de 254 nm.....	88
Figura 2.7 Cromatograma obtido por análise em CLAE do extrato etanólico de <i>M. cassineformis</i> no comprimento de onda de 254 nm, com representação do espectro de UV dos principais picos observados.....	90
Figura 2.8 Cromatograma obtido por análise em CLAE do extrato etanólico de <i>M. dasyclada</i> no comprimento de onda de 254 nm, com representação do espectro de UV dos principais picos observados.....	91
Figura 2.9 Cromatogramas obtidos em análise por CLAE dos extratos aquosos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	93
Figura 2.10 Cromatogramas a 254 nm e espectros de absorção no UV obtido em análise por CLAE das substâncias químicas de referência epicatequina, galocatequina, quercetina e canferol.....	93
Figura 2.11 Cromatogramas a 254 nm, normalizados no maior pico de cada cromatograma, obtidos em análise por CLUE-DAD dos diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	95
Figura 2.12 Cromatogramas a 254 nm, normalizados em 500000 unidades de absorvância, obtidos em análise por CLUE-DAD dos diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	96

Figura 2.13 Espectros EM-EM [M-H]- para o composto 12, canferol, no extrato acetato de etila da espécie <i>M. cassineformis</i>	99
Figura 2.14 Espectros EM-EM [M-H]- para o composto 12, canferol, no extrato acetato de etila da espécie <i>M. dasyclada</i>	99
Figura 2.15 Espectro EM-EM [M-H]- para o composto 12, canferol, no extrato etanólico da espécie <i>M. dasyclada</i>	100
Figura 2.16 Espectro EM-EM [M-H]- para o composto 12, canferol, no extrato hexânico da espécie <i>M. dasyclada</i>	100
Figura 2.17 Espectro EM-EM [M-H]- para o composto 12, canferol.....	101
Figura 2.18 Espectro EM-EM [M-H]- para o composto 11, quercetina, em extrato acetato de etila de <i>M. cassineformis</i>	101
Figura 2.19 Espectro EM-EM [M-H]- para o composto 11, quercetina, em extrato acetato de etila de <i>M. dasyclada</i>	102
Figura 2.20 Espectro EM-EM [M-H]- para o composto 11, quercetina, em extrato etanólico de <i>M. dasyclada</i>	102
Figura 2.21 Espectro EM-EM [M-H]- para o composto 11, quercetina.....	102

CAPÍTULO 3

Figure 1. Chromatograms of ethyl acetate (MDAE), ethanolic (MDE) and hexanic (MDH) of <i>Maytenus dasyclada</i> leaves extracts at 254 nm.....	140
---	-----

Figure 2. Percentage of injured area obtained by the effect of oral administration *M. dasyclada* leaves extracts (250 mg / kg) induced acute gastric ulcers in rats by ethanol, associated with administration of L-NAME (70 mg / kg, ip)..... 145

Figure 3. Percentage of injured area obtained by the effect of oral administration *M. dasyclada* leaves extracts (250 mg / kg) induced acute gastric ulcers in rats by ethanol, associated with administration of NEM (70 mg / kg, ip)..... 146

CAPÍTULO 4

Figure 1. HPLC/DAD phenolics profile of HE (A), EAE (C), EE (E) extracts of *M. cassineformis*, and HE (B), EAE (D), EE (F) of *M. dasyclada* extracts..... 154

Figure 2. Total antioxidant reactivity (TRAP, nmL/Trolox/mg protein) of extracts and Trolox..... 156

Figure 3. Inhibition of nitric oxide radicals by extracts..... 159

Figure 4. Effect of *Maytenus* extracts on TBARS production in serum..... 160

Figure 5. Effect of *Maytenus* extracts on protein carbonyl content in serum samples..... 161

Figure 6. Effect of *M. dasyclada* extracts on comet assay expressed in damage index (DI₁₀₀)..... 164

Figure 7. Effect of *M. cassineformis* extracts on comet assay expressed in damage index (DI₁₀₀)..... 165

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 Composição química de espécies de <i>Maytenus</i>	44
Tabela 1.2 Usos etnofarmacológicos de espécies de <i>Maytenus</i>	57

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Parâmetros definidos para a análise cromatográfica por CLAE-UV dos diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	75
Tabela 2.2 Sistema gradiente utilizado para análise por CLAE-UV dos diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	76
Tabela 2.3 Parâmetros cromatográficos empregados na análise por CLUE-DAD-IES-EM de diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	77
Tabela 2.4 Sistema gradiente utilizado para análise por CLUE-DAD-IES-EM dos diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	77
Tabela 2.5 Rendimentos obtidos pelos métodos extrativos de maceração / partição e por soxhlet dos diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	81
Tabela 2.6 Tempos de retenção e absorvâncias obtidas por CLAE/DAD dos picos observados nos cromatogramas dos extratos hexânicos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	85
Tabela 2.7 Valores de tempo de retenção e absorvância para os padrões de referência disponíveis no laboratório.....	86
Tabela 2.8 Tempos de retenção e absorvâncias obtidas por CLAE/DAD dos picos observados nos cromatogramas de extratos acetato de etila de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	89

Tabela 2.9 Tempos de retenção e absorvâncias obtidas por CLAE/DAD dos picos observados nos cromatogramas de extratos etanólicos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	91
Tabela 2.10 Tempos de retenção, absorção no UV, e dados de IES-EM em modo negativo dos compostos presentes nos diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i> e <i>M. dasyclada</i>	97
Tabela 2.11 Migração de neutrófilos pelo método de quimiotaxia <i>in vitro</i> de diferentes extratos de <i>M. dasyclada</i>	103
Tabela 2.12 Migração de neutrófilos pelo método de quimiotaxia <i>in vitro</i> de diferentes extratos de <i>M. cassineformis</i>	104
 CAPÍTULO 3 	
Table 1 Effects of ethanolic, ethyl acetate and hexanic extracts of <i>M. dasyclada</i> and omeprazole on ethanol-induced ulcers in rat.....	141
Table 2 Effects of ethanolic, ethyl acetate and hexanic extracts of <i>M. dasyclada</i> and cimetidine on NSAID-induced ulcers in rat.....	142
Table 3 Effects of ethanolic, ethyl acetate and hexanic extracts of <i>M. dasyclada</i> and cimetidine, administered intraduodenally, on the biochemical parameters of gastric juice obtained from pylorus ligation in rats.....	143
Table 4 Effects of ethanolic, ethyl acetate and hexanic extracts of <i>M. dasyclada</i> and carbenoxolone on Alcian Blue binding to free gastric mucus from pylorus ligation in rats.....	144

CAPÍTULO 4

Table 1. Total polyphenols (TP) and total flavonoids (TF) in the HE, EAE and EE extracts from leaves of <i>M. dasyclada</i> and <i>M. cassineformis</i>	153
Table 2. Comparison of the efficiencies of extracts and control in preventing 2-deoxyribose degradation.....	158

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABTS = ABAP: 2,2' – azobis [2-amidinopropano]

ACN: acetonitrila.

AINEs: anti-inflamatórios não esteroides

CCD: cromatografia em camada delgada.

CG- EM: Cromatografia Gasosa acoplada a detector de massas.

CG: Cromatografia Gasosa

CLAE/DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

CLAE/UV: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta.

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência.

CO₂: dióxido de carbono.

DP: desvio padrão.

DPPH: hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.

ED₅₀: dose efetiva que produz uma resposta terapêutica em 50% dos sujeitos

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EM: espectrômetro de massas.

EPM: erro padrão da média.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nation.

FDA: Food and Drug Administration.

IC₅₀: metade da concentração máxima inibitória

IV: infravermelho.

L-NAME: N-nitro-L-arginina metil éster

NO: óxido nítrico

PVDF: membrana filtrante em fluoreto de polivilideno.

Rf: fator de retenção

RMN C¹³: ressonância magnética nuclear de carbono.

RMN H¹: ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

TBARS: substâncias reativas ao tiobarbitúrico

TEAC: capacidade antioxidante equivalente a trolox.

TFA: ácido trifluoroacético

TRAP: potencial antioxidante total.

Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UV: ultravioleta.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	29
OBJETIVOS	35
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DO TEMA.....	39
1 GÊNERO <i>Maytenus</i>.....	41
1.1 <i>Maytenus cassineformis</i> Reissek.....	41
1.2 <i>Maytenus dasyclada</i> Martius.....	42
2 ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO <i>Maytenus</i>.....	43
2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	50
3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROFOTOMÉTRICAS DO GÊNERO <i>Maytenus</i>.....	54
4 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO GÊNERO <i>Maytenus</i>.....	56
4.1 USOS POPULARES E ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.....	56
4.2 ATIVIDADE GASTROPROTETORA.....	59
4.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	64
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	66
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE QUÍMICA QUALITATIVA E ATIVIDADE ANTIQUIMIOTÁXICA DE <i>M. cassineformis</i> E <i>M. dasyclada</i>.....	69
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 PARTE EXPERIMENTAL.....	73

2.1 SOLVENTES E REAGENTES.....	73
2.2 MATERIAL VEGETAL.....	74
2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	74
2.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CLAE-UV.....	74
2.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CLUE-DAD-IES-MS.....	76
2.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	78
2.6.2 Obtenção da suspensão de leucócitos.....	78
2.6.2 Quimiotaxia leucocitária.....	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1 RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES.....	80
3.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CLAE-UV.....	82
3.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CLUE-DAD-IES-MS.....	94
3.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	103
CAPÍTULO 3 – Artigo: GASTROPROTECTIVE MECHANISMS OF <i>Maytenus dasyclada</i> MART. (CELASTRACEAE): INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE AND SULFYDRIL COMPOUNDS.....	111
CAPÍTULO 4 – Artigo: ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF <i>Maytenus dasyclada</i> MART. AND <i>Maytenus cassineformis</i> REISS. (CELASTRACEAE).....	149

DISCUSSÃO GERAL.....	177
CONCLUSÕES GERAIS.....	191
REFERÊNCIAS.....	197

A ordem Celastrales, *sensu* Cronquist (1988), é constituída por dez famílias, com espécies predominantemente lenhosas ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais (BARROSO *et al.* 1991). Para o Brasil, segundo a classificação proposta por Cronquist (1988), esta ordem é constituída por cinco famílias: Aquifoliaceae, Celastraceae, Icacinaceae, Lepidobotryaceae e Parnassiaceae; e cinco subfamílias: Campylostemonoideae, Celastroideae, Tripterygioideae, Cassinoideae e Goupioideae. As primeiras obras importantes, com relatos e descrições sobre espécies brasileiras pertencentes a esta ordem foram feitas por Reissek (1861), Loesner (1942) e Sleumer (1959).

Ressalta-se que os últimos sistemas de classificação propostos para as angiospermas, baseados principalmente em técnicas de biologia molecular, têm indicado novas posições filogenéticas para as famílias citadas acima. De acordo com o sistema de classificação APG II (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009), Celastraceae (com incorporação de Hippocrateaceae) pertence à ordem Celastrales (Eurosids I), Aquifoliaceae à ordem Aquifoliales (Euasterids II) e Icacinaceae pertence à Euasterids I, com posição ainda incerta quanto à ordem.

A família Celastraceae inclui cerca de 1.210 espécies distribuídas em 98 gêneros, principalmente nos trópicos e subtropicais tanto do Velho quanto do Novo Mundo. Plantas desta família são compostas de árvores perenes ou caducas, arbustos, cipós, trepadeiras (por exemplo, *Salacia*), ou menos frequentemente herbáceas anuais e perenes, e tem, geralmente, de 4 a 5 flores bissexuais ou unissexuais, pequenas, ocorrendo na mesma planta ou em plantas diferentes (SIMMONS *et al.*, 2001). *Maytenus* (225 espécies), *Euonymus* (200 espécies), *Cassine* (40 espécies) e *Celastrus* (30 espécies) são os maiores gêneros da família (HEYWOOD, 1993; WOODLAND, 1991). A estas espécies são atribuídos vários usos na medicina popular e na agricultura, especialmente na Ásia e no Continente Americano (GONZALEZ *et al.*, 2000), mas, o principal interesse econômico desta família são algumas espécies do gênero *Maytenus*, utilizadas popularmente contra afecções gástricas, como úlceras e gastrites (SANTOS, 2008).

O número de gêneros e espécies varia muito de acordo com diferentes

autores. Segundo Simmons e colaboradores (2001) isso ocorre porque são poucos os trabalhos taxonômicos realizados dentro da família e a delimitação de gêneros e espécies ainda é controversa. No Brasil está representada por 17 gêneros e cerca de 100 espécies, amplamente distribuídas em diversos tipos de vegetação (SOUZA; LORENZI, 2005).

Maytenus, maior gênero da família Celastraceae, está inserido na subfamília Celastroideae. Atualmente, são reconhecidas cerca de 200 espécies com distribuição tropical (MABBERLEY, 1997). No Brasil extra-amazônico está representado por 39 espécies, reunidas em duas seções: *Maytenus* Mol. e *Oxyphylla* Loes (MOSSI, 2002), e é onde encontra o maior centro de diversidade específica do gênero (BORNSTEIN, 1989). Em levantamento realizado por Carvalho-Okano (1992), foram identificadas 6 espécies de ocorrência no Estado do Rio Grande do Sul: *Maytenus dasyclada* Mart., *Maytenus cassineformis* Reiss., *Maytenus evonymoidis* Reiss., *Maytenus boaria* Mol., *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

M. ilicifolia e *M. aquifolia*, seção *Oxyphylla*, ganham destaque pela vasta utilização popular como antiulcerogênicas, anti-inflamatórias e antitumorais (SOUZA-FORMIGORI *et al.* 1991; GONZALEZ *et al.*, 2001; JORGE *et al.*, 2004; MOSSI *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2007). Pelas regras internacionais de nomenclatura botânica não podem existir dois epítetos específicos iguais (por exemplo: *ilicifolia*). Em 1858 foi publicado o nome *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., que tem prioridade sobre o nome publicado em 1861, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. O primeiro nome foi publicado com base em uma planta oriunda da Bahia e tem como nome válido *Maytenus truncata* Reissek, segundo tese de Rita Carvalho-Okano, disponível no banco de teses, UNICAMP e aceito na Lista de Espécies da Flora do Brasil (CARVALHO-OKANO, 1992). O segundo nome foi descrito com base em uma planta que ocorre nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e todos os estados da região sul do Brasil. Portanto, este segundo nome é considerado, pelas regras internacionais de nomenclatura botânica, como um nome ilegítimo. Baseado nisto, outro botânico, de nome D.J. Mabberley, renomeou a espécie do sul do Brasil em 1990, criando o nome novo *Maytenus officinalis* Mabb. Este seria atualmente o nome

correto da espécie em questão. No entanto, devido ao largo uso do nome *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Biral e Lombardi (2012) propuseram que o mesmo fosse considerado como um nome conservado (nomina conservanda), já que trabalhos científicos de química, farmacologia, etc. e também pela existência de patentes com este nome, fariam com que a sua alteração para *Maytenus officinalis* causasse enorme confusão.

Esta espécie é conhecida popularmente como espinheira-santa ou cancorosa, é um arbusto ou árvore pequena, de até 5 m de altura, dióica, com folhas alternas, coriáceas e subcoriáceas, glabras e com pecíolo curto. É oriunda, como dito anteriormente, do Sul e Centro-Oeste do Brasil, principalmente dos bosques de Mato Grosso do Sul, São Paulo até o Rio Grande do Sul, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Argentina (CABRERA, 1965). Nestes países, as folhas e o caule são utilizados no chimarrão ou na forma de chás em casos de úlceras sangrentas, hipertensão arterial, dores articulares, diuréticas, antioxidantes e analgésicas (QUEIROGA *et al.*, 2000; LEITE, 2002; JORGE *et al.*, 2004).

Os principais constituintes químicos presentes nas folhas são triterpenos, como a maitenina, maitefolinas A e B (BUFFA FILHO *et al.*, 2002), friedelina, friedelan-3-ol, lupeol, betulina (CORDEIRO; VILEGAS; LANÇAS, 1999; MOSSI *et al.*, 2004); e, compostos polifenólicos, predominantemente os heterosídeos da quercetina e canferol (NAKAMURA *et al.*, 1997; LEITE *et al.*, 2001, LEITE, 2002), e catequinas, como a epicatequina, etilepigalocatequina e 4'-O-metil-ent-galocatequina (SOARES *et al.*, 2004).

M. aquifolia é facilmente confundida com a espécie *M. ilicifolia*, sendo que ambas apresentam constituição química e propriedades medicinais muito semelhantes (MOSSI, 2003). Além disso, são espécies medicinais nativas do Brasil ameaçadas de extinção devido à forte ação antrópica nas populações naturais (VIEIRA, 2002). Esta ação, associada a sua importância medicinal, resultou na inclusão de *M. ilicifolia* na lista de espécies ameaçadas da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) como uma das espécies prioritárias para estudo e conservação de espécies nativas (MOSSI, 2003).

Neste sentido, tornam-se imprescindíveis trabalhos botânicos, genéticos, químicos e biológicos, que objetivem a conservação e uso sustentável das espécies ameaçadas, bem como, a investigação do potencial de novas espécies, que surgem como fontes de novos fármacos ou fitoterápicos. O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta (CALIXTO, 2003).

M. dasyclada e *M. cassineformis* pertencem à seção *Maytenus*, com distribuição predominantemente no Rio Grande do Sul. *M. dasyclada* se apresenta como árvore ou arbusto, medindo cerca de 5 metros de altura, com ramos muito ramificados no ápice, pubescentes, tetra-carenados. Popularmente denominada coração-de-negra, é reconhecida por suas folhas pequenas, membranáceas; pela densa ramificação e ramos carenados, com pubescência curta e ereta (CARVALHO-OKANO, 1992). *M. cassineformis*, conhecida popularmente como coração-de-bugre, é um arbusto ou árvore que mede cerca de 3 metros de altura, com ramos novos glabros angulosos e lenticelados. As folhas são geralmente coriáceas, obovais, subsésseis, dotadas de margem crenada com glândulas apiculiformes (características taxonômicas utilizadas na identificação). Ambas são utilizadas pelas propriedades febrífugas (BERGAMIN; MONDIN, 2006).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar aspectos químicos e biológicos das folhas das espécies vegetais *Maytenus dasyclada* Mart. e *Maytenus cassineformis* Reiss., determinando o perfil fitoquímico por meio de técnicas cromatográficas e espectrométricas; e analisando atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro*, e atividade antiulcerogênica *in vivo*.

OBJETIVOS

1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo de caracterização química de extratos de diferentes polaridades das folhas das espécies *M. dasyclada* e *M. cassineformis*. Além disso, investigar possíveis atividades biológicas, através de ensaios antioxidante e anti-inflamatório *in vitro* e atividade antiulcerogênica *in vivo*; de extratos das folhas das espécies vegetais.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos em etanol, acetato de etila e hexano das folhas das espécies *M. dasyclada* e *M. cassineformis*;
- Investigar e comparar os aspectos fitoquímicos dos extratos obtidos através do uso de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada a detector de Ultravioleta, e Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência acoplada a detector de espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade sobre a mobilização leucocitária *in vitro* destes extratos através do ensaio de quimiotaxia com a utilização do método da câmara de Boyden;
- Avaliar a atividade gastroprotetora dos extratos das folhas das espécies de *M. dasyclada* através de modelos animais agudos (etanol e AINEs) e avaliar a atividade dos extratos sobre a secreção gástrica;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos das folhas das espécies de *M. dasyclada* e *M. cassineformis* através da avaliação da capacidade antioxidante total (TRAP), atividade contra os radicais óxido nítrico e hidroxil, índice de lipoperoxidação e oxidação protéica;

Avaliar, através de ensaio cometa, a genotoxicidade dos extratos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DO TEMA

1 GÊNERO *Maytenus*

O gênero *Maytenus* foi primeiramente descrito por Feulée em 1725, sob o nome de *Mayten*. Em 1782, Molina estabeleceu o gênero *Maytenus* baseado na espécie tipo *Maytenus boaria*, do Chile. Segundo o autor, o gênero se caracterizava por apresentar cálice monossépalo, corola monopétala, androceu com dois estames e fruto monospermico (CARVALHO-OKANO, 1992). Mais tarde, o próprio Molina reconheceu estas observações sobre o gênero como errôneas e atribuiu essas falhas ao tamanho pequeno das flores, associado à inexistência de melhores equipamentos.

A partir de então, a autoria do gênero *Maytenus* foi atribuída indistintamente a diferentes autores (Molina, Feulée, Jussieu, Molina e Feulée), até que, finalmente, o *Index Genericorum* oficializou Molina como autor do gênero, que reconheceu suas observações morfológicas errôneas e efetuou alterações na circunscrição do gênero. Segundo Tropicós (1858) e Lombardi, Groppo e Biral (2012) o gênero *Maytenus* é atribuído a Molina.

As características diagnósticas do gênero *Maytenus* são: árvores ou arbustos; folhas alternas, estípulas inoscópicas; inflorescências em cimeiras de vários tipos; frutos capsulares, bivalvares; sementes variando de 1-4 por fruto, envoltas inteiramente por um arilo branco (CARVALHO-OKANO, 1992).

Vários autores descrevem para o gênero um gineceu constituído por 2 ou 3 carpelos; ovário 2-3 locular e fruto 2-3 valvar (REISSEK, 1861; LOESNER, 1942; SEBSEBE, 1985). Entretanto em trabalho de Carvalho-Okano (1992) relata-se apenas a presença de gineceu bicarpelar, bilocular e fruto bivalvar.

1.1 *Maytenus cassineformis* Reissek

Arbusto ou árvore medindo cerca de 3 metros de altura. Ramos novos glabros, angulosos e lenticelados. As características taxonômicas utilizadas no reconhecimento de *M. cassineformis* são a presença de folhas geralmente

coriáceas, obovais, subsésseis, dotadas de margem crenada com glândulas apiculiformes de coloração castanha bem intensa; inflorescências em cimas reduzidas; pedicelos florais curtos e a persistência de cálice e corola nos frutos maduros (Figura 1.1) (CARVALHO-OKANO, 1992).

Ocorre na região sul do Brasil, predominantemente no estado do Rio Grande do Sul. Cita-se a ocorrência da espécie em Santa Catarina e Minas Gerais, e, no Paraná, até o momento, não se tem registro. Referida também para a Flora do Uruguai (HERTER; LEGRAND, 1936; LOMBARDI; GROPPPO; BIRAL, 2012).

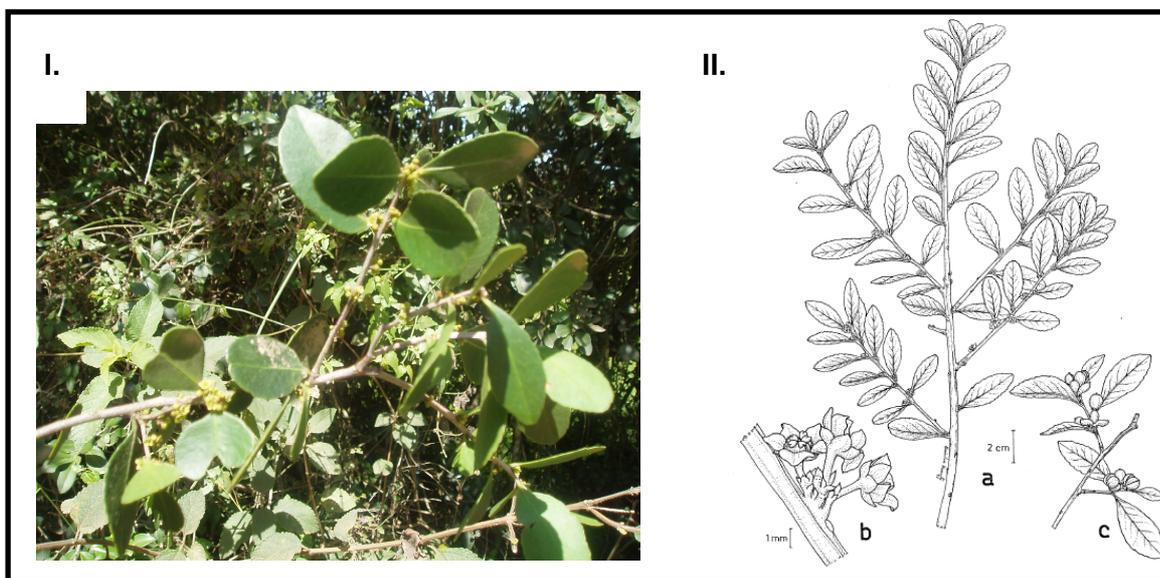


Figura 1.1 I. *Maytenus cassineformis* Reissek (FONTE: Autor). II. a) Aspecto do ramo com flores. b) Detalhe da inflorescência. c) Aspecto do ramo com frutos (CARVALHO-OKANO, 1992).

1.2 *Maytenus dasyclada* Martius

Arbusto ou árvore medindo cerca de 5 metros de altura. Ramos muito ramificados no ápice, pubescentes, tetra-carenados. Reconhecida por suas folhas pequenas, membranáceas; pela densa ramificação, por ramos carenados, com pubescência curta e ereta e suas inflorescências congestas e fasciculadas. É importante ressaltar que, o bordo das sépalas e pétalas apresenta-se geralmente

reentrante pela presença de pelos e fímbrias, respectivamente (Figura 1.2) (CARVALHO-OKANO, 1992).

Ocorre predominantemente no sub-bosque das florestas de araucária no Rio Grande do Sul. Encontrada também no Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro (LOMBARDI; GROPPA. BIRAL, 2012).

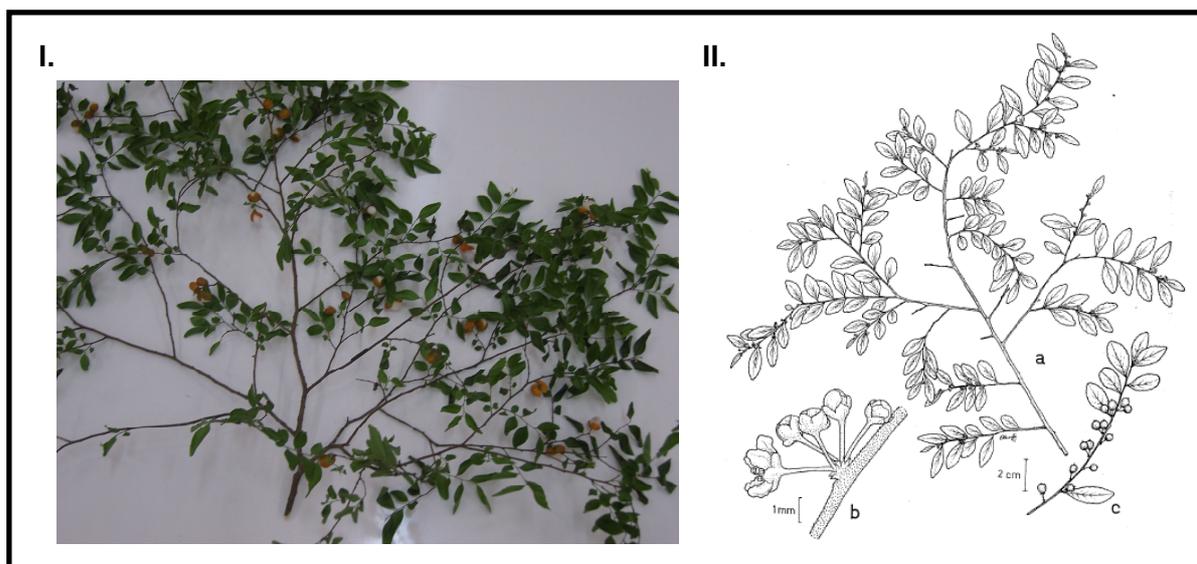


Figura 1.2 I. *Maytenus dasyclada* Martius (FONTE: Autor). II. a) Aspecto do ramo com flores. b) Detalhe da inflorescência. c) Aspecto do ramo com frutos (CARVALHO-OKANO, 1992).

2. ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO *Maytenus*

Muitos constituintes químicos são relatados para o gênero *Maytenus*. Alcaloides macrocíclicos dotados de atividade antitumoral foram durante muito tempo considerados importantes marcadores para a espécie tendo sido isolados de folhas, caules e raízes de *M. ilicifolia* (AHMED *et al.*, 1981). Este isolamento, porém, não foi comprovado em estudos posteriores, e tampouco alcaloides piridínicos sesquiterpênicos relatados para as cascas das raízes (SHIROTA *et al.*, 1997).

No entanto, os principais constituintes químicos presentes em espécies deste gênero são compostos terpenoides e fenólicos. Entre os compostos polifenólicos predominam os heterosídeos da quercetina e canferol (LEITE *et al.*, 2001),

leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis e condensados, e derivados da catequina (SOARES *et al.*, 2004; BAGGIO *et al.*, 2007). A Tabela 1.1 demonstra compostos referenciados para algumas espécies do gênero *Maytenus*.

Tabela 1.1 Composição química de espécies de *Maytenus*.

ESPÉCIE	TIPO COMPOSTO	NOME COMPOSTO	AUTORES
<i>M. apurimacensis</i> Loes.	Sesquiterpenos tipo agarofurano; triterpenos tipo lupano	(1S, 4S, 5S, 6R, 7R, 8S, 9R, 10R)-8-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-6-nicotinoiloxi-dihidro-agarofurano, (1S, 4R, 5R, 6R, 7R, 8S, 9R, 10R)-8-acetoxi-1,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-6-nicotinoiloxi-dihidro-agarofurano, 1-hidroxi-3-cafeatulup20(29)-eno	DELGADO-MENDEZ <i>et al.</i> , 2008; VASDEKIS <i>et al.</i> , 2009.
<i>M. arbustifolia</i> Hochst. & A. Rich.	Triterpenos e sesquiterpenos tipo agarofurano	α -amirina, (-)-epicatequina e (-)-4O-metilepigalocatequina	ORABI <i>et al.</i> , 2001.
<i>M. buchananii</i> Loes.	Alcaloides	Maitansina, maitanprinae maitanbutina	KUPCHAN <i>et al.</i> , 1972.
<i>M. buxifolia</i> Griseb.	Alcaloides e terpenoides	Maifolina, N(1)-acetil-N(1)-deoximaifolina, pristimerina, celastrol, 28-hidroxi-friedelano-1,3-diona e 29-hidroxi-friedelano-1,3-diona	RIPPERGER, 1980; DIAZ; RIPPERGER, 1982; NOGUEIRAS <i>et al.</i> , 2001.
<i>M. heterophylla</i> Eckl. & Zeyth.	Sesquiterpenos tipo agarofurano e	1-acetoxi-9-benzoiloxi-2,6-dinicotinoiloxi--dihidro agarofurano, β -amirina, ácido maitenfólico, 3 α -hidroxi-2-	ORABI <i>et al.</i> , 2001.

	Triterpenos tipo lupano	oxofriedelano-20 α -ácido carboxílico, lup20(29)-eno-1 β ,3 β -diol,(-)-4'-metilepigalocatequina e (-)-epicatequina	
<i>M. horrida</i> Reiss.	Triterpeno tipo lupano	1 β , 3 β , 11 α -trihidroiolean-12-ona	GONZALEZ, FERRO, RAVELO, 1987.
<i>M. laevis</i> Reiss.	Terpenoides e compostos fenólicos	Tingenona, 22-hidroxitingenona, (-)-4'-O-metilepigalocatequina, pristimerina	GONZALEZ <i>et al.</i> , 1982.
<i>M. loeseneri</i> Urb.	Alcaloides	Loesenerina, 17,18-Didehidroloesenerina e 16,17-didehidroloesenerina-18-ol	DIAZ, PREISS, RIPPERGER, 1987; PREISS, DIAZ, RIPPERGER, 1988.
<i>M. nemerosa</i> Eckl. & Zeyth.	Triterpenos tipo friedelano	3-oxo-20(29)-lupen-30-al, β -amirina, 29-hidroxfriedelan-3-ona, 30-hidroxi-20(29)-lupen-3-ona, 30-hidroxfriedelan-3-ona, lup-20(29)-eno-3 β ,30-diol, tingenona, 23-hidroxitingenona e galactiol	SHENG-DING <i>et al.</i> , 1984.
<i>M. undata</i> Thunb.	Triterpenos tipo oleanano	3-oxo-11 α -metoxiolean-12-ano-ácido 30-oico, 3-oxo-11 α -hidroxiolean-12-ano-ácido 30-oico, ácido 3-oxo-18 β -glicirretínico, 3-oxo-olean-11, 12-dieno-ácido 30-oico, ácido 20-epicoetjápico, ácido coetjápico	MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2000.

FONTE: adaptado de NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011.

Um grande número de sesquiterpenos altamente oxigenados de esqueleto dihidro- β -agarofurano e seus derivados têm sido isolados de membros da família Celastraceae, e muitos são considerados importantes indicadores quimiotaxonômicos (BRÜNING; WAGNER, 1978). Membros deste grupo de produtos naturais são de interesse particular por causa de suas pronunciadas atividades citotóxica, inseticida (NÚÑEZ *et al.*, 2004; WHITSON *et al.*, 2006), imunossupressora (DUAN *et al.*, 2001), anti-HIV (HORIUCH *et al.*, 2006), e antitumoral (GONZÁLEZ *et al.*, 2000), bem como a sua capacidade para reverter a resistência múltipla dependente da glicoproteína P, fenótipo de vários cânceres humanos celulares (MUNOZ-MARTINEZ *et al.*, 2004). Os alcaloides piridínicos macrolídeos sesquiterpênicos representam uma grande subclasse do grupo e são caracterizados pela presença de um porções hidro- β -agarofurano, os anéis A e B, os quais estão na forma de um sistema de anel axialmente dimetilado *trans*-decalina, bem como uma ponte 1,3-diaxialmente fundida constituindo o anel C tetra-hidrofurano, e uma unidade de piridina (LIÃO, 2003).

O interesse gerado por sesquiterpenos poliésteres de Celastraceae aumentou em virtude da complexidade de substâncias isoladas e a possibilidade de virem a ser aplicadas como inseticidas biológicos (MUNOZ *et al.*, 1996). A literatura relata a presença de sesquiterpenos poliésteres em extratos de folhas de *M. aquifolium*, denominadas aquifoliuninas E-I, E-II, E-III e E-IV (Figura 1.3) (CORSINO *et al.*, 1998). Análises das sementes da espécie *M. boaria*, levaram ao isolamento de três sesquiterpenos de tipo eudesmano, nomeados eumaitenina, eumaitenol e acetileumaitenol (BECERRA *et al.*, 1987).

Em um estudo intensivo de metabólitos bioativos de *M. canariensis*, uma espécie endêmica das Ilhas Canárias, isolou-se sesquiterpenos do tipo agarofurano com atividade inseticida (GONZÁLEZ *et al.*, 1990).

Estudo recente relatou o isolamento de dois novos alcaloides piridínicos sesquiterpênicos, denominados ilicifoliuninas A e B, e de dois alcaloides conhecidos, aquifoliunina E-I e maiteina. Estes compostos foram isolados das cascas das raízes de *Maytenus ilicifolia*, e a aquifoliunina E-I demonstrou potente atividade

antiprotozoária *in vitro* contra *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, com valores de IC₅₀ de 1,4 e 41,9 µM, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2012).

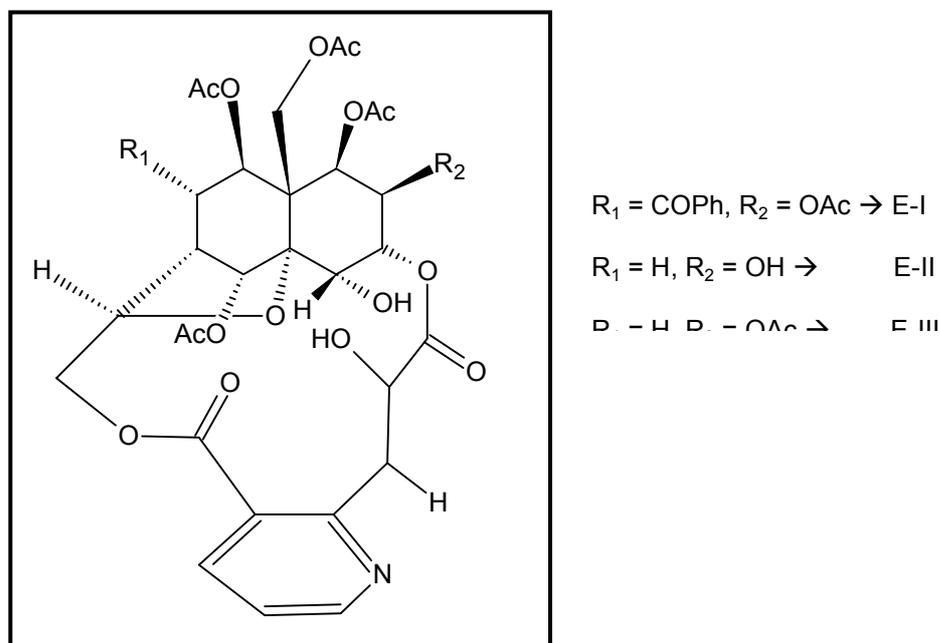


Figura 1.3 Alcaloides piridínicos sesquiterpênicos poliésteres do tipo aquifoliuninas.

Triterpenos são estruturas muito relatadas em espécies de *Maytenus*. Os triterpenoides descritos para a família Celastraceae pertencem às séries friedo-oleano (incluindo triterpenos quinonametídicos e compostos fenólicos), lupano, oleano, glutinano e taraxerano. Os compostos quinonametídicos produzidos nas raízes das plantas são considerados indicadores taxonômicas da família, e possuem efeitos biológicos marcantes. Pode-se citar a pristimerina, o celastrol (Figura 1.4) e a tingenona como as estruturas mais comumente encontradas (GAMLATH *et al.*, 1990).

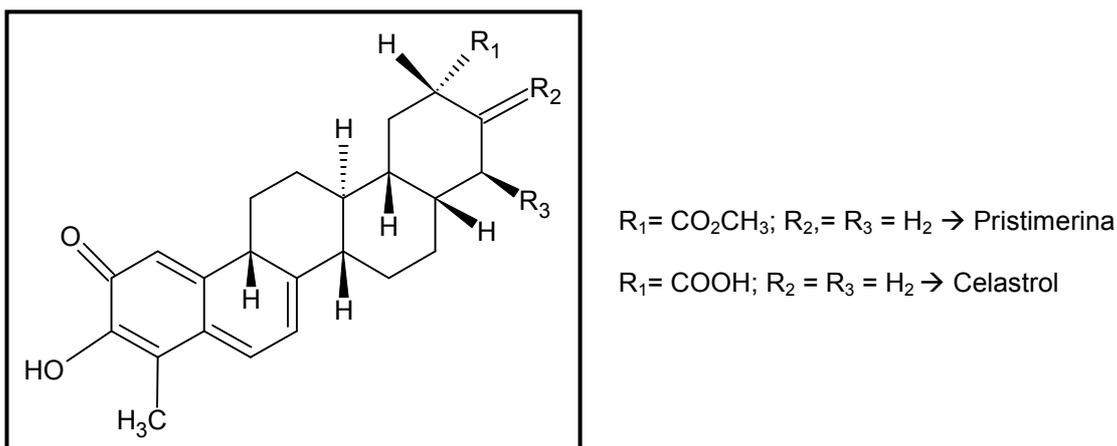


Figura 1.4 Estruturas de triterpenos quinonametídicos em *Maytenus*.

Para o gênero já foram descritos triterpenos como friedelina e friedelan-3 β -ol, em folhas, cascas das raízes e caules de *M. ilicifolia* (ITOKAWA *et al.*, 1991; LEITE, 2002; MOSSI *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2008), e folhas de *M. blepharodes* e *M. magellanica* (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). A pristimerina e seus derivados são descritos para as espécies *M. blepharodes* e *M. magellanica* (GONZÁLEZ *et al.*, 2001), *M. aquifolium* (NOSSACK *et al.*, 2004), *M. chuchhuasca* (MORITA *et al.*, 2008), *M. ilicifolia* (ITOKAWA *et al.*, 1991; COSTA *et al.*, 2008), bem como a maitenina e as maitefolinas (BUFFA-FILHO *et al.*, 2002; OHSAKI *et al.*, 2004) (Figura 1.5).

O novo triterpeno 3,16-dioxo-12 alfa-hidroxifriedelano foi isolado do extrato clorofórmico de ramos de *Maytenus gonoclada* Martius junto com nove compostos conhecidos: 3,11-dioxofriedelano, 3,16-dioxofriedelano, 3,12-dioxofriedelano, 3-oxo-12 α ,29-dihidroxifriedelano, 3-oxofriedelano (friedelina), 3 beta-hidroxifriedelano, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano e 3 β -hidroxilup-20(29)-eno (lupeol) e uma mistura de hidrocarbonetos de cadeias longas (SILVA *et al.*, 2011). Outro novo triterpeno pentacíclico, 3- β ,11- β -dihidroxifriedelano foi isolado das folhas de *Maytenus robusta* Reissek junto com outros quatro compostos: 3-oxofriedelano (friedelina), 3- β -hidroxifriedelano, 3-oxo-29-hidroxifriedelano e 3-oxo-11- β -hidroxifriedelano. A estrutura química e conformação do novo triterpeno friedelano foram estabelecidas por RMN de H-1 e C-13, incluindo experimentos bidimensionais, HSQC, HMBC, COSY e NOESY (SOUSA *et al.*, 2012).

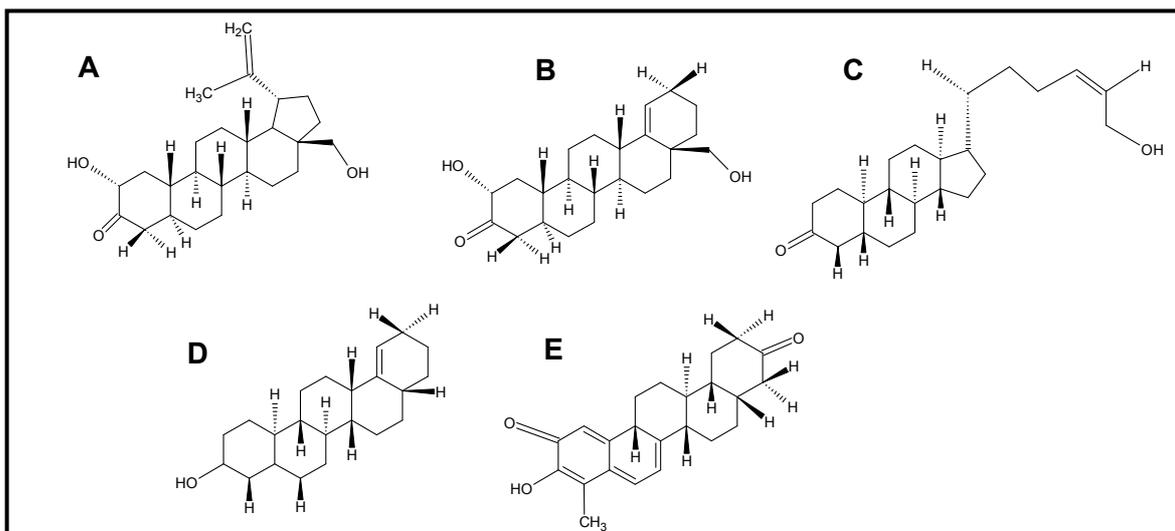


Figura 1.5 Triterpenos e esteroides descritos para *Maytenus*. A = maitefolina A; B = maitefolina B; C = maitefolina C; D = friedelan-3-ol; E = 6-oxotingenol.

Trabalho de Mossi *et al.* (2004) em que extratos das folhas de *M. ilicifolia* obtidos via extração com CO₂ a alta pressão foram submetidos à análise por CG-EM demonstrou a presença de esqualeno, fitol, vitamina E, estigmasterol, friedelan-3-ol, friedelina, ácido dodecanóico e geranyl cetona.

Estudo com as folhas de *M. ilicifolia* levaram ao isolamento de três novos glicosídeos, nomeados ilicifolinosídeos A-C (ZHU; SHARAPIN; ZHANG, 1998) (Figura 1.6).

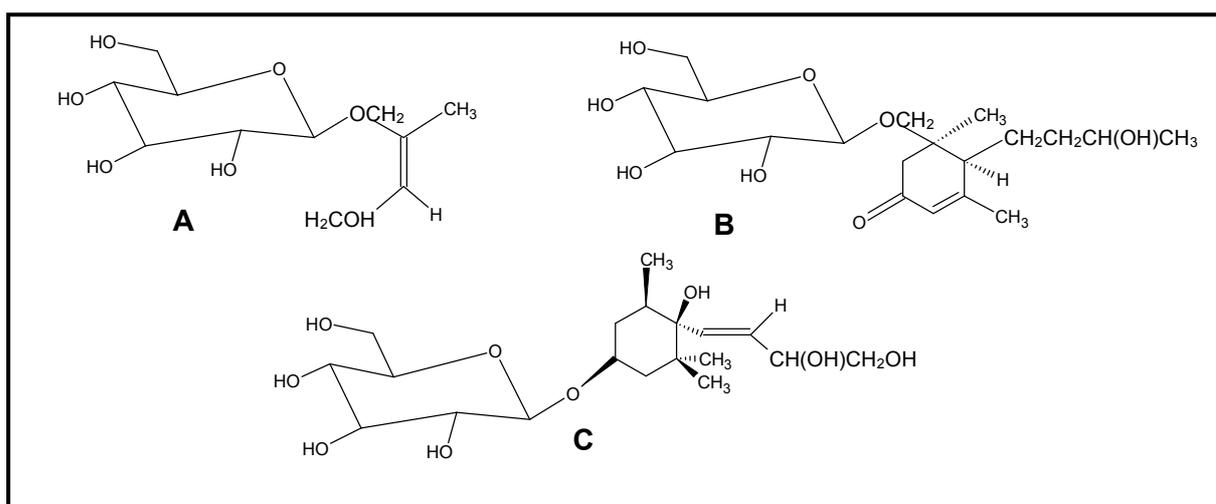


Figura 1.6 Ilicifolinosídeos isolados de *M. ilicifolia*. A = ilicifolinosídeo A; B = ilicifolinosídeo B; C = ilicifolinosídeo C.

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização; um conjunto muito amplo de substâncias de difícil definição. Quimicamente, podem ser consideradas estruturas com, no mínimo, um anel aromático que está diretamente ligado a pelo menos uma hidroxila, ou suas funções derivadas: éster, éter, ácido carboxílico ou glicosídeo. No entanto, para uma definição mais correta, deve-se levar em consideração a origem biogenética desses compostos (QUIDEAU *et al.*, 2011).

São derivados biossintéticos da pentose fosfato, do chiquimato e da via dos fenilpropanoides e constituem um dos grupos fitoquímicos com maior ocorrência e com importantes atividades fisiológicas nas plantas: desempenham um papel importante no crescimento e reprodução, garantindo proteção contra patógenos e predadores (BRAVO, 1998), além de contribuírem para a cor e características sensoriais de frutos e vegetais (ALASALVAR *et al.*, 2001).

Além disso, apresentam uma vasta gama de propriedades fisiológicas: antialérgico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, cardioprotetor e vasodilatador (BENAVENTE GARCIA *et al.*, 1997; MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2001; SAMMAN, LYONS, COOK; 1998). Ácidos fenólicos, flavonoides e taninos são algumas das classes encontradas em plantas do gênero *Maytenus*.

Os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos, derivados do ácido hidroxibenzoico (ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatéico, ácido vanílico, ácido siríngico) e derivados de ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido sináptico) (BRAVO, 1998).

Os flavonoides constituem o maior grupo de fenólicos em plantas e em levantamento descrito há anos já representavam mais de metade dos oito mil compostos fenólicos naturais elucidados (HARBORNE *et al.*, 1999). São moléculas de baixo peso molecular, constituídos por quinze

átomos de carbono, distribuídos em dois anéis aromáticos A e B, unidos por uma cadeia de três carbonos. O anel aromático A, como demonstrado na Figura 1.7, é derivado do acetato / via mevalonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina através da via do chiquimato (BOHM, 1998; MERKEN; BEECHER, 2000).

Os taninos, por sua vez, são estruturas de peso molecular relativamente alto e constituem o terceiro grupo mais importante de fenólicos. Podem ser subdivididos em taninos hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são ésteres do ácido gálico, enquanto os últimos (também conhecidos como proantocianidinas) são polímeros de monômeros polidroxiflavan-3-ol (PORTER, 1989).

Dentre as estruturas já descritas para o gênero *Maytenus*, pode-se destacar a presença de catequina e epicatequina nas folhas e caules de *M. ilicifolia* (SOARES *et al.*, 2004; BAGGIO *et al.*, 2007), folhas e raízes de *M. obtusifolia* (SILVA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008) e folhas de *M. senegalensis* (HUSSEIN *et al.*, 1999), bem como seus derivados: 4-metil-epi-galocatequina, 4-metil-ent-galocatequina em folhas de *M. ilicifolia* (SOARES *et al.*, 2004), folhas e raízes de *M. obtusifolia* (SILVA *et al.*, 2008) e cascas do caule de *M. senegalensis* (HUSSEIN *et al.*, 1999) (Figura 1.8). Pessuto e colaboradores (2009) descrevem ainda procianidina B₁ (epicatequina-(4 β →8)-catequina) e procianidina B₂ (epicatequina-(4 β →8)-epicatequina) em folhas de *M. ilicifolia* (Figura 1.9).

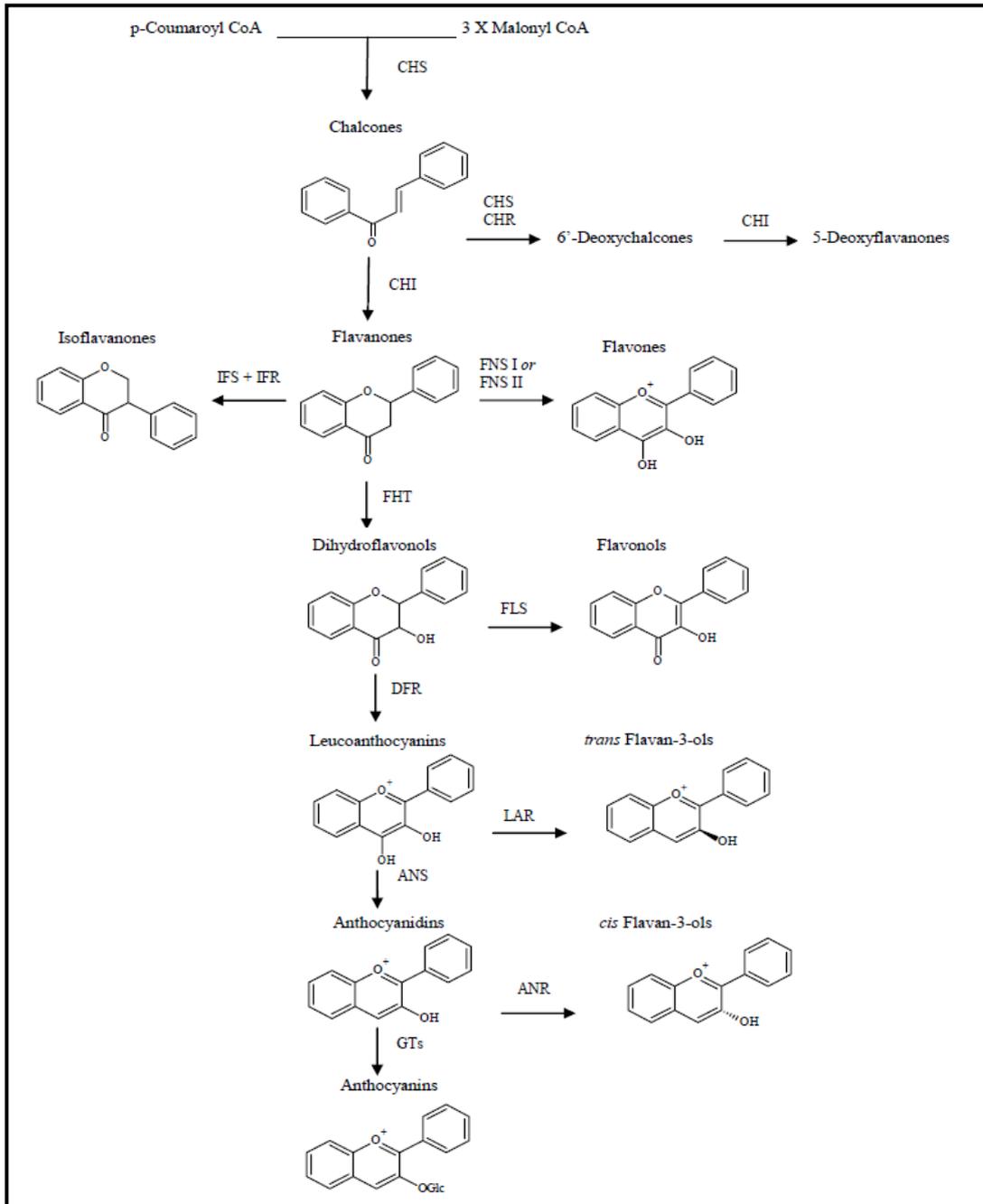
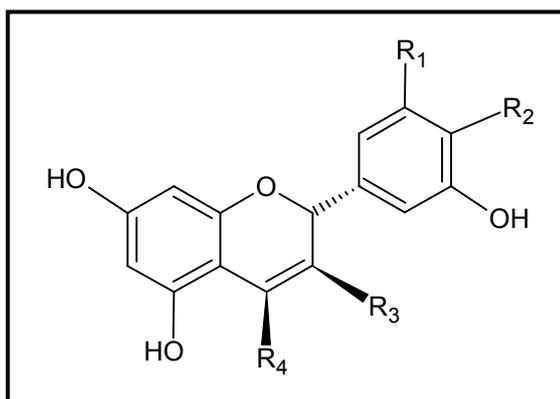


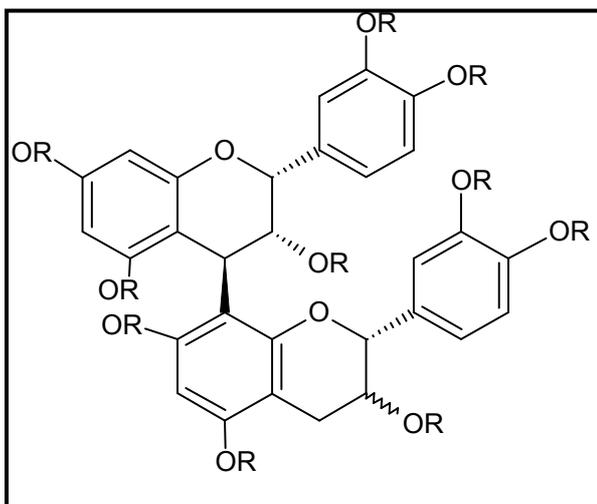
Figura 1.7 Representação esquemática da rota biossintética dos flavonoides. ANR – antocianidina redutase; ANS – antocianidina sintase (também conhecida por leucoantocianidina dioxigenase); CHI – chalcona isomerase; CHS – chalcona sintase; DFR – diidroflavonol 4-redutase; FNSI e FNSII – flavona sintase I e II; IFR – isoflavona redutase; IFS – isoflavona sintase; LAR – leucoantocianidina redutase; GTs – glicosil transferases (MARTENS, MITHÖFER, 2005).



$R_1, R_4 = H; R_2, R_3 = OH \rightarrow (+)$ -Catequina

$R_1, R_2, R_3 = OH; R_4 = H \rightarrow (+)$ -Galocatequina

Figura 1.8 Estruturas representativas de flavan-3-ols (SOUZA *et al.*, 2008).



$R = \blacktriangle H \rightarrow$ Epicatequina-(4*b*→8)-catequina

$R = \text{hatched triangle} H \rightarrow$ Epicatequina-(4*b*→8)-epicatequina

Figura 1.9 Estruturas representativas de catequinas (PESSUTO *et al.*, 2009).

Flavonoides glicosilados derivados da quercetina e canferol são descritos em folhas de *M. ilicifolia* (NAKAMURA *et al.*, 1997; TIBERTI *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008), *M. aquifolium* (SANNOMIYA *et al.*, 1997; TIBERTI *et al.*, 2007), *M. senegalensis* (HUSSEIN *et al.*, 1999) e *M. truncata* (FONSECA *et al.*, 2007). Mais recentemente, evidenciou-se a presença de flavonoide tri-glicosilado em extratos etanólicos das folhas de *M. ilicifolia*, denominado mauritanina, além de trifolina e hiperina (Figura 1.10) (LEITE *et al.*, 2010). Também se relata a presença de galatiol nas folhas de *M. ilicifolia* (BAGGIO *et al.*, 2007).

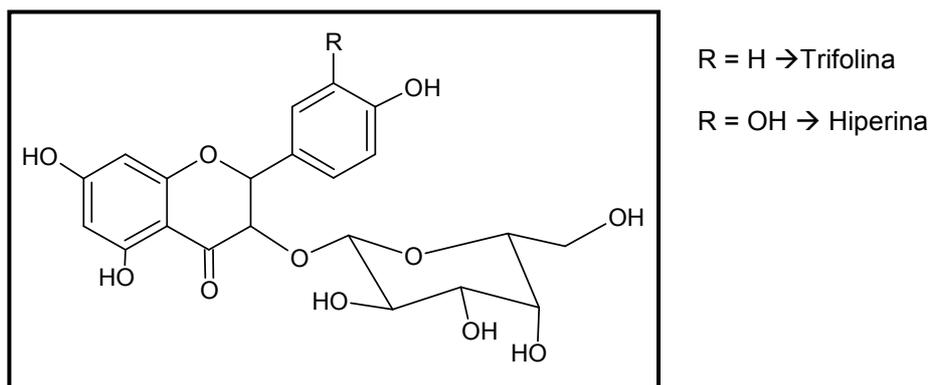


Figura 1.10 Estruturas dos flavonoides trifolina e hiperina (LEITE *et al.*, 2010).

3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS DO GÊNERO *Maytenus*

Muitos métodos analíticos para a análise de compostos triterpênicos e fenólicos já foram descritos para as espécies de *Maytenus*. Flavonoides glicosilados das folhas secas e moídas de *M. ilicifolia* foram quantificados por CLAE. A extração foi inicialmente realizada por infusão com água. Alíquotas desta infusão foram solubilizadas em metanol e fracionadas por Cromatografia em Coluna. A análise das frações por métodos espectrométricos e CLAE demonstrou a presença de 1,75% de quercetina-3-O- α -L-rhamnosilpiranosil (1 \rightarrow 6)-O-[β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3)]-O- α -L-rhamnosilpiranosil (1 \rightarrow 2)]-O-[β -D-galactopiranosídeo] como composto majoritário (LEITE *et al.*, 2001).

Buffa Filho *et al.* (2002) analisaram o conteúdo de derivados de fieno-nor-oleananos em diferentes tipos morfológicos de *M. ilicifolia* coletados em Ribeirão Preto (SP). Os extratos etanólicos das cascas secas das raízes dos exemplares foram particionados em hexano, clorofórmio e acetato de etila. Os extratos foram analisados por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência em coluna C₁₈ sob condições isocráticas de metanol:água (80:20, V/V) contendo 1% de ácido fosfórico. Cinco derivados foram identificados como 20 α -hidroximaitenina, celastrol, 22 β -hidroximaitenina, maitenina e pristimerina.

Um método por CLAE em fase reversa foi desenvolvido e validado por Soares *et al.* (2004) para a separação e quantificação de catequina e epicatequina em extratos aquosos das folhas de *M. ilicifolia*. A fase móvel é constituída por uma mistura de acetonitrila, água e ácido acético, em modo gradiente. No mesmo ano, outro estudo desenvolveu um método analítico para quantificação dos triterpenos maitenina e pristimerina em extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas de *M. aquifolium* através de CLAE acoplado a detector de ultravioleta. O sistema utiliza metanol e ácido trifluoroacético a 1% em modo isocrático (NOSSACK *et al.*, 2004).

A Farmacopeia Brasileira quinta edição (BRASIL, 2010) traz na monografia da espinheira-santa (*M. ilicifolia*) dois métodos de análise quantitativa. O primeiro para doseamento de taninos totais é realizado por espectrofotometria no visível (760 nm), após complexação do extrato aquoso com reagente fosfomolibdotúngstico, solução de carbonato de sódio a 29% (p/v) e pó de pele SQR. O segundo método consiste na quantificação por CLAE da epicatequina, utilizando como fase móvel uma mistura de água, acetonitrila e ácido trifluoroacético e detector de ultravioleta a 210 nm.

A CLAE é uma técnica versátil para separação de produtos naturais em matrizes complexas como extratos brutos e fracionados. Entre todos os detectores usados em CLAE, o mais simples e amplamente utilizado é o UV, embora com algumas limitações, é o que apresenta melhor sensibilidade, linearidade, versatilidade e confiabilidade. Métodos desenvolvidos em CLAE-UV e CLAE-DAD são utilizados para comparar perfis fitoquímicos de espécies estreitamente relacionadas (LIANG; GIANG; ZHAO, 2007) e também pode ser utilizada para comparação com espectros de substâncias já conhecidas, com cromóforos característicos, como no caso de polifenóis (WOLFENDER, 2009).

A associação da cromatografia líquida com espectrometria de massas é uma técnica muito utilizada para caracterização e elucidação rápida de compostos químicos. A espectrometria de massas (EM) pode fornecer informações valiosas sobre compostos desconhecidos, seja em relação à composição elementar, ao peso molecular ou às massas de seus fragmentos. Além disso, a EM tornou-se um instrumento analítico de fundamental importância na detecção, identificação,

elucidação estrutural e quantificação de compostos orgânicos presentes em misturas complexas, mesmo em nível de traços (GRANDE; AQUINO NETO, 1990).

Em estudo de análise por Cromatografia em Fase Gasosa por ionização química acoplada a espectrômetro de massas do óleo de sementes de espécies de *Maytenus*, incluindo *M. dasyclada* e *M. cassineformis*, Spitzer e Aichholz (1996) identificaram ácidos graxos como o α -mono-acetotriacilglicerol (71-76%) com a ajuda de métodos espectroscópicos (IV e RMN H¹ e C¹³).

4 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Maytenus*

4.1 USOS POPULARES E ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Muitas espécies do gênero *Maytenus* são utilizadas na medicina popular de vários países, para os mais variados problemas de saúde (Tabela 1.2), inclusive, muitas destas atividades foram comprovadas em estudos científicos.

Das espécies do gênero, *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. é a mais conhecida e mais explorada economicamente devido a sua utilização na medicina caseira. Desde que a CEME (Central de Medicamentos), em 1983, incluiu esta espécie entre as oito plantas estudadas com atividade biológica promissora, o consumo, tanto *in natura*, quanto para a preparação de fitoterápicos aumentou, colocando em risco estes recursos naturais, classificando a espécie como ameaçada de extinção (SEMA/GTZ, 1995; CARLINI; BRAZ, 1998). Atualmente, existe quatorze formulações, registradas na ANVISA, contendo diferentes extratos de *M. ilicifolia* e registradas como antiulcerosos (ANVISA, 2012).

As atividades antimutagênica e antitumoral, principalmente dos triterpenos isolados do gênero, e as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiulcerogênica são as mais descritas para estas espécies.

Tabela 1.2 Usos etnofarmacológicos de espécies de *Maytenus*.

Espécie	Parte usada	Forma de uso	Indicação	Autores
<i>M. acuminata</i> Loes	Raízes	Decocção	Desordens estomacais	BHAT; JACOBS, 1995.
<i>M. aquifolium</i> Mart.	Folhas	Infusão	Úlceras	PEREIRA <i>et al.</i> , 1995.
<i>M. arbustifolia</i>	Cascas do caule	Infusão	Febres, malária	GAKUNJU <i>et al.</i> , 1995.
<i>M. boaria</i> Mol.	Partes aéreas	Infusão	Erupções cutâneas, purgativa, febrífuga	MUÑOZ <i>et al.</i> , 1995.
<i>M. buxifolia</i> Griseb.	Folhas	Decocção	Febres, menstruação prolongada	ELDRIDGE, 1975.
<i>M. emarginata</i> (Willd.) Hou	Frutos	Decocção	Depurativa, câncer	KUO <i>et al.</i> , 1994.
<i>M. ilicifolia</i> Mart. ex Reiss.	Folhas	Decocção e infusão	Antiséptica, antiúlcera, digestiva, contraceptiva, anti-inflamatória, leishmanicida	QUEIROGA <i>et al.</i> , 2000; ALVARENGA <i>et al.</i> , 2008.
<i>M. krokovii</i> A. C. Smith	Cascas do caule	Infusão para uso externo	Câncer de pele	SHIROTA <i>et al.</i> , 1997.

<i>M. macrocarpa</i>	Raízes	Decocção	Antimicrobiana	KLOUCEK <i>et al.</i> , 2007.
<i>M. putterlickioides</i> (Loes) Exell.	Raízes	Decocção	Antimalárica	MUTHAURA <i>et al.</i> , 2007.
<i>M. senegalensis</i> (Lam.) Exell.	Folhas e raízes	Pó adicionado ao leite, decocção e infusão	Vermífuga, câncer, antimalárica, antibacteriana, anti-inflamatória.	JAIN; LIGHT; VAN STADEN, 2008.

Descreve-se um importante papel do extrato aquoso de *M. ilicifolia*, em diferentes concentrações, na proteção do DNA, exibindo respostas antimutagênicas significativas ou decréscimo sugestivo da mutagenicidade induzida (HORN; VARGAS, 2003). E, ainda, uma importante atividade antitumoral atribuída a alguns triterpenos presentes em espécies deste gênero: maitenina, maitansina, 6-oxotingenol e eritrodiol e cafeato de 3-eritrodiol (FERREIRA de SANTANTA; ASFORA; CORTIAS, 1971; FOX, 1991; SHIROTA *et al.*, 1994; OHSAKI *et al.*, 2004). Estudos recentes também demonstram atividade inibitória da proliferação de células de sarcoma de Kaposi atribuída a triterpenos de núcleo lupano (lup-20(29)-ene-3beta,30diol) e derivados da friedelina (friedelan-3-ona) isolados da espécie brasileira *Maytenus rigida* (MARTUCCIELLO *et al.*, 2010); e atividade quimioprotetora de sesquiterpenos derivados do esqueleto di-hidro-beta-agarofurano isolados das folhas de *Maytenus jelskii* (PERESTELO *et al.*, 2010).

Da Silva *et al.* (2012) avaliaram a atividade citotóxica de extratos ricos em triterpenos quinonametídeos de cultura de calos de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* contra linhas celulares de carcinoma da mama (MCF7) caracterizadas fenotipicamente e células de fibroblastos normais (3T3). As células foram incubadas durante 48 horas com concentrações diferentes de amostra, entre 100 e 4 µg/mL e DMSO a 1% (utilizado para a diluição dos extratos). A citotoxicidade foi avaliada por meio do

método colorimétrico MTT. Doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os resultados revelaram que a estirpe conhecida como *Maytenus aquifolium* 1, mostrou uma melhor atividade citotóxica (IC_{50} 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) do que a outra célula vegetal (IC_{50} 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O mesmo extrato mostrou-se menos citotóxico do que a doxorrubicina.

O triterpeno quinonametídico pristimerina foi reconhecido como um importante representante de uma classe emergente de compostos anticâncer, exibindo efeito antiproliferativo por inibição da síntese de DNA e apoptose, quando avaliado em linhagens de células tumorais humanas e células mononucleares do sangue periférico humano (COSTA *et al.*, 2008).

A atividade anticancerígena também é descrita por Mans, Rocha e Schwartzmann (2000), que relatam efeito antiproliferativo (IC_{50} 50 $\mu\text{g/mL}$) de extratos orgânicos preparados a partir das folhas das espécies *M. dasyclada* e *M. cassineformis* contra linhagem de célula de glioma humano U-373. Porém, o mesmo não é relatado para os extratos aquosos.

4.2 ATIVIDADE GASTROPROTETORA

Uma atividade biológica amplamente demonstrada na literatura é a atividade antiulcerogênica. Um dos primeiros estudos pré-clínicos que visaram fundamentar os efeitos gástricos de espécies de *Maytenus* foi realizado por Souza-Formigoni *et al.* (1991). Os autores usaram uma infusão feita de quantidades iguais de *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* para tratar lesões de úlcera em ratos, que foram induzidas por indometacina, contenção em frio e estresse. Ranitidina e cimetidina foram utilizadas como fármacos de referência. Tanto a administração por via oral e intraperitoneal do extrato vegetal resultou num efeito significativo antiulcerogênico contra ambos os tipos de úlceras. O extrato também induziu um aumento do volume e pH de suco gástrico dos animais com os níveis de pH comparáveis aos do grupo que recebeu cimetidina.

Em estudo relacionado, extrato hidroalcoólico obtido por secagem, utilizando a técnica de jato de leite fluidizado, foi testado. Ratos Wistar foram tratados com

140, 280 e 420 mg / kg deste extrato por via intraperitoneal, após, foram imobilizados com uma tela de arame e mantidos a uma temperatura de 4 ° C durante 2 horas. Todos os três tratamentos resultaram numa redução significativa no índice de ulceração, bem como um aumento significativo do volume e pH da secreção gástrica (TABACH; OLIVEIRA, 2003). Estes resultados corroboram os resultados reportados por Bersani-Amado *et al.*, (2000). Eles estudaram o efeito antiúlcera de extrato seco obtido por pulverização de *M. aquifolium* em ratos. As úlceras foram induzidas por meio de três modelos experimentais: etanol acidificado, indometacina e estresse agudo. O extrato exibiu significativa atividade anti-úlceras, em todos os modelos utilizados. Estes resultados mostram que a preparação do extrato por meio da técnica de pulverização seca, amplamente empregada para se obter um pó seco a partir de uma fase líquida, não altera a atividade biológica de extrato aquoso de *M. aquifolium*, em doses de 250 e 500 mg / kg.

Extratos hexânico e de acetato de etila das folhas da espécie *M. ilicifolia* foram analisados em testes que avaliaram lesões gástricas causadas por estresse induzido por frio (-18 °C por 45 min), onde se observou citoproteção e cicatrização; além disso, a administração dos extratos aumentou o volume gástrico e o pH do estômago, na dose de 320 mg/kg (JORGE *et al.*, 2004).

Mais tarde, Baggio *et al.* (2007) observaram proteção gástrica em ratas, de uma fração rica em flavonoides obtida a partir de extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia*, pela inibição da secreção ácida do estômago atribuída a inibição de ATPase gástrica e modulação da formação de óxido nítrico, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, sendo comparadas com a substância química de referência omeprazol, na dose de 40 mg/kg. Também foi evidenciado que a atividade antiúlcera exercida por extratos de *M. ilicifolia* não é relacionada aos dois principais triterpenos encontrados na espécie: friedelan-3β-ol e friedelina (QUEIROGA *et al.*, 2000).

De fato, em estudo de revisão foi possível identificar 95 flavonoides, com investigação da atividade gastroprotetora que abrangem desde moléculas completamente inativas a fortemente ativas. Dos flavonoides encontrados neste estudo, 42 eram inativos, no entanto, esta inatividade poderia estar relacionada de

acordo com o modelo experimental animal, a via de administração e da dose utilizada no estudo. Por exemplo, flavonóis como canferol, robinina e dactailina não demonstraram nenhum efeito gastroprotetor em modelos experimentais de reserpina (BARNAULOV; MANICHEVA; KOMISSARENKO, 1983; BARNAULOV *et al.*, 1985a) e estresse por retenção em ratos (BARNAULOV; MANICHEVA; KOMISSARENKO, 1983), mas o canferol, nas doses de 50 e 100 mg / kg apresentou atividade gastroprotetora, e quando a dose era aumentada para 250 mg/kg, não se observou atividade (IZZO *et al.*, 1994).

Dos flavonoides considerados ativos, podemos citar a rutina (quercetina-3-ramnosilglucosídeo). Relata-se a atividade desta flavona para prevenir a ulceração da mucosa gástrica em modelos animais da reserpina (BARNAULOV; MANICHEVA; KOMISSARENKO, 1983) etanol acidificado (IZZO *et al.*, 1994) e absoluto e 50% de etanol (LA CASA *et al.*, 2000; IZZO *et al.*, 1994). O efeito citoprotetor deste flavonoide não parece ser mediado por prostaglandinas endógenas (GUERRERO; MARTIN; MARHUENDA, 1994), mas os seus efeitos protetores podem ser mediados por fatores de ativação de plaquetas endógeno (PAF) (IZZO *et al.*, 1994). Outro mecanismo possível envolve as propriedades antioxidantes da rutina, que a uma dose de 200 mg / kg tem um efeito protetor contra lesões induzidas por etanol a 50%, provavelmente através da redução dos níveis de lipoperóxidos e aumentando a atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GSH-Px) (LA CASA *et al.*, 2000).

Um dos flavonoides mais estudados é a quercetina (3,3', 4', 5,7-pentahidroxi-flavone), a qual protege a mucosa gastrintestinal de lesões agudas induzidas por vários modelos experimentais e contra diferentes agentes necróticos, incluindo estresse por contenção (IZZO *et al.*, 1994; RAO *et al.*, 2003; BARNAULOV *et al.*, 1985b) ligadura de piloro (MARTIN; MOTILVA; ALARCON DE LA LASTRA, 1993), reserpina (BARNAULOV *et al.*, 1982; BARNAULOV *et al.*, 1985b) aspirina (RAO *et al.*, 2003), indometacina (ALARCON DE LA LASTRA; MARTIN; MOTILVA, 1994), ácido-etanol (IZZO *et al.*, 1994) etanol (MARTIN *et al.*, 1998; RAO *et al.*, 2003). Possíveis mecanismos de ação envolvem efeito gastroprotetor endógeno PAF (IZZO *et al.*, 1994), um aumento na produção de muco (ALARCON DE LA

LASTRA; MARTIN; MOTILVA, 1994), propriedades anti-histamínicas, que diminuem os níveis de histamina e redução do número de células de mastócitos induzidas por etanol. Também inibe o crescimento de *Helicobacter pylori*, a formação de ácido por células parietais em resposta à estimulação pelo AMP cíclico e dibutil histamina, bem como a bomba gástrica H⁺/K⁺ ATPase (BEIL; BIRKHOLZ; SEWING, 1995).

Dentre os compostos fenólicos com expressiva atividade antiúlcera em animais, pode-se ainda citar os derivados da catequina, como a epigalocatequina galato (EGCG). A catequina foi utilizada para tratar úlceras induzidas por indometacina (18 mg/kg, v.o.) em estômagos de ratos. As administrações de indometacina induziram ulceração na porção glandular da mucosa gástrica, acompanhada por aumento da peroxidação lipídica (LPO), oxidação de proteínas e redução da síntese de tiol, mucina, expressão da ciclo-oxigenase (COX) e prostaglandina (PG) nos tecidos gástricos. A administração oral diária de EGCG (2 mg/kg) ou de omeprazol (3 mg/kg) durante 3 dias produziu efeitos benéficos semelhantes (~ 72-75%, p <0,001) sobre a ulceração gástrica aguda. O tratamento com as amostras reverteu parcialmente os efeitos adversos oxidativos da indometacina. Além disso, EGCG aumentou a expressão das isoformas da COX e PG, o que não foi visualizado para o omeprazol, sugerindo que o EGCG pode ser um excelente candidato como uma droga antiúlcera (ADHIKARY *et al.*, 2011).

Em 2008, Cipriani *et al.* investigaram a atividade antiúlcera de ácidos heteroxilanos isolados das folhas de *M. ilicifolia* e sugeriram que esta classe de polissacarídeos contribuem para a atividade da espécie. Os polissacarídeos reduziram as lesões gástricas produzidas por etanol em 65%, com ED₅₀= 40,0 mg/kg.

Em 2010, um novo estudo demonstrou que os glicosídeos mauritanina e um derivado tetraglicosilado de canferol isolados das folhas de *M. ilicifolia* causaram um aumento significativo do volume gástrico e pH em ratos, indicando que estes glicosídeos teriam papel importante no efeito gastroprotetor das folhas da espécie (LEITE *et al.*, 2010).

Ensaio clínico também foram realizados com a espécie *M. ilicifolia*. Geocze *et al.*, (1988) avaliaram a atividade antiúlcera em 23 pacientes com diagnóstico de dispepsia alta ulcerativa. Treze dos pacientes receberam cápsulas de 200 mg de um extrato liofilizado do infuso das folhas de *M. ilicifolia*, uma vez ao dia. Os outros 10 pacientes receberam cápsulas com placebo. O grupo que recebeu a cápsula com o extrato da planta evidenciou melhoras clínicas em relação ao grupo placebo, sem relatos de efeitos adversos ou colaterais. Quando o mesmo esquema foi realizado em 20 pacientes com úlcera péptica em uma prova duplo-cego, os resultados frente ao grupo placebo não foram considerados significativos, talvez devido ao escasso número de participantes (CARLINI; FROCHTEN, 1988).

Andrade *et al.* (2007) investigaram o efeito anticulcerogênico de *M. robusta* em diferentes modelos experimentais (indução da úlcera por etanol, por medicamento anti-inflamatório não-esteróide, por estresse e determinação da secreção gástrica) e observaram atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas, nas doses de 50, 250 e 500 mg/kg, em comparação com as substâncias químicas de referência omeprazol e cimetidina. Extrato metanólico das folhas de *M. aquifolium* mostrou atividade antiulcerogênica em ratos que tiveram indução da formação de úlcera pelo etanol e indometacina, na dose de 100 mg/kg/v.o., em comparação com omeprazol (20 mg/kg) e cimetidina (100 mg/kg) (GONZALEZ *et al.*, 2001).

Frações hexânica, de acetato de etila e aquosa das folhas de *M. robusta* e o triterpeno 3,15-dióxido α -hidróxi friedelano isolado da fração acetato de etila, foram avaliados contra lesões gástricas em ratos causadas pelo etanol. O tratamento com todas as frações (150 mg/kg), com o triterpeno (30 mg/kg) e omeprazol (30 mg/kg) reduziram significativamente o índice de lesões, a área total das lesões e a porcentagem das lesões quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (ANDRADE *et al.*, 2008).

4.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Estudos de atividade anti-inflamatória para espécies de *Maytenus* também são relatados. Como parte de uma investigação sobre as atividades biológicas dos produtos naturais provenientes de plantas da família Celastraceae, Reyes *et al.* (2006) isolaram 19 triterpenos do tipo lupano da casca da raiz de *M. cuzcoina* e das folhas de *M. chiapensis*. Os triterpenos foram testados quanto a atividade inibitória sobre a produção de óxido nítrico (NO; medido como nitrito) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em macrófagos de ratos. Os resultados sugeriram que vários dos triterpenos inibiram significativamente, tanto a geração de NO, quanto de PGE₂. Os compostos mais eficazes, em ordem de potência, foram 3-Epicalenduladiol, 11 α -Hidroxi-glochidona, rigidinol, betulina, epibetulina, ácido epibetulínico e ácido betulínico. Além disso, lupeol, 3-betulina cafeato e glochidiol, preferencialmente, inibiram a geração de PGE₂.

Avaliação antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos hexano e acetato de etila de folhas de *M. ilicifolia* foram realizados. Administraram-se doses de 80, 160, 320 e 640 mg / kg de extrato de acetato de etila, utilizando-se o modelo de edema da pata induzida por formaldeído em camundongos *Swiss*. Os resultados revelaram que não houve diferença significativa na atividade. No modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*, os mesmos foram previamente tratados com extratos hexano e acetato de etila, a 320 mg / kg, e resultaram em diminuição do edema de forma significativa e semelhante ao da indometacina (20 mg/kg) (JORGE *et al.*, 2004).

Silva *et al.* (2010) testaram extratos etanólicos das folhas, caules e raízes de *M. heterophylla* e folhas e caules de *M. senegalensis* na atividade anti-inflamatória *in vivo* em ratos *Wistar* albinos, pelo método de edema de pata induzido pela carragenina. Os resultados demonstraram um significativo efeito antiedematogênico das folhas de ambas as espécies na inflamação local aguda e ainda, sugeriram ausência de sinais de toxicidade aguda e subaguda dos mesmos extratos.

Extratos obtidos por decocção das folhas da espécie *M. truncata* exibiram considerável atividade antinociceptiva e antiedematogênica no teste de edema de

pata induzido por formaldeído, mostrando que a dose de 120 mg/kg do decocto apresentou melhor efeito antinociceptivo que as demais doses estudadas (FONSECA *et al.*, 2007).

Outro estudo demonstrou que o triterpeno 3,15-dioxi-21- α -hidroxifriedelano isolado do extrato metanólico das folhas de *M. robusta* exibiu potente efeito dose-dependente com ID₅₀ de 12,5 \pm 2,1 μ mol/kg e inibição máxima de 85,9% no modelo de contorções em ratos (NIERO *et al.*, 2006).

Extratos das raízes de *M. senegalensis* foram investigados pelas propriedades anti-inflamatórias tópicas através da inibição do edema em pata de ratos induzido por óleo de algodão. A maior atividade foi detectada no extrato clorofórmico, o qual reduziu a resposta edematosa com potência similar ao fármaco de referência indometacina (ID₅₀ = 84 and 93 μ g/mL, respectivamente). Neste mesmo estudo, o ácido maitenoico exibiu efeito antiflogístico dose-dependente (ID₅₀ = 0,11 μ mol/mL) duas vezes maior que o da indometacina (ID₅₀ = 0,26 μ mol/mL) e três vezes menor que o da hidrocortisona (ID₅₀ = 0,04 μ mol/mL) (SOSA *et al.*, 2007).

Extratos de folhas de *M. heterophylla* e *M. senegalensis* exibiram atividade anti-inflamatória significativa (120 mg/kg), reduzindo o edema em pata de ratos induzido por carragenina em 51% e 35%, respectivamente. Extrato de *M. heterophylla* a 1200 mg/kg revelou-se não-tóxico, enquanto que a mesma dose de extrato de *M. senegalensis* indicou alguma toxicidade (DA SILVA *et al.*, 2011).

Recentemente, a atividade antinociceptiva de extrato etanólico e fração acetato de etila de *Maytenus rigida* Mart., bem como de (-)-4'-metilepigalocatequina (MEGC), foi demonstrada *in vivo*. Os resultados demonstraram ED₅₀ para MEGC no teste de contorção de 14,14 mg/kg. A contorção induzida por ácido acético, foi inibida por 98,4,84,4 e 58,3%, respectivamente, quando os ratos foram tratados com o extrato etanólico, fração acetato de etila, e MEGC. No teste da placa quente, ratos pré-tratados com MEGC mostraram aumentos significativos dos tempos de reação (60-89%). A administração oral de MEGC inibiu de forma significativa a primeira e segunda fases da dor induzida por formalina (50 e 26,5%, respectivamente), enquanto a indometacina inibiu apenas a segunda fase do ensaio (41,2%). Extrato

etanólico e fração acetato de etila apresentaram efeitos sobre a dor inflamatória, enquanto a supressão da dor neurogênica e inflamatória de MEGC sugere uma forte indicação da presença de efeitos central e periférico e seu potencial analgésico e anti-inflamatório (MARTINS et al., 2012).

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Extratos de espécies do gênero *Maytenus* demonstraram atividade antioxidante em diferentes ensaios, *in vitro* e *in vivo*. O extrato etanólico de *M. ilicifolia* foi testado em ensaio antioxidante com o radical ABTS^{•+} - 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) e pela capacidade seqüestrante de HOCl. Trolox e ácido úrico foram utilizados como controle positivo. Os resultados indicaram que os extratos da casca da raiz de *M. ilicifolia* atuaram como uma grande fonte de antioxidantes baseado no seu potencial sequestrador de radicais (VELLOSA et al., 2006). Em outro ensaio, ainda com *M. ilicifolia*, Melo et al. (2001) demonstraram o efeito protetor do extrato aquoso contra os efeitos nocivos do SnCl₂ na sobrevivência de *Escherichia coli* submetida a este agente agressor. Os autores não citam o órgão vegetal utilizado no teste.

A atividade antioxidante do extrato bruto e semipurificado das folhas de *M. ilicifolia*, e compostos derivados destes, a saber, epicatequina, epigalocatequina, catequina, epicatequina (4β-8)-catequina, epicatequina (4β-8)-epicatequina), foram também avaliados quanto ao seu potencial antioxidante utilizando o radical DPPH e ensaios com o complexo fosfomolibdênio. Ambos os métodos revelaram que a fração acetato de etila possui capacidade antioxidante significativamente melhor quando comparada com a vitamina C e trolox. O número de hidroxilas nos compostos normalmente dá uma indicação do quão potente é o efeito antioxidante, e a estereoquímica também influencia a atividade antioxidante: compostos com 2R, 3R exibem uma maior atividade do que aqueles com 2R, 3S. Os dados também mostram que as substâncias com um grupo pirogalol, que é trihidroxilado no anel B, induzem a atividade significativamente mais do que aqueles com um grupo catecol (dihidroxilado) (PESSUTO et al., 2009).

As espécies *M. aquifolium* e *M. guyanensis* também foram avaliadas por sua capacidade sequestradora de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. O extrato etanólico da casca da raiz de *M. aquifolium* demonstrou eficiência contra os radicais DPPH (inibição = $35,5 \pm 1,3\%$), ABTS^{•+} (IC₅₀ = $0,0036 \pm 0,0003$ mg/mL), HOCl (IC₅₀ = $0,002 \pm 0,0001$ mg/mL), O₂^{•-} (inibição = $36,0 \pm 2,1\%$), e NO[•] (inibição = $18,3 \pm 0,4\%$) (VELLOSA *et al.*, 2007).

Extratos obtidos com diversos solventes e métodos extrativos foram testados para a espécie *M. guyanensis* contra o radical DPPH. Os resultados demonstraram uma maior atividade antioxidante das frações de baixa e média polaridade. A extração a quente também forneceu extratos etanólicos que apresentaram maior atividade antioxidante (comparado ao flavonoide rutina em métodos semi-quantitativos baseados em DPPH) quando comparado com extrato etanólico obtido por maceração a temperatura ambiente (MACARI; PORTELA; POHLIT, 2006).

Outra espécie estudada pelo seu potencial antioxidante foi *M. krukovii*. Extrato hidroalcoólico da casca foi usado no teste DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), teste do β-caroteno, capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), doseamento e ensaio de fotoquimiluminescência (PCL). O extrato proporcionou capacidade antioxidante comparável aos compostos de referência, incluindo o ácido gálico, catequina, hidroxianisol butilado (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT) (BRUNI *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado por Corsino *et al.* (2003), de um ensaio de CCD autográfico utilizando extrato acetato de etila das folhas e casca da raiz de *M. aquifolium* levou ao isolamento de compostos com propriedades antioxidantes. Estes foram epigalocatequina, procianidina B₁, canferol 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1 → 6)-O-[β-D-glucopiranosil (1 → 3)-O-α-L-ramnopiranosil-(1 → 2)-O-D-glucopiranosil e quercetina 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1 → 6)-O-[β-D-glucopiranosil (1 → 3)-O-L-ramnopiranosil-(1 → 2)]-O-β-D-glucopiranosil.

O extrato etanólico da casca de *Maytenus guyanensis* Klotzch exibiu IC₅₀ de $8,2 \pm 0,2$, $28,4 \pm 0,7$, $35,6 \pm 3,0$ e $517 \pm 70,8$ ng/mL nos ensaios de DPPH, ABTS, superóxido e de oxigênio singleto, respectivamente. O teor de fenóis totais

encontrado foi de $58,7 \pm 1,7$ mEq de ácido gálico (mg/g de extrato seco) (LIMA; VARGAS; POHLIT, 2011).

CAPÍTULO 2

**ANÁLISE QUÍMICA QUALITATIVA E ATIVIDADE ANTIQUIMIOTÁXICA
DE *M. cassineformis* e *M. dasyclada***

RESUMO

As páginas de numeração 71 a 107 foram excluídas, pois são resultados que serão submetidos à publicação. Este capítulo de análise química qualitativa e atividade anti-inflamatória demonstra os métodos utilizados para a extração das folhas das espécies *M. dasyclada* e *M. cassineformis*, a caracterização química dos extratos por análises cromatográficas (CLAE-UV e CLAE-UV-IES-MS) e a atividade anti-inflamatória dos extratos através do ensaio de quimiotaxia leucocitária. As análises químicas revelaram a presença dos flavonoides quercetina e canferol nos extratos acetato de etila e etanólico das espécies, bem como a presença de derivados da galocatequina e derivados 3-7-O-diglicosilados de canferol e 3-O-triglicosilado de quercetina. Os extratos das duas espécies demonstraram ainda um efeito inibidor importante da migração de leucócitos, obtendo valores de IC₅₀ de 0,2594 µg/mL, 0,6114 µg/mL e 0,7560 µg/mL, para os extratos etanólico, acetato de etila e hexânico de *M. dasyclada*, respectivamente. Para *M. cassineformis* os valores de IC₅₀ foram de 0,3182 µg/mL, 0,3751 µg/mL e 0,2916 µg/mL, para os extratos etanólicos, acetato de etila e hexânico, respectivamente.

CAPÍTULO 3

**Artigo: GASTROPROTECTIVE MECHANISMS OF *M. dasyclada* MART.
(CELASTRACEAE): INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE AND
SULPHYDRYL COMPOUNDS**

RESUMO

As páginas de numeração 113 a 147 foram excluídas pois serão submetidas à publicação. Este capítulo relata a investigação da atividade antiulcerogênica dos diferentes extratos obtidos das folhas de *M. dasyclada*. Os ensaios foram realizados utilizando os modelos de úlcera induzida por etanol, e por anti-inflamatório não esteroide (AINE). Parâmetros de secreção gástrica (volume, pH e acidez total) foram também avaliados pelo modelo de ligadura de piloro, e o muco no conteúdo gástrico foi determinado. E, com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação, os ensaios de L-NAME e NEM foram realizados. No modelo de úlcera induzida por etanol, observou-se que o tratamento com extratos de *M. dasyclada* reduziu significativamente o índice de lesão de $28,2 \pm 7,2$, $37,6 \pm 3$ e de $41,9 \pm 4,6$ para os grupos tratados com 250 mg / kg de extrato etanólico e extrato de acetato de etila de *M. dasyclada*, e com o controle positivo (omeprazol 30 mg / kg), respectivamente. Inibição significativa no índice de lesão também foi observado no modelo de úlcera induzida por anti-inflamatório não esteroide, com decréscimos de $38,9 \pm 5,1$, $67,4 \pm 2,0$, $22,1 \pm 3,9$ e $78,9 \pm 1,1$ para os grupos tratados com 125 e 250 mg/kg de extrato etanólico, 250 mg/kg de extrato acetato de etila e o controle positivo (cimetidina 100 mg/kg), respectivamente. Os parâmetros de secreção gástrica (pH, volume, [H⁺]) mostraram alterações em diferentes doses dos tratamentos. Na investigação do mecanismo de ação dos extratos de *M. dasyclada*, observou-se que a administração prévia de L-NAME e NEM aos animais antes do tratamento com os extratos etanólicos e acetato de etila (250 mg / kg) ocasionaram a perda da atividade gastroprotetora. Os resultados evidenciaram que os extratos etanólicos e acetato de etila das folhas de *M. dasyclada* demonstraram atividade antiúlcera, pela significativa diminuição na formação da úlcera induzida pelos diferentes modelos. Esta atividade parece estar relacionada com a diminuição da secreção e produção de muco. Também, parece ser dependente da produção de óxido nítrico e de glutatona. Este trabalho sugere que a espécie investigada, do gênero *Maytenus* pode ser uma

alternativa para o desenvolvimento de novos fitoterápicos para o tratamento da úlcera.

CAPÍTULO 4

**Artigo: ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF *Maytenus dasyclada* MART. AND
Maytenus cassineformis REISS. (CELASTRACEAE)**

RESUMO

As páginas de numeração 151 a 175 foram excluídas, pois são resultados que serão submetidos à publicação. Este capítulo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico das folhas das espécies *M. dasyclada* e *M. cassineformis*, bem como quantificar o conteúdo de polifenóis e flavonoides totais. Os extratos acetato de etila de ambas as espécies apresentaram maior quantidade de polifenóis totais ($53,58 \pm 0,43$ e $43,65 \pm 0,80$ mg/g equivalentes em ácido gálico) e maior teor de flavonoides ($3,72 \pm 0,27$ e $3,19 \pm 0,32$ mg/g equivalentes em quercetina), para *M. cassineformis* e *M. dasyclada*, respectivamente. A quercetina e o canferol foram identificados nos extratos acetato de etila e etanólico, de ambas as espécies. Os extratos acetato de etila e etanólico de *M. cassineformis* e *M. dasyclada* mostraram atividade antioxidante no modelo de capacidade antioxidante equivalente a Trolox, e na inibição da formação de radicais hidroxila. Extratos de *M. cassineformis* foram mais eficazes na inibição da peroxidação de lípidos, na oxidação de proteínas, e na proteção dos danos celulares. A atividade antioxidante foi relacionada com o potencial protetor genotóxico dos extratos. Os resultados obtidos mostraram que as frações de *M. cassineformis* e *M. dasyclada* demonstraram atividade antioxidante relacionada com a presença de compostos polifenólicos.

DISCUSSÃO GERAL

A degradação de espécies componentes das floras do mundo inteiro vem causando desequilíbrios e extinção de muitos seres vivos. Além disso, a ação antrópica sobre os ecossistemas como na utilização de plantas com fins medicinais, contribui imensamente para esta degradação. Este fato, associado à importância medicinal e econômica da espinheira-santa levou esta à lista de espécies ameaçadas de extinção. *Maytenus ilicifolia* atualmente encontra-se na lista da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) como uma das espécies prioritárias para estudo e conservação na América do Sul.

As atividades antimutagênica e antitumoral, principalmente dos triterpenos e alcaloides piridínicos sesquiterpênicos isolados do gênero, e as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiulcerogênica, associadas ao seu conteúdo fenólico ou ao sinergismo dos metabólitos presentes na espécie, são as mais descritas para as espécies do gênero *Maytenus*.

A espécie *M. ilicifolia* certamente tem destaque, e como citado na revisão do tema, possui atualmente quatorze produtos fitoterápicos classificados como antiulcerosos, com registro validado pela ANVISA. A monografia da espécie foi incluída na Farmacopeia Brasileira em 2003, na quarta edição, sexto fascículo; e em 2010, na publicação da quinta edição. Popularmente suas folhas são largamente utilizadas para o tratamento de úlceras gástricas, dispepsias e outros problemas gástricos.

Assim, observando as evidências biológicas e utilização desta espécie, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos visando à análise fitoquímica e biológica de outras espécies do gênero *Maytenus*. A partir da revisão do tema, foi possível verificar a publicação de muitos trabalhos com espécies do gênero somente nos anos de 2011 e 2012. Neste sentido o presente trabalho teve como objetivos avaliar as características químicas e alguns aspectos biológicos de duas espécies de ocorrência no Rio Grande do Sul, *Maytenus cassineformis* e *Maytenus dasyclada*, muito pouco estudadas até então.

Para o sucesso de pesquisas farmacológicas com plantas são necessários alguns critérios de investigação. A escolha baseada em conhecimentos quimiotaxonômicos é uma alternativa que apresenta grandes possibilidades de descoberta de novos fitomedicamentos. As evidências quimiotaxonômicas quase sempre comprovam atividades farmacológicas descritas para o grupo. Verifica-se esta constatação com o próprio gênero *Maytenus*, que possui atividades antiulcerogênica, anti-inflamatória e antitumorais comprovadas em testes *in vitro* ou *in vivo* para, no mínimo, sete espécies diferentes, como referenciado ao longo do trabalho.

Como já bastante discutido durante o desenvolvimento deste trabalho, a fitoquímica das espécies de *Maytenus* é marcada pela ocorrência de compostos fenólicos predominantemente os heterosídeos da quercetina e canferol (NAKAMURA *et al.*, 1997; LEITE *et al.*, 2001; LEITE, 2002) e catequinas, como a epicatequina, etilepigalocatequina e 4'-O-metil-ent-galocatequina (SOARES *et al.*, 2004), bem como triterpenos, como a maitenina, maitefolinas A e B (BUFFA FILHO *et al.*, 2002), friedelina, friedelan-3-ol, lupeol, betulina (CORDEIRO *et al.*, 1999; MOSSI *et al.*, 2004).

No intuito de analisar e comparar os compostos fitoquímicos presentes nestas duas espécies, realizou-se a análise cromatográfica por CLAE-DAD e CLAE-DAD-IES-MS dos extratos hexânico, acetato de etila e etanólico obtidos das folhas das duas espécies em estudo. O objetivo com o fracionamento dos extratos era o de pesquisar a presença dos compostos triterpênicos (apolares) no extrato hexânico, de compostos fenólicos na forma livre ou agliconas (pouco polares) no extrato acetato de etila, e por fim, extrair agliconas polihidroxiladas ou ainda compostos heterosídicos no extrato etanólico.

Os resultados evidenciaram a presença majoritária de compostos fenólicos nos extratos acetato de etila e etanólico de ambas as espécies, identificando os flavonoides quercetina e canferol, e muitos compostos com perfis de absorvância no UV indicativos de derivados catequínicos e flavonoídicos. No entanto, com as técnicas cromatográficas utilizadas neste estudo, não foi possível verificar a

presença dos triterpenos característicos do gênero no extrato hexânico, fato que poderia ser alcançado com uso de Cromatografia Gasosa.

Ainda, em análise de extrato aquoso obtido por decocção do pó das folhas das duas espécies, pôde-se visualizar a presença da epicatequina nos extratos. A Farmacopéia Brasileira quinta edição descreve a técnica de doseamento de epicatequina em extratos aquosos de *M. ilicifolia* utilizando CLAE-UV (BRASIL, 2010).

Na tentativa de caracterizar e diferenciar os extratos pesquisados utilizou-se técnicas clássicas de doseamento por espectrofotometria no UV para mensurar a quantidade de polifenóis e flavonoides totais presentes nos mesmos. Para quantificar compostos fenólicos totais utilizou-se a complexação dos extratos com o Reagente de Folin-Ciocalteu, conforme técnica previamente descrita (BONOLI *et al.*, 2004). O reagente de Folin Ciocalteu trata-se de uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. A absorvância é medida a 750 nm e os resultados são expressos em mg de de ácido gálico equivalentes por g de extrato.

Para quantificar flavonoides totais, utilizou-se técnica descrita na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), com o uso de solução de cloreto de alumínio a 2 % (p/v) para complexar os flavonoides, com prévia hidrólise ácida. A hidrólise ácida deste método, considerando os compostos flavonoídicos O-glicosilados é responsável pelo rompimento da ligação C3 – O – glicosídeo das estruturas citadas, possibilitando a formação de hidroxilas fenólicas que são importantes no processo de complexação com o agente complexante de escolha, cloreto de alumínio. A solução restante da complexação é lida em espectrofotômetro a 420 nm e a quantidade de flavonoides totais é dada em mg de quercetina equivalente por g de extrato.

Os resultados demonstraram maior teor de polifenóis e flavonoides totais nos extratos acetato de etila de ambas as espécies, seguido pelos extratos etanólicos. Os extratos hexânicos demonstraram a menor quantidade de polifenóis e flavonoides totais. Isso corrobora as análises cromatográficas, que evidenciaram a

predominância de compostos fenólicos nos extratos acetato de etila e etanólicos, e claro, evidencia a afinidade destes compostos por estes solventes. Os valores encontrados no presente trabalho para as espécies *M. cassineformis* e *M. dasyclada* assemelham-se a dados literários para o teor de polifenóis e flavonoides totais da espécie *M. ilicifolia* (YARIWAKE et al., 2005).

Os flavonoides são o grupo de metabólitos secundários mais abundantes e mais amplamente estudados do reino vegetal com efeitos potencialmente benéficos na saúde humana. Uma ampla variedade de atividades farmacológicas têm sido relatados para estas substâncias, incluindo antiviral, anti-alérgica, anti-plaquetária, anti-estrogênica, antitumoral, anti-inflamatória, propriedades antiproliferativas, antiangiogênicas e antioxidante, e sua ingestão normalmente não produz ou produz pouca toxicidade (CHEONG *et al.*, 1998. Flavonoides são também relacionados por atuar no trato gastrointestinal, tendo propriedades antiespasmódica (LIMA et al., 2005), anti-secretória, antidiarréica (DI CARLO et al., 1993) e antiúlcera (LA CASA et al., 2000).

Para verificar a eficácia das espécies em estudo, ensaio anti-inflamatório *in vitro*, gastroprotetor *in vivo* e antioxidante *in vitro* foram realizados. A escolha entre testes farmacológicos *in vitro* ou *in vivo* depende de inúmeros fatores, sendo o principal critério o domínio do modelo experimental pelo investigador e, naturalmente, do alvo a ser atingido. No entanto, é importante ter em mente que os efeitos observados nos testes realizados *in vitro* com certa frequência, não são observados nos estudos realizados *in vivo*, devido a influências farmacocinéticas. Os testes *in vivo* podem confirmar o uso popular das plantas quando o modelo experimental é confiável e ainda podem fornecer informações preliminares a respeito dos efeitos tóxicos das plantas (CALIXTO, 2001).

A avaliação do potencial anti-inflamatório dos extratos de *M. cassineformis* e *M. dasyclada* foi realizada utilizando a técnica de Boyden (1962) modificada por Suyenaga et al., (2010). Nesta técnica pode-se avaliar uma etapa muito importante do processo inflamatório: a quimiotaxia. A principal vantagem do método é a

possibilidade de testar muitos extratos ou compostos, em várias concentrações diferentes, ao mesmo tempo, o que seria muito difícil utilizando modelos animais.

A inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phogos*, que significa pegar fogo) consiste em uma reação dos tecidos vascularizados diante de um agente agressor, endógeno ou exógeno, caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. A reação inflamatória é caracterizada por rubor, calor, dor, tumor e perda da função. Embora constitua um mecanismo de defesa importante diante de inúmeras agressões, a reação inflamatória pode causar danos significativos ao organismo, prolongando a inflamação e induzindo a lesão tecidual, em resposta à liberação de enzimas, mediadores químicos e de radicais tóxicos de oxigênio (PEREIRA; BOGLIOLO, 1998; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

No decorrer de um processo inflamatório, os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular estimulados por mediadores da inflamação liberados na área de lesão, passando a ocupar uma posição mais periférica. Em seguida, tornam-se transitoriamente aderidos ao endotélio e atravessam o endotélio do vaso. Após diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia, com o objetivo maior de eliminar o agente causal e restabelecer o tecido lesado (DEKKER; SEGAL, 2000).

Os resultados evidenciaram um efeito inibidor da migração de leucócitos importante, obtendo valores de IC₅₀ de 0,2594 µg/mL, 0,6114 µg/mL e 0,7560 µg/mL, para os extratos etanólico, acetato de etila e hexânico de *M. dasyclada*, respectivamente. Para *M. cassineformis* os valores de IC₅₀ foram de 0,3182 µg/mL, 0,3751 µg/mL e 0,2916 µg/mL, para os extratos etanólicos, acetato de etila e hexânico, respectivamente. Esta atividade encontrada, no entanto, não pode ser relacionada ao conteúdo de quercetina e canferol presente nos extratos acetato de etila e etanólico, visto que isoladamente, estes flavonoides não demonstraram a inibição da migração dos leucócitos, apesar de apresentar atividade anti-inflamatória no modelo de edema em pata de rato, *in vivo*. Além disso, os extratos hexânicos das espécies também evidenciaram a inibição da quimiotaxia, podendo-se inferir, logo, que esta atividade observada *in vitro*, deva estar relacionada com o efeito sinérgico

dos metabólitos secundários presentes nas espécies. O efeito sinérgico entre metabólitos secundários é citado na literatura para explicar atividades biológicas de extratos de *Maytenus* (QUEIROGA *et al.*, 2000).

Apesar de avanços recentes na nossa compreensão da patogênese multifatorial úlceras pépticas, a secreção de ácido gástrico é ainda reconhecida como um elemento central desta doença, portanto, o principal objetivo terapêutico é o controle da secreção desta com o uso de antiácidos, bloqueadores do receptor histaminérgico como a ranitidina, famotidina, anticolinérgicos como pirenzepina, telezipina ou bloqueadores da bomba de prótons como o omeprazol e lansoprazol. No entanto, a terapia de úlcera gástrica enfrenta hoje em dia uma grande desvantagem, porque a maioria dos medicamentos disponíveis atualmente no mercado apresentam eficácia limitada e estão frequentemente associados a efeitos secundários graves (MOTA *et al.*, 2009).

Assim, o desenvolvimento de agentes antiúlcera está focado na busca de agentes mais baratos, mais eficazes e menos tóxicos. Produtos a base de plantas medicinais estão entre as fontes mais atraentes de novos medicamentos. A integridade da mucosa gástrica depende do equilíbrio entre os fatores agressivos (HCl, pepsina) e protetores (muco e secreção de HCO_3 , prostaglandinas, o fluxo sanguíneo da mucosa, óxido nítrico) (LAM *et al.*, 2007). Portanto, se o tratamento é eficaz depende não apenas no bloqueio da secreção de ácido, mas também no aumento da produção de fatores responsáveis por proteger a mucosa gástrica, evitando assim danos ao epitélio (MORAES *et al.*, 2009).

Verificando os estudos de atividade gastroprotetora de várias plantas, observa-se que esta atividade pode estar relacionada a um efeito sinérgico do conteúdo de fenólicos e de triterpenos, justificando a ação já relatada para as espécies *M. ilicifolia*, *M. robusta* e *M. aquifolium*. O estudo desta atividade com os triterpenos isolados friedelina e friedelan-3-ol não reduziu as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos. No entanto, a administração de extratos totais ou parciais destas espécies demonstra atividade gastroprotetora, o que explica que

provavelmente exista um efeito sinérgico entre todos os componentes (QUEIROGA *et al.*, 2000).

Desta forma avaliaram-se as duas espécies quanto à possível atividade gastroprotetora. O efeito foi inicialmente investigado pelos modelos de indução de úlceras agudas por etanol, que é um agente necrosante, e por AINE, que inibe a proteção normal do estômago (diminuindo a síntese de prostaglandinas constitutivas). O etanol é considerado um dos agentes que induzem mais intensamente úlceras gástricas, pois promove graves perturbações na mucosa do estômago (MORAES *et al.*, 2009). O etanol age por exercer um efeito tóxico direto sobre o epitélio, levando à formação de lesões necróticas características devido a uma redução na produção do muco e secreção de bicarbonato (MASSIGNANI *et al.*, 2009).

Os extratos etanólico e acetato de etila na dose de 250 mg/kg da espécie *M. dasyclada*, diminuíram de forma significativa o número de lesões e a porcentagem de área lesada em ratos, demonstrando um efeito gastroprotetor, que possivelmente, está associado a um aumento da citoproteção favorecendo os processos antioxidantes. O teste aplicado ao extrato etanólico da espécie *M. cassineformis* não demonstrou decréscimo significativo no número de lesões e na porcentagem de área lesada. Sugerem-se novos estudos com os extratos desta planta para elucidar melhor esta observação prévia.

A atividade antiulcerogênica dos extratos de *M. dasyclada* foi também avaliada no modelo de úlcera induzida por AINE (indometacina). Os anti-inflamatórios não esteroides apresentam como efeito adverso a ulceração da mucosa gástrica, resultado principalmente da diminuição da síntese de prostaglandinas, devido à inibição da enzima ciclo-oxigenase 1. As prostaglandinas são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato na mucosa gástrica. Sua diminuição acarreta em perda da citoproteção e redução do fluxo sanguíneo local (CRYER, 2000).

O contato direto de AINE com a mucosa gástrica ataca os fosfolipídios presentes tanto no muco quanto no epitélio gástrico, o que reduz a hidrofobicidade

do muco e causa retrodifusão de íons hidrogênio. A redução do nível de prostaglandinas na mucosa gástrica, ao mesmo tempo em que diminui a inflamação, ocasiona a diminuição da proteção natural do estômago (BJORKMAN, 1996; BERSTAD, BERSTAD , BERSTAD, 2002).

Neste modelo, as doses de 125 e 250 mg/mL do extrato etanólico, e de 250 mg/mL do extrato acetato de etila apresentaram atividade gastroprotetora significativa. Isto indica que os extratos apresentam efeitos sinérgicos, sendo que os componentes presentes são capazes de promover um efeito protetor sobre a mucosa, podendo estar relacionado com o aumento de síntese de prostaglandinas.

Depois destes experimentos prévios em que ficou demonstrado que os extratos de *M. dasyclada* são capazes de proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas por etanol e AINEs, os estudos continuaram no intuito de elucidar se os extratos interfeririam de alguma maneira sobre a secreção ácida gástrica, já que o efeito de redução da secreção ácida no estômago é o mecanismo de ação da maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento de processos ulcerativos.

A via de administração no modelo de ligadura de piloro é a via intraduodenal, que permite investigar as ações do extrato por via sistêmica, excluindo as interações do contato direto com a mucosa gástrica. Os extratos etanólico e acetato de etila de *M. dasyclada* na dose de 250 mg/mL causaram alterações no pH, no volume gástrico e na concentração de íons hidrogênio, sugerindo que os compostos presentes no extrato possam estar atuando sobre a secreção ácida gástrica.

Após a verificação da redução na secreção ácida, a produção de muco foi investigada. Sabe-se que um desequilíbrio entre os fatores protetores e fatores agressivos causam lesões gástricas. Quando a barreira de muco é danificada, o epitélio gástrico se torna mais sensível ao ácido produzido pelo estômago e, por conseguinte, pode resultar na formação de úlceras gástricas (MOJZIS, HEGEDUSOVA, MIROSSAY, 2000; WALLACE et al., 2000; NAM et al., 2005; WALLACE, 2007).

A proteção criada pelo muco ligado ao tecido pode ser observada devido à formação de mucopolissacarídeos solúveis. Estes mucopolissacarídeos são quantificados de acordo com sua ligação ao Alcian Blue, um corante específico para mucinas ácidas (LAPA *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos neste modelo demonstraram que além de diminuir a secreção ácida gástrica, os componentes presentes nos extratos etanólico e acetato de etila estimulam a produção de muco gástrico, ou seja, favorecem o aparecimento dos fatores defensivos da mucosa, que podem estar relacionados com o aumento do potencial antioxidante do muco (HAMAISHI, KOJIMA, ITO, 2006).

Visto que os extratos etanólicos e acetato de etila de *M. dasyclada* demonstraram ação gastroprotetora, provavelmente por atuar aumentando os mecanismos antioxidantes, deste modo, testes na tentativa de elucidação do mecanismo de ação (L-NAME e NEM) foram realizados. O óxido nítrico (NO) tem um importante papel na modulação da defesa da mucosa gástrica, como: regulador na secreção de muco, vasodilatador produzindo aumento de fluxo sanguíneo local, inibidor da agregação de neutrófilo e auxiliando no processo de cicatrização da úlcera gástrica (LAPA *et al.*, 2008). Neste experimento a gastroproteção dos extratos de *M. dasyclada* é revertida com o pré-tratamento com L-NAME, estes resultados sugerem que a atividade destes seja dependente de NO (LAPA *et al.*, 2008).

Os grupamentos sulfidrílicos são compostos que contribuem para a integridade da mucosa, com a finalidade básica de reduzir a formação de radicais livres derivados de oxigênio relacionando-se com proteção celular. São elementos gastroprotetores capazes de manter o fluxo sanguíneo possibilitando a redução da lesão tecidual (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2006; LAPA *et al.*, 2008).

A redução dos níveis normais de grupos sulfidrílicos torna a mucosa gástrica susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa. N-etilmaleimida (NEM), é uma substância capaz de quelar as pontes de dissulfeto que são responsáveis pela conformação da barreira mucosa, promovido pelos compostos sulfidrílicos (LAPA *et al.*, 2008).

O NEM, ao diminuir a concentração de SH na mucosa, potencializa os danos gástricos induzidos pelo etanol, danos estes associados à diminuição significativa nos níveis de grupos sulfidrílicos, especialmente glutathiona reduzida (GSH), em animais de experimentação e no homem. Essa redução pode ser devida à oxidação da glutathiona, após a geração de metabólitos tóxicos, ou devido à ligação da glutathiona ao acetaldeído gerado através da oxidação de agentes necrotizantes pela atividade gástrica da enzima álcool desidrogenase (DEVI *et al.*, 2007; LAPA *et al.*, 2008).

Em parte, os metabólitos presentes nos extratos etanólico e acetato de etila de *M. dasyclada* exercem atividade semelhante aos fármacos utilizados na clínica (cimetidina e omeprazol), interferindo na secreção de ácido. Em parte, atuam interferindo nos mecanismos citoprotetores, aumentando a secreção de muco (mecanismo de ação da carbenoxolona). Estes resultados podem ser relacionados com a presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonoídicos presentes nos extratos, e a capacidade antioxidante dos mesmos, já que os extratos hexânicos não demonstraram ação gastroprotetora significativa.

Para a avaliação da ação antioxidante, diversos são os métodos relatados. Entre eles encontram-se o ensaio de peroxidação lipídica, método colorimétrico e fotométricos utilizando β -caroteno, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) e hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), além da avaliação de atividade dos radicais hidroxil, peroxil, capacidade antioxidante equivalente a TROLOX (TEAC), potencial antioxidante total (TRAP), entre outros (LEE *et al.*, 2003; DAWIDOVICZ *et al.*, 2006). No entanto, todas as metodologias têm um objetivo em comum: testar a habilidade de um componente ou mistura de componentes em reduzir os agentes pró-oxidantes, ou radicais livres.

Uma quantidade substancial de evidências indica o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais.

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células.

A atividade antioxidante dos extratos acetato de etila e etanólico das duas espécies foi demonstrada nos testes de atividade antioxidante total (TRAP), em que houve inibição significativa da quimioluminescência formada pelo luminol; inibição da formação de radicais hidroxil, peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas. Estes resultados mais uma vez corroboram os resultados encontrados na análise química das espécies, onde se evidenciou maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides totais nos extratos produzidos com estes solventes.

Observa-se que nenhum dos extratos foi eficaz em prevenir a formação de radicais de óxido nítrico *in vitro*, no entanto, diminuíram a produção deste radical no ensaio *in vivo* (L-NAME). Salienta-se novamente, que muitas vezes efeitos *in vitro* não são verificados *in vivo*, já que não podemos prever os fatores farmacocinéticos inerentes à utilização dos compostos.

Flavonoides são reconhecidamente bons agentes antioxidantes. Estruturas como a quercetina e o canferol possuem certas características, como o anel B com configuração 3-4-catecol e a substituição por OH na posição 3 (quercetina); que conferem a estas substâncias atividades proeminentes na clivagem de radicais livres.

A literatura descreve ainda que em doses elevadas, os flavonoides tornam-se inativos por atuarem como pró-oxidantes. Algumas evidências apontam inclusive, para efeitos mutagênicos e carcinogênicos destes flavonoides, pois causariam dano no DNA celular (SAHU; GRAY, 1996; YOSHINO *et al.*, 1999). No entanto, as

características estruturais que determinariam a atividade pró-oxidante dos flavonoides não foram bem estabelecidas (MOTA *et al.*, 2009).

As áreas da genética toxicológica estão sendo intensamente pesquisadas, pois estão relacionadas com malformações, doenças congênitas, genéticas e degenerativas, envelhecimento celular e do corpo, e o câncer. Então, a genotoxicidade estuda, sob o aspecto genético, o que perturba a vida ou induz a morte tanto em nível de célula como de organismo.

Testes genotóxicos podem ser *in vitro* e *in vivo* e são designados para a detecção de compostos que induzem dano genético, como quebra da fita de ácido desoxirribonucléico (DNA), mutação genética, quebra cromossomal e alteração na capacidade de reparo de DNA (SILVA *et al.*, 2007). O dano genético é causa inicial das mutações, evento crucial para o aparecimento de carcinomas e outros vários problemas, sendo que o principal método para resolução do mesmo é a prevenção (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Para avaliar o potencial genotóxico dos extratos das duas espécies, realizou-se o ensaio cometa para verificação de dano no material celular. Os extratos acetato de etila e etanólico das duas espécies atuaram de certa forma, como protetores do dano no DNA celular. Desta forma, pode-se claramente relacionar as atividades antioxidantes e o potencial genotóxico dos extratos de *M. cassineformis* e *M. dasyclada*.

CONCLUSÕES GERAIS

Os dados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- a revisão bibliográfica indicou que espécies do gênero *Maytenus* são amplamente empregadas com finalidades medicinais, fato evidenciado pelo vasto número de trabalhos envolvendo estudos químicos e biológicos com diferentes espécies;
- a espécie *Maytenus ilicifolia* é a mais utilizada, estudada e comercializada entre as espécies do gênero, principalmente por suas propriedades gastroprotetoras elucidadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, incluindo estudos pré-clínicos e clínicos, no entanto é uma espécie que encontra-se ameaçada de extinção;
- o estudo químico de extratos hexânicos obtidos por extração por soxhlet das folhas de *Maytenus cassineformis* e *Maytenus dasyclada* evidenciou perfis cromatográficos diferenciados, em que não foi possível visualizar, pelas técnicas utilizadas, a presença de compostos triterpênicos;
- o estudo químico de extratos acetato de etila obtidos por extração por soxhlet das folhas de *Maytenus cassineformis* e *Maytenus dasyclada* evidenciou perfis cromatográficos semelhantes para as duas espécies, e foi possível identificar os flavonoides quercetina e canferol, além de outros compostos com absorção no UV semelhantes a derivados flavonoídicos e catequínicos;
- o estudo químico de extratos etanólicos obtidos por extração por soxhlet das folhas de *Maytenus cassineformis* e *Maytenus dasyclada* evidenciou a presença de um perfil cromatográfico mais rico em compostos para a espécie *M. dasyclada*, e a presença de quercetina e canferol;
- os extratos acetato de etila de *M. cassineformis* e *M. dasyclada* demonstraram um maior conteúdo de polifenóis totais ($53,58 \pm 0,43$ e $43,65 \pm 0,80$ mg/g equivalentes em ácido gálico), respectivamente; seguidos pelos extratos etanólicos ($22,76 \pm 0,44$ e $14,59 \pm 0,66$ mg/g equivalentes em ácido gálico), respectivamente;
- os extratos acetato de etila de *M. cassineformis* e *M. dasyclada* demonstraram um maior conteúdo de flavonoides totais ($3,72 \pm 0,27$ e $3,19 \pm 0,32$ mg/g equivalentes

em quercetina), respectivamente; seguidos pelos extratos etanólicos ($2,74 \pm 0,48$ e $2,36 \pm 0,50$ mg/g equivalentes em quercetina), respectivamente;

- os extratos hexânicos demonstraram quantidades inferiores de polifenóis e flavonoides totais;

- os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico das espécies *M. dasyclada* demonstraram IC_{50} de $0,7560 \mu\text{g/mL}$, $0,6114 \mu\text{g/mL}$ e $0,2594 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para os extratos de *M. cassineformis* os valores de IC_{50} foram de $0,2916 \mu\text{g/mL}$, $0,3751 \mu\text{g/mL}$ e $0,3182 \mu\text{g/mL}$, respectivamente;

- sugere-se a atividade anti-inflamatória observada em todos os extratos de ambas as espécies deve-se a um efeito sinérgico dos compostos presentes;

- os extratos etanólico e acetato de etila de *M. dasyclada* demonstraram atividade gastroprotetora nos modelos de úlcera aguda induzidas por etanol e anti-inflamatório não-esteróide;

- os extratos de *M. cassineformis* não evidenciaram efeito gastroprotetor no modelo de úlcera induzida por etanol;

- os extratos etanólico e acetato de etila de *M. dasyclada* atuaram sobre a secreção ácida e secreção de muco;

- os extratos etanólico e acetato de etila de *M. dasyclada* podem ter sua atividade gastroprotetora ligada a fatores antioxidantes, já que interferem na formação de radicais de óxido nítrico e compostos sulfidrilas;

- a atividade antioxidante dos extratos acetato de etila e etanólico de ambas as espécies foi evidenciada pela inibição significativa da quimioluminescência formada pelo luminol (TRAP); inibição da formação de radicais hidroxil, peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas;

- a atividade antioxidante dos extratos pode estar relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos presentes nos mesmos;

- nenhum dos extratos demonstrou potencial genotóxico significativo no ensaio cometa *in vitro*.

Em suma, este trabalho evidencia os primeiros relatos sobre as espécies *Maytenus cassineformis* e *Maytenus dasyclada*. Os resultados demonstraram que as espécies possuem constituintes químicos semelhantes aos relatados para outras espécies do gênero, e evidenciam o potencial anti-inflamatório e antioxidante das espécies, bem como o efeito gastroprotetor de *M. dasyclada*. Sendo assim, estas espécies possuem potencial farmacológico, podendo servir como fontes de novos fitoterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARY, B., YADAV, S.K., BANDYOPADHYAY, S.K., CHATTOPADHYAY, S. Epigallocatechin gallate accelerates healing of indomethacin-induced stomach ulcers in mice. **Pharmacological reports**, v. 63, p. 527-536, 2011.

AHMED, M.S.; FONG, H.H.HS.; SOEJARTO, D.D.; DOBBERSTEIN, R.H.; WALLER, D.P. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Chromatography**, v. 213, n. 2, p. 340-344, 1981.

ALARCON DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M.J.; MOTILVA, V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin, a gross and histologic study. **Pharmacology**, v. 48, p. 56-62, 1994.

ALASALVAR, C., GRIGOR, J. M., ZHANG, D., QUANTICK, P. C., SHAHIDI, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1410–1416, 2001.

ALBUQUERQUE, U.P. HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 678-689, 2006.

ANDRADE, S.F., COMUNELLO, E., NOLDIN, V.F., DELLE MONACHE, F., CECHINEL, V., NIERO, R. Antiulcerogenic activity of fractions and 3,15-dioxo-21 alpha-hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2008.

ANDRADE, S.F.; LEMOSA, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 252–257, 2007.

ANVISA. Consulta a banco de dados. **Medicamentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 12/11/2012.

APEL, M.A. **Óleos voláteis de espécies da subtribo Eugeniinae (Myrtaceae): Composição química e atividade antimicrobiana e antiinflamatória**. 2001. 256 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 161, v. 2, p. 105–121, 2009.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C.S.; OTOFUJI, G.M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L.M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; MESIA-VELA, S. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺,K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 433–440, 2007.

BARNAULOV, O.D.; MANICHEVA, O.A.; ZAPESOCHNAYA, G.G.; SHELYUTO, V.L.; GLYZIN, V.I. Effects of certain flavonoids on the ulcerogenic action of reserpine in mice. **Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal**, v. 16, p. 300-303, 1982.

BARNAULOV, O.D.; MANICHEVA, O.A.; KOMISSARENKO, N.F. Comparative evaluation of the effect of some flavonoids on changes in the gastric wall of reserpine-treated or immobilized mice. **Pharmacological Chemistry**, v. 17, n. 946-951, 1983.

BARNAULOV, O.D.; MANICHEVA, O.A.; SHELYUTO, V.L.; KONOPLEVA, M.M.; GLYZIN, V.I. Effect of flavonoids on development of experimental gastric dystrophies in mice. **Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal**, v. 18, p. 935-941, 1985a.

BARNAULOV, O.D.; MANICHEVA, O.A.; YASINOV, R.K.; YAKOVLEV, G.P. Evaluation of the effect of flavonoids from the aerial parts of *Astragalus quisqualis* bunge and *A. floccosifolius* sumn on the development of experimental lesions in the mouse stomach. **Rast. Resur.**, v. 21, p. 85-90, 1985b.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**, v.2, Viçosa, Impr. Univ. UFV. 1991.

BECERRA, J., GAET, L., SILVA, M., BOHLMANN, F., JAKUPOVIC, J. Sesquiterpenes from seeds of *Maytenus boaria*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3073-3074, 1987.

BEIL, W.; BIRKHOIZ, C.; SEWING, K.F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneimittel Forschung**, v. 45, p. 697-700, 1995.

BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUÑO, A., DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europe* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, p. 457-462, 2000.

BERGAMIN, R.S., MONDIN, C.A. Composição florística e relações fitogeográficas do Componente arbóreo de um fragmento florestal no município de Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas - Botânica**, São Leopoldo, n. 57, p. 217-230, 2006.

BERSANI-AMADO, C.A., MASSAO, L.B., BAGGIO, S.R., JOHANSON, L., ALBIERO, A.L., KIMURA, E. Antiulcer effectiveness of *Maytenus aquifolium* spray dried extract. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 543-545, 2000.

BERSTAD, A. E.; BERSTAD, K.; BERSTAD, A. pH-activated phospholipase A2: an important mucosal barrier breaker in peptic ulcer disease. . **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n. 6, p, 738-742, 2002.

BHAT, R.B.; JACOBS, T.V. Traditional herbal medicine in Transkei. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, n. 1, 1995.

BIRAL, L.; LOMBARDI, J.A. Proposal to conserve the name *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reisserk againsta *M. ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae). *Taxon*, n. 61, v. 2, p. 468-469, 2012.

BJORKMAN, D. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. **American Journal of Medicine**, v. 101, p. 25S-32S, 1996.

BOHM, B. A. **Introduction to flavonoids**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M.F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 5195–5200, 2004.

BORNSTEIN, A.J. Celastraceae. In: HOWARD, R.A. **Flora of the Lesser Antilles: Leeward and Windward Islands - Dicotyledoneae**. Harvard University, Massachusetts, v. 5, n. 2, p. 113-125, 1989.

BOWERS, D.M., STAMP, N.E. Effects on plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**, v. 74. n. 6, p. 1778-1791, 1993.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.115, p.453-466, 1962.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 852p., 2v/il.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BRUNI, R., ROSSI, D., MUZZOLI, M., ROMAGNOLI, C., PAGANETTO, G., BESCO, E., CHOQUECILLO, F., PERALTA, K., LORA, W.S., SACCHETTI, G. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. **Fitoterapia**, V. 77, P. 538-545, 2006.

BRÜNING, R., WAGNER, H. Übersicht über die Celastraceen-inhaltsstoffe Chemie, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1821–1858, 1978.

BUFFA-FILHO, W., CORSINO, J., BOLZANI, V.D., FURLAN, M., PEREIRA, A.M.S., FRANCA, S.C. Quantitative determination of cytotoxic friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceaea) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 75-78, 2002.

CABRERA, A. **Flora de la Provincia de Buenos Aires**. Colección INTA. Tomo IV. Buenos Aires, 1965.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001b. 500 p.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CARLINI, E.; FROCHTEN, G. Toxicologia Clínica (Fase I) da “Espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia*). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (Maytenus ilicifolia “espinheira-santa” e outras)**. Central de Medicamentos. AFIP, Brasil, 1988.

CARLINI, E.A., BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp. (espinheira santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E.A. **Estudo da ação Antiúlcera Gástrica de Plantas Medicinais**. Central de Medicamentos, CEME/AFIP, 1998. Brasília. 128 p.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos Taxonômicos do Gênero Maytenus MOL. Emend. Mol (Celastraceae) do Brasil Extra-amazônico**. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP. 1992.

CHATTOPADHYAY, I.; BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; MAITY, P.; BANERJEE, R. K. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 1397-1408, 2006.

CHEONG, H.; RYU, S.Y.; OAK, M.H.; CHEON, S.H.; YOO, G.S.; KIM, K.M. Studies of structure activity relationship for the anti-allergic actions. **Archives of Pharmacal Research**, n. 21, p. 21, 478-480, 1998.

CHEN, X.; OPPENHEIM, J.; HOWARD, Z.O.M. Shikonin, a component of antiinflammatory chinese herbal medicine, selectively blocks chemokine binding to CC chemokine receptor-1. **International Immunopharmacology**, v.1, p.229-236, 2001.

CIPRIANI, T.R., MELLINGER, C.G., SOUZA, L.M., BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARQUES, M.C.A., GORIN, P.A.J., SASSAKI, G.L., IACOMINI, M. Acid heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 274-278, 2008.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

CORDEIRO, P.J.M., VILEGAS, J.H.Y., LANÇAS, F.M. HRCG-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira-santa"). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 523-526, 1999.

CORDELL, G.A., SHIN, Y.G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural products extracts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 1089-1094, 1999.

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

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

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

CRYER, B. NSAID gastrointestinal toxicity. **Current Opinion in gastroenterology**, v. 16, n. 6, p. 495-502, 2000.

DA SILVA, J.O.; HERNANDES, T.G.; CASTRO FRANÇA, S. de; FACHIN, A.L.; PEREIRA, A.M.S. Potential cytotoxic of extracts *Maytenus* sp. front of tumor strain MCF7 (breast cancer). **Planta Medica**, v. 78, n. 11, p. 1108, 2012.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; BARANIAK, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 308-315, 2006.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8–15, 2005.

DEKKER, L.V.; SEGAL, A.W. Signals to move cells. **Science**, v. 287, n.11, p.982-984, 2000.

DEVI, R. S.; NARAYAN, S.; VANI, G.; DEVI, C. S. S. Gastroprotective effect of *Terminali arjuna* Bak on diclofenac sodium induced gastric ulcer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 167, p. 71-83, 2007.

DI CARLO, G.; AUTORE, G.; IZZO, A.A.; MAIOLINO, P.; MASCOLO, N.; VIOLA, P.; DIURNO, M.V.; CAPASSO, F. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 45, p. 1054-1059, 1993.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y.; TAKI, T.; TORI, M.; TAKAOKA, S.; JIA, Y.; LI, D. Immunossuppressive terpenoids from extracts of *Tripterygium wilfordii*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 582–587, 2001.

ELDRIDGE J. B. Medicine in the Exumas and Long Island Bahamas: A field study. **Economic Botanical**, v. 29, n. 4, p. 307-316, 1975.

FERREIRA de SANTANA, C. F., ASFORA, J.J., CORTIAS, C.T. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, p. 37-49, 1971.

FERRERES, F., LLORACH, R., GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 312-321, 2004.

FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; SILVA, R.P.; JORGE, R.M.; TAGLIATI, C.A.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; PERES, V.; VIEIRA FILHO, S.A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 842-847, 2007.

FOX, B. Medicinal plants in tropical medicine: Natural Products in Cancer treatment from Bench to clinic. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 22-25, 1991.

FRENICH, A.G.; MARTÍNEZ VIDAL, J.L.; PASTOR-MONTORO, E.; ROMERO GONZÁLEZ, R. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390, p. 947-959, 2008.

GAKUNJU, D.M.N., MBERU, E.K., DOSSAJI, S.F., GRAY, A.I., WAIGH, R.D., WATERMAN, P.G., WATKINS, W.M., Potent antimalarial activity of the alkaloid nitidine, isolated from a Kenyan herbal remedy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2606–2609, 1995.

GAMLATH, C.B., GUNATILAKA, A.A.L., TEZUKA, Y., KIKUCHI, T., BALASUBRAMANIAM, S. Quinone-methide, phenolic and related tri-terpenoids of plants of Celastraceae: further evidence for the structure of celastranhydride. **Phytochemistry** v. 29, p. 3189-3192, 1990.

GEOCZE, S.; VILELA, M.; CHAVES, B.; FERRARI, A. Tratamento de pacientes portadores de dispepsia alta ou úlcera péptica com preparações de *Maytenus*

ilicifolia. In: *Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras*. Central de Medicamentos. AFIP, Brasil, 1988.

GNOATTO, S.C.B., BASSANI, V.L. COELHO, G., SCHENKEL, E.P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.304-307, 2007.

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

GONZÁLEZ, A.G., JIMÉNEZ, I.A., RAVELO, A.G., BAZZOCCHI, I.L. B-agarofuran sesquiterpenes from *Maytenus canariensis*. *Phytochemistry*, v. 29, p. 2577-2579, 1990.

GONZALEZ, A.G.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L.; JIMÉNEZ, I. A. Ethnobotanical uses of Celastraceae. Bioactive metabolites. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 23; p. 649- 738, 2000.

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

GONZÁLEZ, A.G.; KENNEDY, M.L.; RODRIGUEZ, F.M.; BAZZOCCHI, I.L.; JIMÉNEZ, I.A.; RAVELOA, A.G.; MOUJIRB, L. Absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus* species (Celastraceae). **Tetrahedron**, v. 57, p. 1283-1287, 2001.

GONZÁLEZ, A. G.; TINCUSI, B. M.; BAZZOCCHI, I. L.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; KONOSHIMA, T.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G. Antitumor promoting effects of sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (Celastraceae). **Bioorganic and Medicine Chemistry**, v. 8, p. 1773-1778, 2000.

GRANDE, S.M.B., AQUINO NETO, F.R. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova**, v. 13, n. 3, p. 191-199, 1990.

GUERRERO, C.P.; MARTIN, M.J.; MARHUENDA, E. Prevention by rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats, role of endogenous prostaglandins. **General Pharmacology**, v. 25, p. 575-580, 1994.

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2206-2213, 2006.

HARBORNE, J. B., BAXTER, H., MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. 2 ed. London: Taylor & Francis, 1999.

HERTER, W.G.; LEGRAND, D. Dos árboles nuevos del Uruguay, pertenecientes al género *Maytenus* (Celastraceae). **Revista Sudamericana de Botánica**, v. 3, p. 110-114, 1936.

HEYWOOD, V.H. **Flowering Plants of the World**. Oxford University Press: New York, 1993.

HOFBAUER, R.; FRASS, M.; GMEINER, B.; HANDLER, S.; SPEISER, W.; KAPIOTIS, S. The green tea extract epigallocatechin gallate is able to reduce neutrophil transmigration through monolayers of endothelial cells. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v.111, n.7, p.278-282, 1999.

HOFBAUER, R.; FRASS, M.; GMEINER, B.; KAYE, A.D.; FROST, E.A. Garlic extract (*Allium sativum*) reduces migration of neutrophils through endothelial cell monolayers. **Middle East Journal of Anesthesiology**, v.15, n.6, p.649-658, 2000.

HORIUCH, M.; MURAKAMI, C.; FUKAMIYA, N.; YU, D.; CHEN, T.-H.; BASTOW, K. F.; ZHANG, D. C.; TAKAISHI, Y.; IMAKURA, Y.; LEE, K. H. Tripfordines A-C, sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii*, and structure anti-HIV activity relationships of *Tripterygium* alkaloids. **Journal of Natural Products**, 69, p. 1271–1274, 2006.

HORN, R., VARGAS, V. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 113-118, 2003.

HURRELL, J., BAZZANO, D. **Arbustos I**. Biota Rioplatense VIII. Buenos Aires: Edit. LOLA, 2003.

HUSSEIN, G.; NAKAMURA, N.; MESELHY R. M.; HATTORI, M. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 689-694, 1999.

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

IZZO, A.A.; DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Antiulcer effect of flavonoids: role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 179-181, 1994.

JAIN N., LIGHT, M.E., VAN STADEN, J. Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 163–166, 2008.

JAMIESON, B.A., BOWERS, D.M. Iridoid glycoside variation in the invasive plant dalmatian toadflax, *Linaria dalmatica* (Plantaginaceae), and sequestration by the biological control agent, *Calophasia lunula*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p.70-79, 2010.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.V.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

JURD, L. Spectral Properties of Flavonoid Compounds. Cap. 5. In: GEISSMAN, T.A. **The Chemistry of Flavonoid Compounds**. New York: Macmillan. 1962, 107-155.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUO, Y.; KING, M.; CHEN, G.; CHEN, H.; CHEN, C; CHEN, L.; LEE, K. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus emarginata*: Emarginatine-C and D and cytotoxic emarginatine-E and emarginatinine. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 2, p. 803-807, 1994.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTIN CALERO, M.J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric Lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 45-53, 2000.

LAITINEN, M.L., TITTO, R.J., ROUSI, M. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 7, p. 1609-1622, 2000.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M S. A.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Campinas: Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais – SBPM, UNIFESP-SP, p. 7-43, 2008.

LEE, K. W.; KIM, Y. J.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 7292-7295, 2003.

LEITE, J. P., BRAGA, F.C., ROMUSSI, G., PERSOLI, R.M., TABACH, R., CARLINI, E.A., OLIVEIRA, A.B. Constituents from *Maytenus ilicifolia* Leaves and Bioguided Fractionation for Gastroprotective Activity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 2, p. S1-S16, 2010.

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

LEITE, J.P.V. **Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas.** 2002. 294 p. Tese (Doutorado – Ciências, Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTIN CALERO, M.J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric Lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 71, p. 45-53, 2000.

LIANG, Z., JIANG, Z., ZHAO, Z. Comparative analysis of *Oldenlandia diffusa* and its substitutes by high performance liquid chromatographic fingerprint and mass spectrometric analysis. **Planta Medica**, v. 73, p. 1502-1508, 2007.

LIÃO, L. M. Sesquiterpene pyridine alkaloids. *In: The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Ed. Elsevier, San Diego, California. v. 60, p. 287-344. 2003.

LIMA, J.T.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ASSIS, T.S.; SILVA, M.S.; DACUNHA, E.V.L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B.A. Spasmolytic action of diplotropin, a furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth., involves calcium blockade in ginea-pig ileum. **Zeitschrift für Naturforschung B**, n. 60, p.1-8, 2005.

LIMA, E.S.; VARGAS, F.de S.; POHLIT, A.M. Antioxidant, Antiinflammatory and Antiplatelet Aggregating Activities of *Maytenus guyanensis* Bark Extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 7, p. 1107-1112, 2010.

LAM, E.K.Y., TAI, E.K.K., KOO, M.W.L., WONG, H.P.S., WU, W.K.K., YU, L., SO, W.H.L., CHO, W.C.H. Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Life Sciences**, v. 80, 2128–2136, 2007.

LOESNER, T.H. Celastraceae. **Die Natuerlichen Pflanzenfamilien**, v. 20b, p. 87-197, 1942.

LOMBARDI, J.A., GROppo, M., BIRAL, L. 2012. Celastraceae. *In*: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB006746>). Acesso em 12/11/2012.

MABBERLEY, D.J. The significance of the three independent “Kew” editions of Johnson’s Gardener’s Dictionary. **Feddes Repertorium**, v. 10, n. 5-6, p. 263-276, 1990.

MACARI, P.A.T., PORTELA, C.N., POHLIT, A.M. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 4, p. 513-518, 2006.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, p.214-222, **2009**.

MANACH, C., MAZUR, A., SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinions in Lipidology**, v. 16, p. 77–84, 2005.

MANS, D.R.A.; ROCHA, A.B.; SCHWARSMANN, G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. **The oncologist**, v. 5, p. 185-198, 2000.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2399-2407, 2005.

MARTIN, M.J.; MOTILVA, V.; ALARCON DE LA LASTRA, C. Quercetin and naringenin, effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 150-153, 1993.

MARTIN, M.J.; LA-CASA, C.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; CABEZA, J.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **Z. Naturforsch.**, v. 53, p. 82-88, 1998.

MARTINS, M.V.; ESTEVAM, C. DOS S.; SANTOS, A.L. L.M.; DIAS, A.S.; CUPERTINO-DA-SILVA, Y.K.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; MIRANDA, A.L.P.; BARREIRO, E.J.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARAUJO, B.S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; SANT'ANA, A.E.G. Antinociceptive effects of an extract, fraction and an isolated compound of the stem bark of *Maytenus rigida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 598-603, 2012.

MARTUCCIELO, S., BALESTRIERI, M.L., FELICE, F., ESTEVAM, C.S., SANT'ANA, A.E., PIZZA, C., PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. **Chemical and Biological Interactions**, v. 183, n. 3, p. 450-454, 2010.

MASSIGNANI, J.J., LEMOS, M., MAISTRO, E.L., SCHAPHAUSER, H.P., JORGE, R.F., SOUSA, J.P.B., BASTOS, J.K., ANDRADE, S.F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1355-1360, 2009.

MELECCHI, M.I.S. **Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus L.: estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 218 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

MELO, S.F., SOARES, S.F., COSTA, R.F., SILVA, C.R., OLIVEIRA, M.B.N., BEZERRA, R.J.A.C., de ARAÚJO, A.C., CARDOSO, V.N., BERNADO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 469, p. 33-38, 2001.

MERKEN, H. M., BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 577–599, 2000.

MEYER, V.R. **Practical High-performance Liquid Chromatography**. 4 ed. New York: John Willey & Sons. 2004.

MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T. C.. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673–751, 2000.

MIGUEL, A., ANDRADE, J.B., Rapid quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by direct HPLC separation after ultrasonic acetonitrile extraction. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 35, p. 35-41, 1989.

MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion induced gastric mucosal injury in rats. **Physiological Research**, v. 49, n. 4, p. 441-446, 2000.

MORAES, T.M., KUSHIMA, H., MOLEIRO, F.C., SANTOS, R.C., ROCHA, L.R.M., MARQUES, M.O., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C.A. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, p. 499–505, 2009.

MORITA, H., HIRASAWA, Y., MUTO, A., YOSHIDA, T., SEKITA, S. SHIROTA, O. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 1050-1052, 2008.

MOSSI, A. M.; ZANATTA, R. S.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; GERALD, L. T. S. On the distribution of *Maytenus* species in Rio Grande do Sul. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 29-32, 2002.

MOSSI, A.J.M. **Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss**. 2003. 101 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MOSSI, A.J.M.; CANSIAN, R.L.; CARVALHO, A.Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; MAZUTTI, M.; NASCIMENTO FILHO, I. E ECHEVERRIGARAY, S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 168-178, 2004.

MOTA, K.S. de L.; DIAS, G.E.N.; PINTO, M.E.F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITTO, A.R.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979-1012, 2009.

MOTA, M.L.R., THOMAS, G., BARBOSA FILHO, J.M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, p. 289-300, 1985.

MULLER, A.A.; REITER, S.A.; HEIDER, K.G.; WAGNER, H. Plan-derived acetophenones with antiasthmatic and antiinflammatory properties: inhibitory effects

in chemotaxis, right angle scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. **Planta Medica**, v.65, n.7, p.590-594, 1999.

MUÑOZ, C. GALEFFI, E. FEDERICI, J.A. GARBARINO, M. PIOVANO, M. NICOLETTI, M. Boarioside, an eudesmane glucoside from *Maytenus boaria*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 853-858, 1996.

MUNOZ-MARTINEZ, F.; LU, P.; CORTES-SELVA, F.; PEREZ-VICTORIA, J.M.; JIMENEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; SHAROM, F. J.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. Celastraceae sesquiterpenes as a new class of modulators that bind specifically to human P-glycoprotein and reverse cellular multidrug resistance. **Cancer Research**, v. 64, p. 7130–7138, 2004.

MUTHAURA, C.N., RUKUNGA, G.M., CHHABRA, OMAR, S.C., GUANTAI, A.N., GATHIRWA, J.W., TOLO, F.M., MWITARI, P.G., KETER, L.K., KIRIRA, P.G., KIMANI W., MUNGAI, G.M., NJAGI, E.N.M. Antimalarial activity of some plants traditionally used in treatment of malaria in Kwale district of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 545-551, 2007.

NAKAMURA, M.; NAKASUMI, T.; YOSHIZAMA, T.; MINAGAWA, Y. Extracts of *Maytenus ilicifolia* as analgesic anti-inflammatory drug. **European Patent Application**, 1997.

NAM, S.Y.; KIM, N.; LEE, C.S.; CHOI, K.D.; LEE, H.S.; JUNG, H.C.; SONG, I.S. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranylgeranylacetone. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 11, p. 2110-2120, 2005.

NIERO R, de ANDRADE SF, CECHINEL FILHO V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1851-1871, 2011.

NIERO, R., MAFRA, A.P., LENZI, A.C., CECHINEL, V., TISCHER, C.A., MALHEIROS, A., SOUZA, M.M., YUNES, R.A., DELLE MONACHE, F. A new triterpene with antinociceptive activity from *Maytenus robusta*. **Natural Product Research**, v. 20, n. 14, p. 1315-1320, 2006.

NOSSACK, A.C., CELEGHINI, R.M.S., LANÇAS, F.M., YARIWAKE, J.H. HPLC-UV and LC-MS Analysis of quinonemethides triterpenes in hydroalcoholic extracts of "espinheira-santa" (*Maytenus aquifolium* Martius, Celastraceae) leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 4, p. 582-586, 2004.

NÚÑEZ, M. J.; GUADAÑO, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; BAZZOCCHI, I. L. J. Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chiapensis*. **Journal of Natural Products**, n. 67, p. 14-18, 2004.

OHSAKI, A., IMAI, Y., NARUSE, M., AYABE, S., KOMIYAMA, K., TAKASHIMA, J. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 469-471, 2004.

PEREIRA, A.M.S.; MENEZES, Jr.A.; PEREIRA, P.S.; CERDEIRA, R.M.M.; FRANCA, S.C, VILEGAS, J.H.Y.; CORDEIRO, P.J.M.; LANÇAS, F.M. Effect of fertilization on morphologic characteristics and secondary metabolites of *Maytenus aquifolium* Mart.. **Herbs, Spices and Medicinal Plants**. v. 3, p. 43-47, 1995.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamação. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 111-147.

PERESTELO, N.R., JIMÉNEZ, I.A., TOKUDA, H., HAYASHI, H., BAZZOCCHI, I.L. Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer chemopreventive agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 2, p. 127-132, 2010.

PESSUTO, M.B., COSTA, I.C.da, SOUZA, A.B.de, NICOLI, F.M., MELLO, J.C.P. de, PETEREIT, F., LUFTMANN, H. Atividade antioxidante de extratos e taninos

condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.

PORTER, L. J. Tannins. In: HARBORNE, J.B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry: Vol. 1. plant phenolics** (pp. 389–419). London: Academic Press, 1989.

PUUPPONEN-PIMIÄ , R., NOHYNEK, L., MEIER, C., KAHKOEN, M., HEINONEN, M., HOPIA, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494–507, 2001.

QUEIROGA, C.L.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3b-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 465–468, 2000.

QUIDEAU, S., DEFFIEUX, D., DOUAT-CASASSUS, C., POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

RAO, C.V.; GOVINDARAJAN, S.K.O.R.; RAWAT, A.K.S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related gastric mucosal damage in rats. **Natural Products Sciences**, v. 9, p. 68-72, 2003.

REISSEK, S. Celastrinea, Ilicineae, Rhamnea. In: MARTIUS, C.P.F.; EICHLER, A.G. **Flora Brasiliensis**. v. 11, parte 1. Editora: Frid Fleisher, Lipsiae. 1861.

REYES, C.P., NUNEZ, M.J., JIMENEZ, I.J., BUSSEROLLES, J., ALCARAZ, M.J., BAZZOCCHI, I.L. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. **Bioorganical & Medical Chemistry**, v. 14, p. 1573-1579, 2006.

RIOJA, I., UBEDA, A., TERCENIO, M.C., GUILLÉN, I., RIGUERA, R., QUINTELA, J.M., PEINADOR, C., GONZÁLEZ, L.M., ALCARAZ, M.J. An anti-inflammatory ditriazine inhibiting leucocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2. **European Journal of Pharmacology**, v. 397, p. 207-217, 2000.

ROMANI, A.P.; VIGNOLINI, L.; ISOLANI, F.I., HEIMLER, D. HPLC-DAD/MS Characterization of Flavonoids and Hydroxycinnamic Derivatives in Turnip Tops (*Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1342-1346, 2006.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L. M. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 76, n. 1, p. 211-225, 2008.

SAHU, S.C.; GRAY, G.C. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cat. Inist.*, v. 104, p. 193-196, 1996.

SAMMAN, S., LYONS W. P. M., COOK, N. C. Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In: RICE-EVANS, A. PACKER, C. **Flavonoids in health and disease** (pp. 469–482). New York: Marcel Dekker. (1998).

SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 237-239, 1997.

SANTOS, L. B dos. **A Família Celastraceae na Reserva Biológica Municipal da Serra do Japi, Jundiá, SP**. 2008, 46 f. (Monografia de Conclusão da Graduação) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2008.

SANTOS, V.A.F.F.M.; REGASINI, L.O.; NOGUEIRA, C.R.; PASSERINI, I.M.; BOLZANI, V.S.; GRAMINHA, M.A.S.; CICARELLI, R.M.B. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 991–995, 2012.

SEBSEBE, D. The genus *Maytenus* (Celastraceae) in NE tropical Africa and tropical Arabia. **Symbolae Botanicae Upsaliensis**, v. 25, p. 1-101, 1985.

SEMA/GTZ – SECRETARIA DE ESTADO E MEIO AMBIENTE / DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR TECHNISCHE ZUSAMMERNARBEIT. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná**. Curitiba, SEMA/GTZ, 1995. 139 p.

SHEN, Y.C.; CHOU, C.J.; CHIOU, W.F.; CHEN, C.F. Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix *Stephaniae tetrandrae* comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions. **Molecular Pharmacology**, v.60, n.5, p.1083-1090, 2001.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Citotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhwasca*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 12, p. 1675-1681, 1994.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Revised structures of cangorosins, triterpene dimmers from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 111-115, 1997.

SILVA, M.S., SOUSA, D. P., MEDEIROS, V.M., FOLLY, M.A.B., TAVARES, J.F., BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 500-503, 2008.

SILVA, G., TANIÇA, M., ROCHA, J. SERRANO, R., GOMES, E.T., SEPODES, B., SILVA, O. In vivo anti-inflammatory effect and toxicological screening of *Maytenus*

heterophylla and *Maytenus senegalensis* extracts. **Human and Experimental Toxicology**, 2010.

SILVA, F.C.; RODRIGUES, V.G.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; MIRANDA, R.R.S.; FILHO, S.A.V.; A new friedelane triterpenoid from the branches of *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). *Journal of Chemical Research*, v. 10, p. 555-557, 2011.

SILVA, G.N.; DE CAMARGO, E.A.; SALVALDORI, D.M.F.; RIBEIRO, D.A. Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endontology**, v. 104, p.58-61, 2007.

SIMMONS, M.P.; CLEVINGER, C.C.; SAVOLAINEN, V.; ARCHER, R.H.; MATHEWS, S.; DOYLE, J.J. Phylogeny of the Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequence and morphology. **American Journal Botany**, v. 88, n. 2, p. 313-325, 2001.

SLEUMER, H. Studien ueber die Gattung Leucothoe D. Don. **Botanische Jahrbuecher fuer Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie**, v. 78, p. 435-480, 1959.

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

SOSA, S., MORELLI, D.F., TUBARO, A., CAIROLI, P., SPERANZA, G., MANITTO, P. Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. **Phytochemistry**, v. 14, p. 109-114, 2007.

SOUSA, G.F.; FERREIRA, F.L.; DUARTE, L.P.; SILVA, G.D.F.; MESSIAS, M.C.T.B.; VIEIRA, S.A. Structural determination of 3 beta,11 beta-dihydroxyfriedelane from

Maytenus robusta (Celastraceae) by 1D and 2D NMR. **Journal of Chemical Research**, v. 4, p. 203-205, 2012.

SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 59–67, 2008.

SOUZA V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática** - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SOUZA-FORMIGIORI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

SPITZER, V.; AICHHOLZ, R. Analysis of Naturally Occurring α -Acetotriacylglycerides by Gas Chromatography - Chemical Ionization Mass Spectrometry. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 19, p. 497-502, 1996.

SUYENAGA, E.S., KONRATH, E.L., DRESCH, R.R., APEL, M.A., ZUANAZZI, J.A., CHAVES, C.G., HENRIQUES, A.T. Appraisal of the Antichemotactic Activity of Flavonoids on Polymorphonuclear Neutrophils. **Planta Medica**, n. 77, p. 698-704, 2011.

TABACH, R., OLIVEIRA, W.P. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of a dry extract of *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reiss produced by a jet spouted bed dryer. **Pharmazie**, v. 58, p. 573-576, 2003.

TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 378–384, 2007.

TROPICOS.org. **Missouri Botanical Garden**. 1858. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/50136731>. Acesso em 12/05/2011.

VELLOSA, J.C.R.; KHALIL, N.M.; FORMENTON, V.A.F.; XIMENES, V.F.; FONSECA, L.M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 243-244, 2006.

VIEIRA, R.F. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras: um desafio para o futuro. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 61-68, 2002.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512-520, 2000.

WALLACE, J.L. Building a better aspirin: gaseous solutions to a century-old problem. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 4, p. 421-428, 2007.

WHITSON, E. L.; MALA, S. M. V. D.; VELTRI, C. A.; BUGNI, T. S.; SILVA, E. D.; IRELAND, C. M. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1833–1835, 2006.

WOLFENDER, J.L. HPLC in natural product analysis: The detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

WOODLAND, D.W. **Contemporary Plant Systematics**, Prentice-Hall.: New Jersey, 1991.

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

YOSHINO, K.; SUZUKI, M.; SASAKI, K.; MIYASE, T.; SANO, M. Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, v. 10, p. 223-229, 1999.

YU, K.; LITTLE, D.; PLUMB, R.; SMITH, B. High-throughput quantification for a drug mixture in rat plasma—a comparison of Ultra Performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. ***Rapid Communications in Mass Spectrometry***, v. 20, n. 4, p. 544-552, 2006.

ZHU, N., SHARAPIN, N., ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. ***Phytochemistry***, v. 47, n. 2, p. 265-268, 19.

