

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

VARIABILIDADE GENÉTICA E DE COMPOSTOS VOLÁTEIS
E SEMI-VOLÁTEIS EM *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

ALTEMIR JOSÉ MOSSI

SÃO CARLOS – SP
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

VARIABILIDADE GENÉTICA E DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

E SEMI-VOLÁTEIS EM *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Doutorando: Altemir José Mossi

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

**SÃO CARLOS – SP
2003**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M913vg Mossi, Altemir José.
Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-
voláteis em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss / Altemir José
Mossi. -- São Carlos : UFSCar, 2003.
101 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2003.

1. Conservação da natureza. 2. RAPD (Random
Amplified Polymorphic DNA). 3. GC/MS. 4. Variabilidade
genética. I. Título.

CDD: 574.5 (20^a)

Dedico esta tese aos meus pais
Francisco José Mossi e Alvina
Hoffmann Mossi.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a toda minha família por estarem sempre ao meu lado.

Ao Professor Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna, pela orientação e amizade.

A URI e ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar, que viabilizaram a realização deste doutorado.

Ao amigo e sócio Sérgio Henrique Mosele pela amizade e ajuda.

Ao CNPq, FAPERGS e Secretaria de Ciência e Tecnologia-RS (PIT-Norte) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos colegas da URI-Campus de Erechim, pela amizade e contribuições, as quais foram decisivas na elaboração deste trabalho.

Ao colega de doutorado e amigo Rogério Luis Cansian, que contribuiu ativamente para a execução deste trabalho.

Aos alunos, bolsistas de iniciação científica do Centro Tecnológico da URI, que participaram efetivamente em atividades ligadas a este trabalho.

As instituições UNAERP, EMATER/RS, FEPAGRO/RS, EPAGRI/SC, EMATER/PR, EMPAER/MS, EMBRAPA-Floresta, Grupo de Escoteiros Tupinambás, FUNAI e MST pelo auxílio de seus pesquisadores, funcionários e produtores rurais na realização de coletas de amostras, sementes e disponibilização de informações.

Aos diversos curadores de Herbários do Rio Grande do Sul por disponibilizar as exsiccatas para análise.

Aos demais pesquisadores, agricultores e profissionais que de alguma forma ajudam na construção desta tese.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS..... | v |
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| CAPÍTULO 1: Introdução..... | 1 |
| CAPÍTULO 2: Revisão Bibliográfica..... | 3 |
| 2.1 Gênero <i>Maytenus</i> Mol. emend. Mol..... | 3 |
| 2.1.1 <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss (1861)..... | 4 |
| 2.1.2 <i>Maytenus aquifolia</i> Mart. (1841)..... | 6 |
| 2.1.3 <i>Maytenus evonymoidis</i> Reiss (1861)..... | 6 |
| 2.2 Conservação de Recursos Genéticos..... | 7 |
| 2.2.1 Marcadores Moleculares..... | 8 |
| 2.3 Metabólitos secundários..... | 9 |
| 2.4 Fluidos Supercríticos..... | 12 |
| Referências Bibliográficas..... | 16 |
| CAPÍTULO 3: Levantamento da Distribuição de Espécies do Gênero <i>Maytenus</i> no Rio Grande Do Sul..... | 23 |
| Resumo..... | 23 |
| Introdução..... | 24 |
| Material e Métodos..... | 25 |
| Resultados e Discussão..... | 25 |
| Referências Bibliográficas..... | 27 |
| CAPÍTULO 4: Variabilidade Genética Intra e Interpopulacional em <i>Maytenus Ilicifolia</i> Mart. ex Reiss, através de Marcadores RAPD..... | 29 |
| Resumo..... | 30 |
| Introdução..... | 31 |
| Material e Métodos..... | 32 |
| Resultados e Discussão..... | 34 |
| Referências Bibliográficas..... | 40 |

| | |
|--|-----|
| CAPÍTULO 5: Estimativa da Variabilidade Genética em Populações Nativas de <i>Maytenus Illicifolia</i> Mart. ex Reiss. Através de Marcadores RAPD..... | 43 |
| Resumo..... | 44 |
| Introdução..... | 45 |
| Material e Métodos..... | 46 |
| Resultados e Discussão..... | 48 |
| Referências Bibliográficas..... | 55 |
| CAPÍTULO 6: Estudo de Compostos Orgânicos Voláteis e Semi-voláteis, Via Cromatografia Gasosa (CG-EM) de <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss, Obtido por CO₂ a Alta Pressão | 57 |
| Resumo..... | 58 |
| Introdução..... | 59 |
| Material e Métodos..... | 60 |
| Resultados e Discussão..... | 63 |
| Referências Bibliográficas..... | 76 |
| Capítulo 7: Variabilidade de Compostos Orgânicos Voláteis e Semi-voláteis em Populações Nativas de <i>Maytenus Illicifolia</i> Mart. ex Reiss | 78 |
| Resumo..... | 79 |
| Introdução..... | 80 |
| Material e Métodos..... | 82 |
| Resultados e Discussão..... | 85 |
| Referências Bibliográficas..... | 92 |
| CAPÍTULO 8: Discussões Gerais..... | 94 |
| CAPÍTULO 9: Conclusões..... | 100 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Temperatura crítica, pressão crítica e massa específica crítica de alguns solventes de interesse na ESC (59)..... | 13 |
| Tabela 2 | Propriedades físicas e de transporte de uma substância pura (59)..... | 14 |

Capítulo 4

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Coordenadas e distância (m) das populações de <i>Maytenus ilicifolia</i> nos municípios de ocorrência | 33 |
| Tabela 2 | Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada <i>primer</i> utilizado nas três populações analisadas | 36 |
| Tabela 3 | Similaridades intra e interpopulacionais de <i>Maytenus ilicifolia</i> coletadas no Alto Uruguai, RS | 38 |

Capítulo 5

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada <i>primer</i> utilizado nas três populações analisadas | 49 |
|----------|---|----|

Capítulo 6

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Lista dos compostos selecionados para estudo, após análise por Cromatografia Gasosa –EM acoplada a espectrometria de massas..... | 62 |
| Tabela 2 | Resultados das extrações realizadas em CO ₂ alta pressão em <i>Maytenus ilicifolia</i> | 63 |
| Tabela 3 | Resultados da análise da ANOVA e teste Tukey para verificação da influência do tamanho das partículas na distribuição dos diferentes grupos de compostos analisados no extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i> | 68 |
| Tabela 4 | Resultado da aplicação de ANOVA e teste Tukey para verificação da influência do tamanho das partículas na distribuição dos diferentes compostos analisados no extrato | 69 |
| Tabela 5 | Resultados de ANOVA e teste Tukey relativo à influência da vazão do solvente da extração na distribuição dos diferentes grupos analisados no extrato | 70 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela 6 | Resultados de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da vazão do solvente da extração na distribuição dos diferentes compostos analisados no extrato..... | 71 |
| Tabela 7 | Resultados da aplicação da ANOVA e teste Tukey sobre a influência da temperatura de extração na distribuição dos diferentes grupos analisados no extrato (densidade constante em aproximadamente 0,84 g CO ₂ /mL) | 72 |
| Tabela 8 | Resultados da análise de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da temperatura de extração na distribuição dos compostos analisados no extrato (densidade constante em aproximadamente 0,84 g CO ₂ /mL) | 73 |
| Tabela 9 | Resultados da análise de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da densidade de extração na distribuição dos diferentes grupos analisados no extrato (temperatura constante em aproximadamente 323°K) | 74 |
| Tabela 10 | Resultados da análise de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da densidade do solvente de extração na distribuição dos diferentes compostos analisados no extrato (temperatura constante em aproximadamente 323°K)..... | 75 |
| Capítulo 7 | | |
| Tabela 1 | Resultados dos rendimentos médios dos extratos obtidos em fluido supercrítico das 18 populações de <i>M. ilicifolia</i> e da análise da ANOVA e teste Tukey | 86 |
| Tabela 2 | Resultados dos valores médios da composição química do extrato em (mg/g de extrato) obtidos das 18 populações de <i>M. ilicifolia</i> e analisados por GC-MS e da análise da ANOVA complementada pelo teste Tukey..... | 89 |

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Diagrama Pressão x Temperatura para uma substância pura (59)..... | 13 |
| Figura 2 | Diagrama característico $\rho_R \times P_R$ de uma substância pura (59)..... | 14 |
| Figura 3 | Esquema representativo de um processo de extração supercrítica (48), composto por: (A) cilindro sifonado do solvente, (B) bomba de alta pressão, (C) extrator, (D) válvula de expansão e (E) tubo coletor..... | 15 |

Capítulo 3

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Localização do Estado do Rio Grande do Sul..... | 28 |
| Figura 2 | Regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul..... | 28 |
| Figura 3 | Diferenciação climatológica no Rio Grande do Sul..... | 28 |
| Figura 4 | Províncias Geomorfológicas..... | 28 |
| Figura 5 | Vegetação do Rio Grande do Sul..... | 28 |

Capítulo 4

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Gel de agarose demonstrativo, obtido com o primer OPF 01 na população Erechim | 37 |
| Figura 2 | Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD..... | 39 |

Capítulo 5

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Locais de coleta das 18 populações de <i>M. ilicifolia</i> nos estados do Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, Brasil | 47 |
| Figura 2 | Dendrograma de algumas populações de <i>M. ilicifolia</i> e das espécies <i>M. aquifolia</i> e <i>M. evonymoidis</i> determinado por RAPD, usando coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA..... | 51 |
| Figura 3 | Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD em populações de <i>Maytenus ilicifolia</i> | 52 |
| Figura 4 | Análise de Coordenadas Principais por distância Euclidiana das 18 populações de <i>M. ilicifolia</i> analisadas..... | 53 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 5 | Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 18 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipos de solo) | 54 |
| Capítulo 6 | | |
| Figura 1 | Unidade experimental de extração de alta pressão. (A) cilindro de CO ₂ | 61 |
| Figura 2 | Curvas de extração com as diferentes vazões testadas (1, 2 e 3 g de CO ₂ .min ⁻¹) | 64 |
| Figura 3 | Curvas de extração em diferentes temperaturas e pressões (densidades) | 65 |
| Figura 4 | Cromatograma de ion total do extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i> obtido em fluido supercrítico (175 bar, 308°K) | 66 |
| Figura 5 | Estrutura dos compostos padrões do grupo III (triterpenos)..... | 67 |
| Capítulo 7 | | |
| Figura 1 | Locais de coleta das 18 populações de <i>Maytenus ilicifolia</i> nos estados do Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, Brasil .. | 82 |
| Figura 2 | Unidade experimental de extração de alta pressão..... | 83 |
| Figura 3 | Cromatograma de ion total do extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i> obtido em fluido supercrítico do <i>bulk</i> 1 da população de Erechim | 87 |
| Figura 4 | Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas da média dos três <i>bulks</i> de 10 plantas de cada uma das 18 populações, com base na composição química analisada..... | 90 |
| Figura 5 | Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 18 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipos de solo) | 91 |

RESUMO

Maytenus ilicifolia (espinheira-santa) é uma planta nativa da região sul do Brasil empregada na medicina popular para tratamentos de indigestão, úlceras e gastrites. A ampla utilização de *Maytenus ilicifolia* na medicina popular, tem levado à perda de populações da espécie, encontrando-se atualmente na lista da FAO como uma das espécies prioritárias para estudo e conservação na América do Sul. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo realizar estudos que subsidiem protejos de conservação desta espécie. Inicialmente foi realizado um levantamento em herbários e a campo, verificando a ocorrência e distribuição do gênero *Maytenus* no estado do Rio Grande do Sul, sendo encontradas três novas espécies: *M. glaucescens* Reiss, *M. gonoclada* Mart. e *M. robusta* Reiss. No estudo da variabilidade genética em três populações, a variação intrapopulacional (0,102 a 0,140) é superior à interpopulacional (0,076 a 0,099). As três populações analisadas se agruparam com baixos valores de significância e 7,6% dos alelos presentes são raros. No estudo da variabilidade genética envolvendo 18 populações nativas de *Maytenus ilicifolia* e plantas de *Maytenus aquifolia* e *Maytenus evonymoidis*, pode-se separar as espécies com 100% de confiança e *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* estão mais próximas geneticamente em relação a *M. evonymoidis*. As populações de *Maytenus ilicifolia* analisadas formaram 3 grupos com valores baixos de índice de confiança baixos, sendo o grupo I a população de Ponta Porá, o grupo II as populações de Santana do Livramento, Vale Verde, Canguçu e Unistalda e o grupo III formados pelas 13 populações restantes. Observou-se semelhança no agrupamento genético e ambiental destas populações. No estudo da caracterização química, via cromatografia gasosa dos extratos obtidos por CO₂ a alta pressão, observou-se um acréscimo na eficiência de extração com aumento de temperatura e densidade do solvente. Os compostos ácido dodecanóico, geranil acetona, fitol, Esqualeno, Vitamina E e Stigmast-5-enol foram extraídos em maior concentração nas primeiras frações, independente das condições de extração, enquanto que os compostos Friedelan-3-ol e Friedelin, foram extraídos em maior quantidade nas frações seguintes. Na análise da variabilidade química dos compostos voláteis e semi-voláteis das populações de *Maytenus ilicifolia*). Verificou-se no rendimento de extrato (0,488 a 0,976 %) e concentração dos compostos analisados diferenças significativas entre as populações analisadas e não houve relação entre o agrupamento químico das populações com os agrupamentos ambientais e genéticos.

ABSTRACT

Genetic and chemical variability of *Maytenus ilicifolia*

Maytenus ilicifolia is a native plant of Southern Brazil commonly used as a popular medicine for indigestion, gastritis and ulcers. The large use of this plant has increased the degradation of the species, and thus it is presently included in FAO's list for priority species for studying and conservation in South America. In this context, this work aimed to contribute with studies that help the conservation of this species. Initially, a survey in herbaria and in the field was performed to identify the incidence and distribution of the genus *Maytenus* in the State of Rio Grande do Sul. Three new species (*M. glaucenscens* Reiss, *M. gonoclada* Mart. and *M. robusta* Reiss) were found in this State. The genetic variability study of three populations showed that the intrapopulational variation (variance from 0.102 to 0.140) is higher than the interpopulational (variance between 0.076 and 0.099%). The three populations analyzed grouped themselves with low significance level and 7.6% of the present alleles are rare. The genetic variability study involving 18 native populations of *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolia* and *Maytenus evonymoidis* demonstrated that the species may be separated with 100% of confidence, and that *M. ilicifolia* and *M. aquifolia* are genetically more similar. The populations of *Maytenus ilicifolia* analyzed formed three groups with low confidence levels. Group I included the populations of Ponta Porã, group II the populations of Santana do Livramento, Vale Verde, Canguçu and Unistalda, and group III was formed by the other 13 populations. A similarity in the genetic and environmental grouping of such species was observed. The chemical characterization was performed by gas chromatography of the extracts obtained with high pressure CO₂. An increase in the yield of extract was obtained when the temperature of extraction as well as the solvent density were increased. The compounds that presented higher yield in the first fractions were dodecanoic acid, geranyl acetone, phytol, squalene, vitamin E and stigmast-5-enol. The compounds friedelan-3-ol and friedelin were extracted in higher yields in the following fractions. The chemical variability study of the volatile and semi-volatile compounds of populations of *M. ilicifolia* showed a yield of extract (0,488 a 0,976 %) significantly different between the populations. In addition no relation between the chemical and environmental or between the chemical and genetic grouping could be established.

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reis é uma das 44 espécies de *Maytenus* que ocorrem no Brasil extra-amazônico, sendo uma planta comumente utilizada na medicina popular, sendo conhecida como espinheira-santa, cancarosa, etc. No Brasil, as espécies *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia* são utilizadas popularmente como antiespasmódico, contraceptivo, antiulceroso, diurético, cicatrizante e analgésico. Estudos realizados com animais em laboratório comprovaram seu efeito antiulcerogênico, atribuídos a sua capacidade antioxidante, anti-séptica e cicatrizante.

M. ilicifolia é um subarbusto ou árvore, ramificada desde a base, medindo cerca de 5,0m de altura. Ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados e folhas de margem inteira ou com 1 ou vários espinhos, distribuídos regular ou irregularmente no bordo. Esta planta é encontrada na região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e metade sul do Paraná), sendo que sua ocorrência no estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul é pouco abundante. Preferencialmente encontra-se no sub-bosque das florestas de Araucária, às margens de rios e nos agrupamentos arbóreos (capões) em regiões de Estepes.

Floresce a partir do final do inverno e da primavera, e a frutificação ocorre, principalmente, nos meses de novembro a janeiro. Quanto à sua dispersão natural é classificada como uma espécie zoocórica, sendo dispersa especialmente por pássaros. Nas flores, embora estejam presentes o androceu e o gineceu, há evidências que muitas flores sejam díclinas, por aborto de um dos verticilos, fato este que pode indicar estar havendo uma tendência de transição da bissexualidade para unissexualidade das flores e indivíduos.

Em *Maytenus*, o desenvolvimento da planta é bastante lento, praticamente nulo no inverno, reiniciando o desenvolvimento na primavera, porém somente os ramos maduros do ano anterior irão florescer. O manejo inadequado desta planta e coleta dos ramos, poderá prejudicar a floração e conseqüentemente, a frutificação da planta, diminuindo a capacidade de reprodução.

A ação antrópica, tanto sobre os ecossistemas como a utilização da espinheira-santa com fins medicinais, têm ocasionado uma grande degradação sobre a mesma. Este fato, associado á sua importância medicinal, resultou na entrada desta planta à lista de espécies ameaçadas de extinção da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) como uma das espécies prioritárias para estudo e conservação na América do Sul. Entretanto, a conservação de recursos naturais tem enfoque principal nas culturas agrícolas, pouco tendo sido feito na conservação de espécies nativas. Neste sentido a conservação de plantas medicinais, que vêm sofrendo grande ação antrópica, é extremamente relevante.

Para a conservação e uso sustentável da espécie, são imprescindíveis estudos genéticos e químicos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos o estudo da ocorrência e distribuição do gênero *Maytenus* no estado do Rio Grande do Sul, a análise da variabilidade genética intra e interpopulacional de *Maytenus ilicifolia*, e a determinação das melhores condições de obtenção de extrato via extração em fluido supercrítico, e a identificação dos compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis para análise de diversidade química nestas populações nativas coletadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, visando subsidiar futuros estudos de conservação das espécies deste gênero.

CAPÍTULO 2:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades mundiais. Estima-se que este país abrigue mais de 50 mil espécies distribuídas nos seus biomas (Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Floresta Subtropical). Deste total, apenas uma pequena parcela tem sido estudada quanto ao seu potencial de uso como fármaco. Considerando-se a estimativa de que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais, e poucos são os recursos destinados para pesquisa e conservação das mesmas e a grande ação antrópica com destruição dos ecossistemas, estima-se que no máximo 5% destas plantas serão conhecidas e pesquisadas antes de serem extintas (1, 2).

A Central de Medicamentos – CEME, mantinha desde 1983, o programa de plantas medicinais, sendo que das 61 plantas estudadas, 8 apresentaram resultados positivos, entre estas encontra-se *Maytenus ilicifolia* (3). Estes resultados estimularam o consumo *in natura* destas plantas, colocando em risco estes recursos naturais (4). O cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares seria uma das alternativas para evitar o extrativismo exagerado e o perigo de extinção destas espécies (5). Nestes sentido, cabe lembrar que *Maytenus ilicifolia* já é citada como uma das espécies de ocorrência rara e ameaçadas de extinção (6, 7).

2.1. Gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol.

O gênero *Maytenus* pertence a família Celastraceae, sendo representado no Brasil extra amazônico por 43 espécies, reunidas em duas seções: *Maytenus* Mol. e *Oxyphylla* Loes. A distribuição do gênero *Maytenus* é predominantemente tropical, sendo o Brasil um dos centros de diversidade específica (8). Plantas do gênero *Maytenus* têm sido estudadas e compostos com bioatividade têm sido relatados, como: *M. buchananii* com triterpenos com atividade citotóxica (9); *M. diversifolia* com triterpenos com atividade antileucêmica (10, 11); *M. ilicifolia* com triterpenos com ação citotóxica (12), entre outras. Algumas espécies deste gênero têm tido sua eficiência fitoterápica comprovada para diversos usos tais como, antibiótico (13), anti-cancerígenos (14, 15), anti-reumáticos (15) e antimalárico (16).

Em levantamento realizado por Carvalho-Okano (8), foram identificadas 6 espécies de ocorrência no estado do Rio Grande do Sul, *Maytenus cassineformis* Reiss., *Maytenus*

dasyclada Mart., *Maytenus evonymoidis* Reiss., *Maytenus boaria* Mol., *Maytenus aquifolia* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

No Brasil destacam-se *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia* pelo intenso uso popular, sendo consideradas prioritárias para estudos farmacológicos pela Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (CEME) (17).

2.1.1 *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss (1861)

Normalmente é conhecida por cancorosa ou espinheira-santa, dependendo da região, sendo algumas vezes confundida com *Maytenus aquifolia*. A espécie pertence à seção *Oxyphylla*, que é restrita a América do Sul, concentrando no Brasil o maior número de espécies. Carvalho-Okano (8) estudando o gênero *Maytenus* extra amazônico identificou a região sudeste como o centro primário de diversidade específica de *M. ilicifolia*. Em seu trabalho descreve a espécie *M. ilicifolia* como:

“Subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo cerca de 5,0m de altura. Ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. Folhas congestas, coriáceas, glabras; pecíolo com 0,2-0,5cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 2,2-8,9cm de comprimento e 1,1-3,0 de largura; nervuras proeminentes na face abaxial; forma elíptica ou estreitamente elíptica; base aguda ou obtusa; ápice agudo ou obtuso, mucronado ou aristado; margem inteira ou com espinhos em número de 1 a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na base apical de um ou de ambos os semilimbos. Inflorescências em fascículos multifloros. Pedicelos florais com 0,2-0,5cm de comprimento. Sépalas semicirculares, ciliadas, com cerca de 0,1cm de comprimento. Pétalas ovais, inteiras, com cerca de 0,22cm de comprimento e 0,2cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; ovários saliente ou totalmente imerso no disco carnoso. Fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho-alaranjada”.

M. ilicifolia é encontrada na região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e metade sul do Paraná), a ocorrência no estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul é pouco abundante. Além do Brasil, ocorre também no Uruguai, leste da Argentina, Paraguai e Bolívia. Preferencialmente encontra-se no sub-bosque das florestas de Araucária e às margens de rios (8), e nos agrupamentos arbóreos (capões) em regiões de estepes (17).

A espinheira-santa floresce a partir do final do inverno e da primavera, e a frutificação ocorre, principalmente, nos meses de novembro a janeiro, iniciando pelo estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e por último Paraná (18). Quanto a sua dispersão natural é classificada como uma espécie zoocórica, sendo dispersa especialmente por pássaros (19). Nas flores, embora estejam presentes o androceu e o gineceu, há

evidências que muitas flores sejam díclinas, por aborto de um dos verticilos. A campo observam-se plantas que produzem elevado número de flores e não frutificam ou produzem poucos frutos. Através de observações, Carvalho-Okano (8) sugere que devido à redução dos órgãos reprodutivos, ora do gineceu, ora do androceu, possa estar havendo uma tendência de transição da bissexualidade para unisexualidade das flores em indivíduos desta espécie.

Em *Maytenus*, o desenvolvimento da planta é bastante lento, praticamente nulo no inverno, reiniciando o desenvolvimento na primavera, porém somente os ramos maduros do ano anterior chegam a florescer. O manejo inadequado desta planta e coleta dos ramos, pode prejudicar a floração e conseqüentemente, a frutificação da planta, diminuindo a capacidade de reprodução da mesma.

No Brasil, as espécies *M. aquifolia* e *M. ilicifolia* são utilizadas popularmente como antiespasmódico, contraceptivo, antiulceroso, diurético, cicatrizante e analgésico. Estudos realizados com animais em laboratório (20, 21) comprovaram o efeito antiulcerogênico destas duas espécies, efeito este atribuído ao aumento do volume e pH do suco gástrico (21), a atividade anti-oxidante (22), ao efeito anti-séptico e cicatrizante (3, 23). Diversos compostos estão presentes no extrato, como fenóis, taninos e terpenos (24). Alguns autores atribuem o efeito antiulcerogênico aos triterpenos, entre eles a friedelina e friedelan-3-ol, e polifenóis (25, 26, 27), pois eles possuem a capacidade de aumentar as defesas do organismo, estimulando a síntese de mucos ou mantendo alta a concentração de prostaglandina da mucosa gástrica (28). Esta afirmação, entretanto é contestada por Queiroga (29). França e Pereira (30) listaram substâncias bioativas isoladas de *M. ilicifolia*, entre elas encontra-se o terpeno maintansina (ansamacrolídeo) com atividade antitumor (31); ilicifoliana (triterpenos do tipo friedelano, entre eles friedelin e friedelan-3-ol), triterpenos quinides, cangoroninas e flavonóides com atividade citotóxica (32, 33) e taninos considerados como antiúlcero-gênicos (21).

A falsificação de amostras comercializadas de espinheira-santa é bastante intensa. Trabalhos realizados por Vilegas et al. (25) demonstraram que 60% do material comercializado pertenciam a espécie *Sorocea bomplandi*, cujas folhas se assemelham as da *Maytenus*, porém sem as propriedades medicinais desta última. Este fato indica a pouca disponibilidade de indivíduos para coleta já neste momento, fato que vem se agravado nos últimos anos devido à coleta indiscriminada.

2.1.2 *Maytenus aquifolia* Mart. (1841)

Maytenus aquifolia pertence a família Celastraceae e seção *Oxyphylla* junto com *Maytenus ilicifolia*, sendo ambas muito utilizadas pela população como fitoterápico e muitas vezes confundidas, apresentando inclusive os mesmos nomes populares dependendo da região (espinheira-santa, cancorosa, etc). Apesar de possuírem as folhas parecidas, são facilmente separadas pela forma dos ramos, que são angulosos e carenados em *M. ilicifolia* e cilíndrico achatados em *M. aquifolia* (8).

Têm ocorrência na região sudeste e região Sul do Brasil, encontrando-se predominantemente no sub-bosque, em matas do interior dos estados e com altitude entre 100 e 1000 m e é descrita por Carvalho-Okano (8) como:

“Arbusto ou árvore medindo cerca de 1,5-12m de altura. Ramos novos glabros, cilíndrico-achatados. Folhas cartáceas, glabra; pecíolo com 0,5-1,0cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 6,0-19,0cm de comprimento e 2,0-6,0cm de largura; nervura primária proeminente em ambas as faces; nervuras secundárias subsalientes; forma elíptica ou mais comumente oblongo-elíptica; base aguda ou obtusa; ápice agudo a obtuso com mucron; margem com muitos espinhos, serrada. Inflorescência em fascículos multifloros, pedicelos florais com 0,4-0,7 cm de comprimento. Sépalas ovais com cerca de 0,4cm de comprimento e 0,3cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma sésseis ou com estilete distinto; ovário saliente ou imerso totalmente no disco carnosos. Fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração castanho-avermelhada”.

Estudos têm demonstrado que ambas apresentam uma composição química semelhante e as mesmas propriedades medicinais. Siqueira (34), selecionou na literatura 63 levantamentos da Mata Atlântica, encontrando 2 citações para *M. aquifolia* e nenhum para *M. ilicifolia*, demonstrando a baixa frequência de ocorrência de ambas as espécies.

2.1.3 *Maytenus evonymoidis* Reiss (1861)

Maytenus evonymoidis é amplamente distribuída nas regiões Sul, sudeste e central do Brasil. Sendo descrita por Carvalho-Okano (8) como:

“Arbusto ou árvore medindo até cerca de 15m de altura. Ramos novos angulosos, pubérulos ou densamente pilosos. Folhas subsésseis, membranáceas, glabras na superfície abaxial e com pilosidade lepidota na base abaxial; pecíolo com 0,1-0,2cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo medindo de 3,0-8,0 cm de comprimento e de 1,4-3,0cm de largura; nervura primária saliente em ambas as faces; nervuras secundárias subsalientes na superfície abaxial; forma elíptica ou mais comumente estreitamente elíptica; base cuneada ou atenuada; ápice agudo ou obtuso; margem dentado-crenada. Inflorescência em fascículos multifloros. Pedicelos florais bracteolados na base, medindo de 0,2-0,4cm de comprimento. Sépalas ovais, com cerca de 0,15cm de comprimento. Pétalas obovais, fimbriadas medindo cerca de 0,2cm de comprimento e 0,15 de largura. Estames com filetes achatados na base, de comprimento iguais ou menores que o gineceu. Filetes

eretos, afastados do gineceu ou, filetes curvos em direção ao centro floral, cobrindo o gineceu. Estigma capitado, às vezes bilobado, sésseil ou com estilete distinto. Ovário saliente ou imerso em disco; disco carnosos. Fruto cápsula, bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de cor amarela”.

2.2 Conservação de Recursos Genéticos

O Brasil é considerado um dos países detentores de megadiversidade. Porém o ritmo atual de extinção de plantas é entre 50 e 100 vezes maior que o observado há alguns anos. Mantido o ritmo atual, até o ano 2015, pode-se perder até 8% de todas espécies vivas presentes nas florestas tropicais (35).

A ação antrópica, como a fragmentação dos ecossistemas, os estresses ambientais pela poluição e as mudanças climáticas são apontadas como as principais causas da perda da diversidade genética, de maneira global (36). Além destes fatores, a exploração dos recursos naturais de forma excessiva e não planejada com a destruição acelerada da vegetação natural, por meio da expansão agrícola, das queimadas, exploração madeireira, construção de estradas e hidroelétricas além do extrativismo, têm levado a perda destes recursos (37). Considerando a grande quantidade de espécies medicinais e aromáticas brasileiras, segundo Vieira (37), a maioria das espécies medicinais e aromáticas ainda carece de estudos básicos (taxonomia, genética, fisiologia e biologia reprodutiva), existindo poucos bancos de germoplasma, predominando a existência de coleções com grande número de espécies e baixa representatividade da variabilidade intraespecífica. A conservação de germoplasma, além de preservar a espécie permite o acesso ao material genético para caracterização, domesticação, desenvolvimento de novas variedades e prospecção de genes, revertendo em benefícios para toda sociedade.

Estudos de auto-ecologia relacionados com a área de distribuição geográfica e do habitat preferencial indicam as espécies características e o tipo de macro vegetação e/ou ambiente necessário para cada uma das espécies raras ou ameaçadas de extinção (38). Além disto, a conservação genética das espécies requer estudos considerando a variação genética das espécies e suas propriedades adaptativas com relação ao ambiente em que estão inseridas (39). A presença de variabilidade genética dentro da espécie é que possibilita a adaptação às mudanças ambientais, por isto, a variação genética em populações naturais é importante para identificar os processos microevolucionários (40).

No estudo da genética evolutiva, o conhecimento da estrutura genética das populações oferece evidências da atuação dos diversos fatores ambientais sobre a dinâmica das populações (41), dando subsídios para compreensão dos fenômenos que contribuíram e contribuem para a evolução das espécies.

As populações contêm variações genéticas que surgem através de mutação ao acaso e recombinação, e as populações evoluem por mudanças nas frequências gênicas ocasionadas pela deriva genética aleatória, fluxo gênico e especialmente pela seleção natural. A evolução dos seres vivos compreende a variação individual dentro de uma população, a distribuição e frequência dos indivíduos variantes nas diferentes populações dentro da espécie e a divergência ou especiação progressiva das populações como consequência do somatório de mecanismos de isolamento (42).

2.2.1 Marcadores Moleculares

Desde os anos 60, utilizam-se marcadores como isoenzimas, proteínas totais e proteínas específicas, que são de certa forma indicadores da variação existente em nível de DNA e, mais recentemente, surgiram os marcadores moleculares. As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos que correspondem a regiões expressas ou não do genoma. (43).

A tecnologia de PCR (reação de polimerização em cadeia) é uma técnica versátil pois vários tipos de *primers* podem ser utilizados, dependendo do objetivo do estudo. A técnica foi desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 80 e envolve a síntese enzimática “*in vitro*” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA em presença da enzima DNA polimerase. A reação baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) que flanqueiam a sequência de DNA alvo e os *primers* são sintetizados artificialmente. Um ciclo de PCR envolve a desnaturação da fita dupla de DNA, o anelamento do primer com sequências complementares da região alvo e a extensão da cadeia de DNA a partir de cada terminal 3’ do *primer* através da adição de nucleotídeos, realizado pela DNA polimerase. O ciclo é repetido várias vezes e após 20 ciclos são produzidas mais de um milhão de cópias, permitindo a visualização em gel de eletroforese através de corantes específicos (43).

Inúmeras derivações surgiram a partir da descoberta do PCR, entre elas o RAPD (*Random Amplified polymorphic DNA*), que envolve a amplificação simultânea de vários loci anônimos no genoma, utilizando *primers* curtos (oligonucleotídeo de 10 bases) de

sequência arbitrária. Esta técnica foi desenvolvida por Williams et al. (44), e apresenta a vantagem de não ser necessário um conhecimento prévio do genoma da planta a ser estudada, além de necessitar de pequenas quantidades de DNA e permitir a detecção do polimorfismo com maior eficiência que RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (43). Os marcadores RAPD caracterizam-se como dominantes, sendo um alelo de cada loco visualizado (45).

Em *Maytenus ilicifolia* poucos trabalhos com utilização de marcadores moleculares têm sido publicados. Perecin (16, 46) utilizando marcadores isoenzimáticos estudou cinco populações nativas de *Maytenus aquifolia* nos estados de São Paulo e uma de *Maytenus ilicifolia* de Santa Catarina, observando variabilidade genética compatíveis com as encontradas na literatura para plantas com alta variabilidade genética e a presença de alelos raros nas populações. A diferenciação entre as populações não mostrou estar relacionada com a distância geográfica, com o tipo de floresta nem com o nível de ação antrópica. Assim sendo, concluiu-se que os processos evolutivos que podem estar interferindo, devem estar relacionados à características ligadas ao sistema reprodutivo, baixo níveis de fluxo gênico, baixo tamanho efetivo populacional e efeito fundador. A espécie *Maytenus ilicifolia* compartilhou a presença de muitos alelos com as populações de *Maytenus aquifolia*, indicando uma proximidade filogenética e possível fluxo gênico entre as duas espécies. Este fluxo pode estar acontecendo no momento ou pode ter ocorrido num passado próximo, indicando que estas espécies não estão ou não estiveram completamente isoladas reprodutivamente.

Bittencourt (47), estudando duas populações de *Maytenus ilicifolia* no estado do Paraná (Lapa e Guarapuava) com RAPD, analisou 52 fragmentos, com média de 7,42 fragmentos por *primer*, sendo que destes, 44 são polimórficos. O dendrograma baseado no índice de Jaccard permitiu a separação em quatro grupos, porém com baixos índices de confiança. Os índices de similaridade intrapopulacionais variaram de 42 a 85% para a população de Guarapuava e entre 51 a 96 % para a população da Lapa.

2.3. Metabólitos Secundários

Os constituintes químicos no reino vegetal são sintetizados e degradados por inúmeras reações metabólicas, sendo a síntese de compostos essenciais para a

sobrevivência das espécies vegetais chamado de metabolismo primário e os compostos que aparentam não ter grande utilidade na planta de metabolismo secundário (48).

Embora qualquer tecido tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, este processo só ocorre em alguns tecidos ou células especiais, e a produção pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento vegetal ou determinada condições ecológicas e ambientais (49). Existem três pontos de origem e produção de compostos secundários, dependendo dos seus precursores: ácido chiquímico como precursor de inúmeros compostos aromáticos, aminoácidos como fonte de alcalóides e peptídeos e acetato que através de duas rotas biossintéticas originam compostos como acetatos, terpenos, esteróides e outros (50).

Quando os compostos secundários presentes nas plantas exercem algum efeito fisiológico de propriedade terapêutica se costuma isolá-los e denominá-los de princípio ativo. O princípio ativo de uma planta medicinal pode ser um composto ou um conjunto de compostos que interagem e proporcionam o efeito desejado (51).

Os triterpenóides quinonemetide são metabólitos secundários restritos as famílias, Celastraceae e Hippocrateaceae, e a co-ocorrência com friedelans foi constatada. Estes compostos tem demonstrado uma variada gama de atividades biológica como antitumoral, antimicrobiana, antibiótica, antimalarial e atividades espermicidas. (52)

Em *Maytenus ilicifolia* foram observadas a presença de iodo, enxofre, fósforo, sódio, cálcio, tanino, corante, mucilagem, resina aromática e cêra (53). Silva (33), encontrou diferentes concentrações de polifenóis totais e taninos em plantas de diferentes regiões do Paraná. Grande parte dos estudos fármaco químicos têm abordado a presença de substâncias pertencentes a classe dos terpenos (maitansinóides, primestrina, amirin, friedelin, friedelan-3-ol, lupeol, taraxerol, entre outros) (54, 32, 55). Corsino (52), estudando a biosíntese de tripernóides (quinonemetidinas e friedelans) em *Maytenus aquifolium* e *Salacia campestris*, constatou que os friedelans são produzidos nas folhas a partir do squaleno e; posteriormente; translocados até as raízes e transformados em quinometidinas com atividade antitumoral, o autor constatou a presença de derivados de friedelan (3β -friedelanol e friedelin) exclusivamente nas folhas e as quimitidinas (maytenina e pristimerina) como constituintes majoritários das raízes com mais de 0,2% e ausentes nas folhas.

Radomski (4), estudando uma população de *Maytenus ilicifolia* no município de Lapa no Paraná, concluiu que a luminosidade foi o principal fator ambiental, responsável

pelas diferenças observadas nas variáveis analisadas em folhas e ramos de *M. ilicifolia*. O peso específico de 100 folhas foi maior nas plantas crescendo a pleno sol, os teores foliares de N, K, B e Si variaram entre os ambientes, principalmente em função da intensidade luminosa, tendo sido observadas correlações negativas entre estes elementos e a disponibilidade de luz. Para P, Mn e Cu as diferenças observadas entre os ambientes indicam uma possível interação entre solo e luminosidade na absorção destes elementos. Já os teores de Ca, Mg, Fe, Al e Zn não apresentaram diferenças entre os ambientes. Os teores de polifenóis totais, polifenóis não tanantes e taninos variaram entre os ambientes, sendo maiores nas plantas crescendo a pleno sol. O aumento na concentração dos polifenóis foi diretamente influenciado pelo aumento da intensidade luminosa, somado à baixa disponibilidade de nutrientes do solo.

A cromatografia a gás (GC), amplamente utilizada para a análise de compostos voláteis, moléculas orgânicas complexas, pesticidas, etc, é uma técnica de separação cromatográfica que fornece um meio rápido e fácil para determinar o número de componentes de uma mistura, a presença de impurezas em uma substância e, muitas vezes, o esclarecimento em uma primeira aproximação, sobre a identidade de um composto, sendo extremamente sensível e de aplicabilidade praticamente universal (56).

A espectrometria de massas (MS) é basicamente uma técnica em que os íons obtidos de uma substância, em geral orgânica, se separam segundo sua relação de massa e carga iônica, dando lugar, uma vez registrados de forma adequada, ao espectro de massas característico da substância. Os resultados registrados, em geral por um multiplicador eletrônico, são visualizados como um “espectro de massas”, que representa graficamente em função de seus valores respectivos de massa e carga. Estes resultados podem ser calculados como as relações da abundância e intensidade de cada massa/carga, em função do pico mais alto, atribuindo-lhe o valor arbitrário de 100, ou como percentual da soma total das intensidades de todos os íons a partir de um valor também arbitrário de massa/carga (56).

A utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), transforma o conjunto das duas técnicas na melhor ferramenta de separação e identificação dos constituintes de uma mistura complexa. Nesta técnica, a amostra é injetada no cromatógrafo a gás e o material eluído é continuamente bombardeado por um feixe de elétrons, obtendo-se assim, o espectro de massas de cada pico cromatográfico, o qual comparado com uma biblioteca de espectros, permite a identificação do composto (56).

Cordeiro (55) identificou em *Maytenus ilicifolia*, friedelin, friedelan-3-ol, vitamina E, simiarenol, lupeol, lupenone, β -amidrin, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, esqualeno e ácido hexadecanóico, através do acoplamento da cromatografia gasosa de alta resolução e espectrometria de massas.

Vários compostos tais como taninos, terpenos do tipo maitesina, maitomprina, maitambutina e maitolidina, flavonóides, antocianos e mucilagens, além dos triterpenos friedelin, friedelan-3-ol, friedelan-3-one, entre outros, foram identificados em espinheira-santa. Porém ainda não se sabe com certeza qual o princípio ativo ou conjunto deles, que confere a potente ação antiulcerogênica desta planta. Compostos como o friedelan-3-ol e friedelin já foram identificados em *Maytenus ilicifolia*, com auxílio da cromatografia gasosa, em estudos como marcadores na identificação de adulterantes em *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolia* (25), e no efeito do uso de fertilizantes nas características morfológicas e produção de metabólitos secundários (Friedelan e Friedelina-3-ol) em *Maytenus aquifolia* (57).

2.4. Fluidos Supercríticos

O processo de extração é fundamental para obtenção de compostos e análise química em vegetais, os métodos mais utilizados atualmente são o arraste com vapor d'água, extração com solventes e mais recentemente o fluido supercríticos (FSC).

A utilização de fluidos supercríticos (FSC) foi reportada pela primeira vez trabalho de Hannay e Hogarth (58) no encontro da Royal Society of London em 1879, no qual é descrita uma de suas habilidades: dissolver materiais sólidos de baixa volatilidade. Porém, somente a partir da década de 70, os FSC tornaram-se alvo de maior interesse por parte da comunidade científica.

Os FSC encontram aplicações nos mais variados campos da Ciência e Tecnologia, tais como: processamento de alimentos, polímeros, surfactantes, fármacos e efluentes.

Os pesquisadores apontam a extração com fluido supercrítico (ESC) como um dos processos de separação do século XXI, pois o processo combina características de destilação (separação baseada em diferenças de volatilidade entre os componentes) e de extração com solventes (separação utilizada para componentes com pequena diferença de volatilidade ou que sejam termolábeis) (59).

Observando o diagrama pressão crítica (Pc) x Temperatura crítica (Tc) de uma substância pura, apresentado na **Figura 1**, pode-se visualizar três partes distintas: a linha que

corresponde a sublimação, que vai até o ponto comum entre as três fases (ponto triplo); a bifurcação a partir deste ponto origina a linha de fusão e a linha de vaporização. O avanço na linha de vaporização conduz a existência de um outro ponto, conhecido como ponto crítico.

Uma substância, que esteja a uma temperatura superior a T_c , encontra-se num estado denominado supercrítico e nesta condição, por maior que seja a pressão imposta à substância, não é possível liquefazê-la. A região de fluido supercrítico no diagrama Pressão x Temperatura representa a região de interesse da ESC.

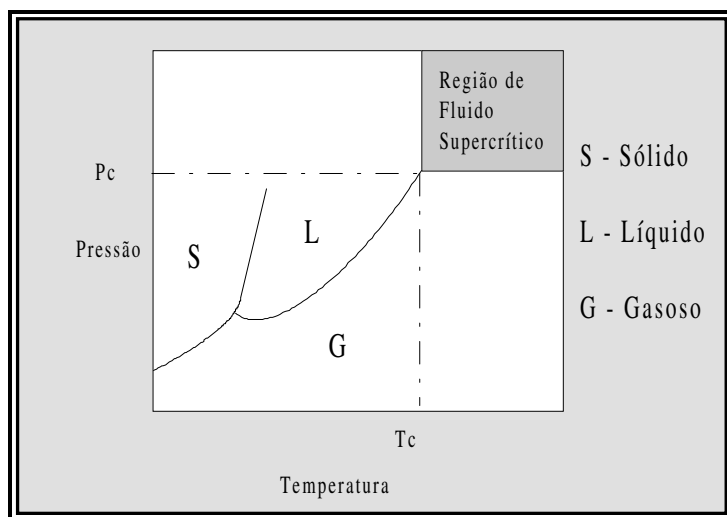


Figura 1. Diagrama Pressão x Temperatura para uma substância pura (59).

A **Tabela 1** apresenta a temperatura crítica (T_c), pressão crítica (P_c) e massa específica crítica (ρ_c) de alguns compostos comumente empregados como solventes na ESC.

Tabela 1. Temperatura crítica, pressão crítica e massa específica crítica de alguns solventes aplicáveis a ESC (59).

| Solvente | T_c (K) | P_c (bar) | ρ_c (g.cm ⁻³) |
|-----------------|-----------|-------------|--------------------------------|
| CO ₂ | 304,1 | 73,8 | 0,468 |
| Etileno | 282 | 50,3 | 0,218 |
| Etanol | 513,9 | 61,4 | 0,276 |
| Etano | 305 | 48,8 | 0,203 |
| Água | 647 | 220 | 0,322 |

Observando a **Tabela 2**, nota-se que um fluido supercrítico apresenta valores das propriedades físicas numa posição intermediária entre um gás e um líquido. A densidade é mais próxima à de líquidos e 1000 vezes maior que a de gases, a difusividade é intermediária e a viscosidade é próxima a de gases. A combinação destas propriedades proporciona um maior poder de penetração em matrizes porosas e a conseqüente solubilização de solutos, bem como maior facilidade para o transporte de massa devido à característica de difusividade.

Tabela 2. Propriedades físicas e de transporte de uma substância pura (59).

| ESTADO | Massa Específica (g.cm ⁻³) | Difusividade (cm ² .s ⁻¹) | Viscosidade (g.cm ⁻¹ .s ⁻¹) |
|--------------|---|---|---|
| Gás | (0,6 - 2,0) x 10 ⁻³ | 0,1 - 0,4 | (1,0 - 3,0) x 10 ⁻⁴ |
| Supercrítico | 0,2 - 0,5 | 0,7 x 10 ⁻³ | (1,0 - 3,0) x 10 ⁻⁴ |
| Líquido | 0,6 - 1,6 | (0,2 - 2,0) x 10 ⁻⁵ | (0,2 - 3,0) x 10 ⁻² |

A **Figura 2** ressalta uma característica peculiar aos fluidos supercríticos: pequenas variações na temperatura e/ou pressão nas proximidades do ponto crítico causam grandes variações em densidade e, conseqüentemente, no poder solvente do fluido supercrítico, permitindo desta maneira extrair seletivamente compostos de interesse.

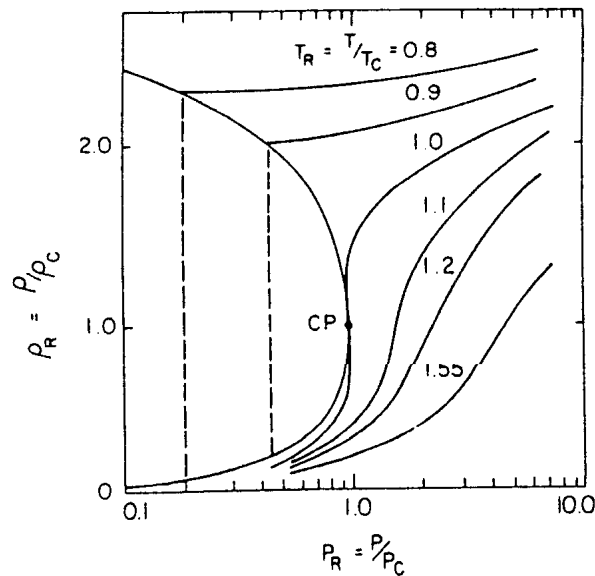


Figura 2. Diagrama característico $\rho_R \times P_R$ de uma substância pura (59).

Uma típica unidade de ESC é esquematicamente apresentada na **Figura 3**, contendo os seguintes componentes básicos: um extrator, uma bomba de alta pressão, uma válvula de expansão e um vaso separador.

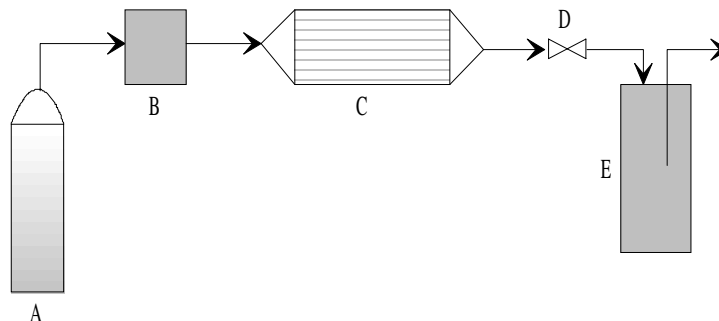


Figura 3. Esquema representativo de um processo de extração supercrítica (48), composto por: (A) cilindro sifonado do solvente, (B) bomba de alta pressão, (C) extrator, (D) válvula de expansão e (E) tubo coletor.

O processo, simplificadamente, consiste em bombear o solvente ao extrator numa pressão estabelecida, permitindo que o mesmo entre em contato com a matriz porosa e ocorra o processo de solubilização. Retira-se a mistura (soluto e solvente) do extrator, que passa por uma válvula de expansão, sendo coletada num vaso separador normalmente à temperatura ambiente, onde o soluto se deposita e o solvente separa-se naturalmente, podendo o último ser reaproveitado. Este processo é interrompido quando não se nota mais alteração da massa de soluto no vaso separador. Pode-se dizer que a escolha do solvente consiste num passo fundamental na ESC. A ESC é um processo de separação que basicamente manipula a densidade e através desta pode ser seletiva e promover maiores rendimentos.

Em se tratando de produtos naturais o solvente necessita ser não tóxico, evitando contaminações do produto, de fácil separação, inerte e possuir uma temperatura crítica amena para evitar degradação. O dióxido de carbono atende aos itens acima e tem sido eleito pelos pesquisadores para aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica.

Diversos trabalhos de extração por fluido supercrítico são encontrados na literatura (60, 61, 62, 63), o efeito de tamanho de partícula da amostra, temperatura e pressão são fatores que normalmente influenciam no processo. Coelho *et al.* (64), observaram que os compostos com menor peso molecular são extraídos no início do processo. Estudos realizados por Simándi *et al.* (65), constataram que a extração por FSC é eficiente e seletiva para os triterpenos β -amyrin e β -sitosterol, quando comparado com a extração por soxhlet. Este mesmo trabalho obteve

incremento positivo na extração deste triterpenos com aumento da temperatura e densidade do solvente supercrítico. Estudos realizados por Lanças et al.(66), demonstraram ocorrer um incremento na extração de friedolen-3-ol e friedelin em *Maytenus ilicifolia* com a utilização de co-solventes, porém somente estes triterpenos foram analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- HAMANN, O. The joint IUCN-WWF plants conservation programme and its interest in medicinal plants. In: RADOMSKI, M. I. **Caracterização Ecológica e Fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em Populações Nativas, no Município de Lapa-Paraná.** 1998, 98p. Tese (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 2- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje.** 11(61):17-20, 1990.
- 3- CARLINI, E.A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp. (espineira-santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E. A., **Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras.** Central de Medicamentos, CEME/AFIP, 1998. Brasília 128p.
- 4-RADOMSKI, M. I. **Caracterização Ecológica e Fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em Populações Nativas, no Município de Lapa-Paraná.** 1998, 98p. Tese (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 5- CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas.** Jaboticabal, FUNEP, 1994. 162p.
- 6- SEMA/GTZ- SECRETARIA DE ESTADO E MEIO AMBIENTE/DEUTSCHE GESELLSCHATF FUR TECHNISCHE ZUSAMMERNARBEIT. **Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná.** Curitiba, SEMA/GTZ, 1995. 139p.
- 7- CREA-CONSELHO REGIONAL DE ENGENHARIA E ARQUITETURA. Ervas que dão lucro. In: BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD.** 2000, 58 p. Tese (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- 8- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-amazônico.** 1992. 252 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 9- KUTNEY, J. P.; BEALE, M. H.; SALISBURY, P. J.; STUART, K. L.; WORTH, B. R.; TOWNSLEY, P. M.; CHALMERS, W. T.; NILSSON, K.; JACOLI, G. G. Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of *Maytenus buchananii*. **Phytochemistry**. 20(4):653-657, 1981.
- 10- NOZAKI, H.; SUZUKI, T.; KASAI, R.; RONG-YANG, W.; KUO-HSIUNG, L. Antitumor triterpenes of *Maytenus diversifolia*. **Phytochemistry**. 25(2):479-485, 1986.
- 11- NOZAKI, H.; MATSUURA, Y.; HIRONO, S.; KASAI, R.; CHANG, J. J.; KUO-HSIUNG, L. Antitumor agents, 116. cytotoxic triterpenes from *Maytenus diversifolia*. **Jornal of Natural Products**. 53(4):1039-1041, 1990.
- 12- ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**. 30(11):3713-3716, 1991.
- 13- GONZALES, A. G.; ALVARENGA, N. L.; RAVELO, A. G.; JIMENEZ, I.A.; BAZZOCHI, I. L.; CANELA, N. J.; MUOJIR, L. M. Antibiotic phenol nor-triterpenes from *Maytenus canariensis*. **Phytochemistry**. 43 (1):129-132, 1992.
- 14- SEKAR, K. V. S. CAMPAGNE, J. M. SNEDEN, A. T. Benzoyl-5-deacetylwilforidine: a new sesquiterpene nicotinoyl alkaloid from *Maytenus buchananii*. **Planta-Medica**. 62(4):368-370, 1996.
- 15- SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Structures of Xuxuarines, setereiosomeric triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. **Tetrahedron**. 51(4):1107-1120, 1995.
- 16- 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**. 39(12):2606-2609, 1995.
- 17- PERECIN, M. B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae).** 2000, 133 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- 18- SCHEFFER, M. C.; ARAUJO, A. J.; SANTOS, E. P. dos. Estudos da variação em populações e progênies de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) – resultados preliminares. In: INTERNATIONAL CONGRESS AND EXHIBITION ON FORST (5:1999, Curitiba). Rio de Janeiro: Biosfera, 1999. CD Rom.
- 19- TABARELLI, M.; VILLANI, J. P.; MANTOVANI, W. Estrutura e composição florística e dinamismo de uma floresta secundária na Encosta Atlântica. In: 1º CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO e 7º CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 1993, Curitiba. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, p. 340-343.
- 20- SOUZA-FORMIGONI, 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**, 34(1):21-27, 1991.
- 21- OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34(1):29-41, 1991.
- 22- MELO, F. S.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F. da; SILVA, C. R. da; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; CALDEIRA, A. de A.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 496(1):33-38, 2001.
- 23- SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONERI, R. **Plantas Mediciniais: herbarium, Flora et Scientia**. Curitiba, 1987. 160p.
- 24- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. de O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cell. **Genetics and Molecular Biology**. 25(1):85-89, 2002.
- 25- VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C.. High resolution gas chromatography analysis of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. **Phytotherapy Research**. 8(4):241-244, 1994.

- 26- VILEGAS J. H. Y.; LANÇAS, F.H.; ANTONIOSI-FILHO, N. R. High-temperature capillary GC analysis of phytopreparations of espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant. **Chromatographia**. 40(5/6):341-344, 1995.
- 27- PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S.; CERDEIRA, R.M.M.; RODRIGUES, D.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; FRANÇA, S. C. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia*. **Acta Horticulturae**. 333:205-210, 1993.
- 28- LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: Ellis, G.P., **Progress Medicinal Chemistry**, Elsevier Science Publisher, 28:201-231, 1991.
- 29- QUEIROGA, C. L.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J, E. de. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 72:465-468, 2000.
- 30- FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Espinheira-santa: do estudo a viabilização de um fitoterápico brasileiro contra úlcera gástrica. **Revista Racine**. São Paulo, set./out./nov., 67-69, 1997.
- 31- FOX, B. W. Medicinal plants in tropical medicine: Natural products in cancer treatment from bench to the clinic. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 85(1):22-25, 1991.
- 32- ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H. TAKEYA, K. Cangorins F-J, five additional oligo-nicotinated sesquiperpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**. 57 (4):460-470, 1994.
- 33- SILVA, C.G.; RECIO, R. A .; BRAGA DE OLIVEIRA, A .; PAIVA, R.L.R. Coleta e avaliação da qualidade fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* M. (Espinheira-santa). **Tribuna Farmacêutica**. 57/59:46-50, 1991.
- 34- SIQUEIRA, M. **Análise florística e ordenação de espécies arbóreas da Mata Atlântica através de dados binários**. 1994. 143 p. Tese (Mestrado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 35- NODARI, R. O.; GUERRA, M.P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: SIMÕES C. M. O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000, cap. 2, p. 25-38.
- 36- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série Técnica **IPEF**. 12(32):65-70, 1998.

- 37- VIEIRA, R.F. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras: um desafio para o futuro. **Acta Horticulturae**. 569:61-68, 2002.
- 38- REIS, A. **Manejo e Conservação de Florestas Catarinenses**. 1993, 137p. Tese (Professor Titular), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 39- BARNES, B. V. ZAK, D. R.; DENTON, S. R.; SPURR, S. H. **Florest Ecology**. 4 ed. New York. J. Wiley & Sons, 1998. 753p.
- 40- ARNOLD, M.L.; EMMS, S. K. Moleculares markers, gene flow and natural selection. In: BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. 2000, 58 p. Tese (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 41- JAIN, S. K. Estimation of outcrossing rates: some alternative procedures. **Crop Science**. 19:23-26, 1979.
- 42- FUTUYAMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1002, 631p.
- 43- FERREIRA E. M.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998, 220p.
- 44- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**. 18:6531-6535, 1990.
- 45- MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 139p.
- 46- PERECIN, M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de espinheira-santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss e suas implicações para o manejo da conservação. **Rev. Brasileira Planta Médica**. 4(2):80-90, 2002.
- 47- BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. 2000, 58 p. Tese (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 48- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont, Wadsworth Inc., 1992. 682p.

- 49- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000 p. 323-354.
- 50- MANN, J. **Secondary Metabolism**. 2º ed Oxford: Clarendon, 1987. 374 p.
- 51- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia**. São Paulo, Editorial Premier, 1997. 372p.
- 52- CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F. de; KATO, L. R. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. da S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**. 55:741-748, 2000.
- 53- STELLFELD, C. A. A espinheira-santa: contribuição ao estudo farmacognóstico. In: RADOMSKI, M. I. **Caracterização Ecológica e Fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em Populações Nativas, no Município de Lapa-Paraná**. 1998, 98p. Tese (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 54- LIMA, O G. de; BARROS COELHO, J. S. de; WEIGERT, E.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; ANDRADE LIMA, D. de; MORAES E SOUZA, M. A de. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores - Sobre a presença de maitenina e pristimerina na parte cortical das raízes de *Maytenus ilicifolia*, procedente do Brasil Meridional. **Revista do Instituto de Antibióticos**. 11(1):35-38, 1971.
- 55- CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F.M. HRGC-MS Analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (Espinheira Santa). **J. Braz. Chem. Soc.** 10(6):523-526, 1999.
- 56- NASCIMENTO FILHO, I. **Estudos de Compostos Orgânicos em Lixiviados em Aterro Sanitário**. 2002,149f. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química da UFRGS, Porto Alegre.
- 57- PEREIRA A. M. S.; MENEZES, A. Jr.; PEREIRA, P. S.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C.; LILEGAS, J. H. Y.; CORDEIRO, P. J. M.; LANÇAS, F. M. Effect of fertilization on morphologic characteristics and secondary metabolites of *Maytenus aquifolium* Mart. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. 3(2):43-50, 1995.
- 58- HANNAY, J.B. AND HOGARTH, J. In: McHUGH, M.; KRUKONIS, V. **Supercritical and Fluid Extraction: principles and practice**. Boston, Butterworth Publishers, 1986. 364p.

- 59- COELHO, L. A. F. **Extração supercrítica de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*: dados experimentais, modelagem do processo e predição da solubilidade.** 1996, 189p. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- 60- DAUKSA, E.; VENSKUTORIS, P. R.; SIVIK, B. Supercritical fluid extraction of borage (*Borago officinalis* L.) seeds with pure CO₂ and its mixture with caprylic acid methyl ester. **Journal of Supercritical Fluids.** 22:211-219, 2002.
- 61- SALDANHA, M. D. A.; ZETZL, C.; MOHAMED, R. S.; BRUNNER, G. Extraction of methylxanthines from guaraná seeds, mate leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. **J. Agric. Food Chem.** 50:4820-4826, 2002.
- 62- CATCHPOLE, O. J.; PERRY, N. B.; SILVA, B. M. T. DA; GREY, J. B.; SMALLFIELD, B. M. Supercritical extraction of herbs I: Saw palmetto, St John's Wort, Kava Root, and Echinacea. **Journal of supercritical fluids.** 22:129-138, 2002.
- 63- LUCAS, A. DE; MARTINEZ DE LA OSSA, E.; RÍNCON, J.; BLANCO, M. A.; GRACIA, I. Supercritical fluid of tocopherol concentrates from olive tree leaves. **Journal of Supercritical Fluids.** 22:221-228, 2002.
- 64- COELHO, L. A. F.; OLIVEIRA, J. V. DE; D'ÁVILA, S. G. The effects of temperature and solvent density on the characteristics of the extracts from SCFE of Rosemary oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** 13:51-62, 1996.
- 65- SIMÁNDI, B.; KRISTO, SZ. T.; KÉRY, Á.; SELMECZI, L. K.; KMECZ, I.; KEMÉNY, S. Supercritical fluid extraction of dandelion leaves. **Journal of Supercritical Fluids.** 23:135-142, 2002.
- 66- LANÇAS, F. M.; VILEGAS, J. H. Y.; VASCONCELOS, E. C.; CELEGHINI, R. M. S. Novas aplicações do sistema SFE "home made". I. Plantas medicinais Brasileiras. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 4:413-417, 1997.

CAPÍTULO 3:

LEVANTAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Maytenus* NO RIO GRANDE DO SUL.

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**. 569:29-32, 2002.

LEVANTAMENTO DA DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Maytenus* NO RIO GRANDE DO SUL.

A. J. Mossi, R. S. Zanatta, O. Leontiev-
Orlo, R. L. Cansian.

Laboratório de Biotecnologia Vegetal
Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões, Erechim, Rio
Grande do Sul, Brasil. CEP 99700-000

amosi@uri.com.br

L. T. S. Gerald

Laboratório de Biotecnologia Vegetal

Universidade Federal de São Carlos

Araras, São Paulo, Brasil.

CEP 13.600-970

Resumo

Este trabalho discute a distribuição do gênero *Maytenus* nas diferentes regiões ecogeográficas do estado do Rio Grande do Sul. O levantamento foi realizado em 13 herbários com 310 exsicatas de onde foram anotados o número da exsicata, data e local de coleta, nome e número do coletor, fenologia e outras observações. Também foram realizadas visitas a campo. Além das seis espécies de *Maytenus* mencionadas no levantamento realizado por Carvalho-Okano (*M. Cassineformis* Reiss., *M. dasyclada* Mart., *M. evoymoidis* Reiss., *M. boaria* Mol., *M. ilicifolia* Mart ex Reiss. e *M. aquifolia* Mart), três outras novas espécies foram encontradas, *M. glaucescens* Reiss, *M. gonoclada* Mart. e *M. robusta* Reiss.

Palavras chave: *Maytenus ilicifolia*, Plantas Medicinais, Conservação de germoplasma, Banco genético.

1. Introdução

Espécies pertencentes ao gênero *Maytenus* são utilizadas na medicina popular, especialmente nos países menos desenvolvidos, sendo uma importante fonte de medicamento para estas populações. Diversos compostos e atividades farmacológicas já foram determinadas neste gênero, entre estes, podemos citar, a maytesine e maytenine com atividade anti-tumoral (Englert *et al.*, 1973; Nozaki *et al.* 1990); o 4-O-metilepigalocatequina (Oliveira *et al.*, 1991), friedelina e friedelan-3-ol (Pereira *et al.*, 1993) com atividade antiulcerogênica, entre outras. Segundo Heywood (1978), citado por Carvalho-Okano (1992), o gênero *Maytenus* pertence à família Celastraceae, sendo 77 espécies citadas para a flora Brasileira. O Rio Grande do Sul está situado (Figura 1), no extremo meridional do Brasil, na porção sudeste da América do Sul, ao sul do trópico de capricórnio, enquadrado pelos paralelos 27° 03' 42" e 33 ° 45' 09" de latitude sul e 49° 42' 41" e 57° 40' 57" de longitude oeste (Vieira, 1984). Segundo Fortes com modificações (1959), o Estado do Rio Grande do Sul está dividido em 9 regiões fisiográficas, segundo suas características climáticas, geológicas, de relevo do solo, vegetação e obedecendo aos limites municipais. Sendo denominadas (Figura 2): Litoral (1), Depressão Central (2), Missões (3), Campanha (4), Serra do Sudeste (5), Alto Uruguai (6), Campos de Cima da Serra (7), Planalto Médio (8) e Encosta do Nordeste (9). Na classificação de Koeppen, o estado do Rio Grande do Sul enquadra-se na zona temperada moderada chuvosa(C), com o tipo climático fundamental temperado úmido (Cf) com chuvas igualmente distribuídas todo ano. As isotermas dos meses mais quentes delimitam as áreas climáticas "Cfa" com média superior a 22°C e "Cfb" inferior a 22°C, sendo "Cfa1" a região com temperatura média anual inferior a 18°C e "Cfa2", superior a 18°C, (figura 3), (Moreno, 1961). Segundo Justus (1986), podemos dividir o estado em quatro províncias geomorfológicas (figura 4), planalto basáltico, depressão central, escudo cristalino e planície costeira. Segundo a classificação proposta pelo projeto Radambrasil, baseada em Ellenberg e Mueller-Dombois, são reconhecidos os tipos vegetacionais do tipo vegetação florestal (floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista, floresta estacional semidecidual, floresta estacional decidual), vegetação não florestal (savana, estepe, savana-estépica, formações pioneiras) e

áreas de tensão ecológica, conforme figura 5 (Veloso et al., 1991). Para o Rio Grande do Sul são citadas por Carvalho-Okano (1992) seis espécies de *Maytenus* (*M. aquifolia*, *M. cassineformis*, *M. dasyclada*, *M. evonymoidis*, *M. boaria* e *M. ilicifolia*). O objetivo deste trabalho é determinar a ocorrência de espécies deste gênero dentro do Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição biogeográfica.

2. Material e Métodos

Para revisão em herbários foram coletadas as informações constantes nas fichas das exsicatas, sendo elaborada uma ficha com informações da sigla do herbário de procedência, número da exsicata, local e data de coleta, nome e número do coletor, fenologia e outras observações. Os herbários revisados foram: Herbário BLA (Fepagro – POA), Herbário CNPO (EMBRAPA – Bagé), Herbário HAS (Fundação Zoobotânica – POA), Herbário HDCF (UFSM – Santa Maria), Herbário HERBARA (URI – Erechim), Herbário HUICS (UCS – Caxias do Sul), Herbário HURG (FURG – Rio Grande), Herbário ICN (UFRGS – POA), Herbário MPUC (PUCRS – POA), Herbário ANCHIETA (UNISINOS – São Leopoldo), Herbário PEL (UFPEL – Pelotas), Herbário SMDB (UFSM – Santa Maria) e Herbário URG (PUCRS – Uruguaiana). Realizaram-se saídas a campo, conferindo as informações duvidosas, determinando acessos, marcando e identificando plantas e coletando sementes para produção de mudas e conservação de *Maytenus ilicifolia* em área da Universidade. Depois de obtidas as informações elaboraram-se os mapas com a distribuição das espécies.

3. Resultados e discussão

Para realização dos estudos revisaram-se 310 exsicatas pertencentes a 13 Herbários localizados no Estado do Rio Grande do Sul. Neste levantamento, além das seis espécies de *Maytenus* citadas por Carvalho-Okano (1992), foram encontradas três novas espécies para o estado, sendo elas: *M. glaucescens*, *M. gonoclada* e *M. robusta*. Estas três espécies são citados por Carvalho-Okano (1992), ocorrendo nos Estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro. Apesar da limitação das informações obtidas em herbários, verificou-se

que a distribuição destas espécies não ocorre de maneira similar, algumas espécies são de ocorrência mais restrita, como *M. evonymoidis*, *M. gonoclada*, *M. glaucescens* e *M. robusta*, enquanto outras como *M. aquifolia*, *M. dasyclada* e *M. ilicifolia*, apresentam uma ampla distribuição pelo estado. A distribuição pode ser acompanhada com mapa das Regiões Agroecológicas do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 2). Neste levantamento foram encontradas plantas de *M. cassineformis* nas regiões 1,2,3,4,5 e 6, percebendo-se uma certa correlação com regiões de clima do tipo Cfa, sendo que *M. boaria* teve ocorrência nas regiões 7 e 9 que apresenta predominantemente clima do tipo Cfb. *M. ilicifolia* apresentou uma ampla distribuição no estado com exceção do litoral, o que já era esperado pela sua ocorrência em outras regiões do Brasil e Uruguai. *M. dasyclada* apresentou também uma ampla distribuição, porém, é encontrada junto à vegetação do tipo florestal (Figura 5), estando predominantemente na borda ou interior das matas. *M. aquifolia* apresenta uma ampla distribuição na região norte do estado, pois ocorre em diversas regiões do Brasil, mas deve ser uma espécie pouco comum no estado pois apresenta poucas exsicatas nos herbários. As demais espécies apresentam uma distribuição restrita, sendo encontrada *M. evonymoidis* na região 2, *M. gonoclada* nas regiões 2 e 7, *M. glaucescens* na região 8 e *M. robusta* na região 2. Porém, deve-se levar em conta que estas espécies, por despertarem até o momento pouco interesse, apresentam uma quantidade restrita de material nos herbários. Um levantamento mais profundo e completo é de grande importância, pois as informações sobre as diversas espécies de *Maytenus* ainda são restritas, tendo em vista o enorme potencial farmacológico destas espécies. Além destes estudos estão sendo realizadas coletas de sementes, especialmente *Maytenus ilicifolia* para formação de um banco de germoplasma, que atualmente já conta com sementes e mudas de 68 plantas matrizes que estão sendo mantidas em área da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, campus de Erechim.

Agradecimentos

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), FEPAGRO e a EMATER.

4. Referencias Bibliográfica

CARVALHO-OKANO, R.M., 1992. Estudos Taxonômicos do gênero *Maytenus* MOL. Emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil Extra-Amazônico. Tese de Doutorado, Unicamp. Campinas, São Paulo, Brasil.

ENGLERT, C.; KLINGA, K.; HAMET, R. SCHLITTLER, E.; VETTER, 1973. W. Die Struktur von Maytenin. Helvetica chimica Acta. (56):474-478.

FORTES, A. B., 1959. Geografia física do Rio Grande do Sul. Globo. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. 393p.

JUSTUS, J.O., MACHADO, M.L.A., FRANCO, M.S.M., 1986. Geomorfologia. In: Levantamento de recursos naturais. IBGE. Rio de Janeiro, Brasil. V.33, p.313-404.

MORENO, J.A., 1961. Clima do Rio Grande do Sul. Secretaria da Agricultura. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. 42p.

NOZAKI, H.; MATSUURA, Y.; HIRONO, S. KASAI, R.; CHANG, J.J.; LEE, K.H., 1990. Antitumor agents, 116. Cytotoxic triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. J. Nat. Prod., 53(4): 1039-1041.

OLIVEIRA, M.G.; MONTEIRO, M.G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V.P.; CARLINI, E.A., 1991. Pharmacologic and toxicologic effects of *Maytenus* species in laboratory animals. J. Ethnopharmacol., 34(1):29-41.

PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P.S.; CERDEIRA, R.M.M.; RODRIGUES, D.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; FRANÇA, S.C., 1993. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia*. Acta Horticulturae, (333), 205-210.

VELOSO, H.P., RANGEL-FILHO, A.L.R., LIMA, J.C., 1991. Classificação da vegetação Brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE. Rio de Janeiro, Brasil. 123p.

VIEIRA, E. F., 1984. Rio Grande do Sul: geografia física e vegetação. Sagra. Porto Alegre, Rio Grande do Sul Brasil. 256p.

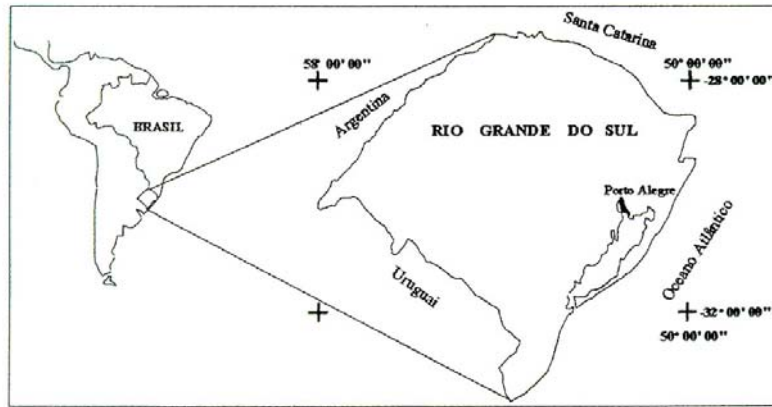


Figura 1. Localização do Estado do Rio Grande do Sul

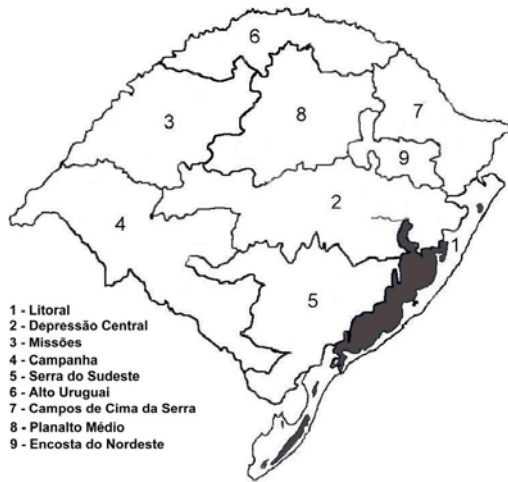


Figura 2. Regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul.

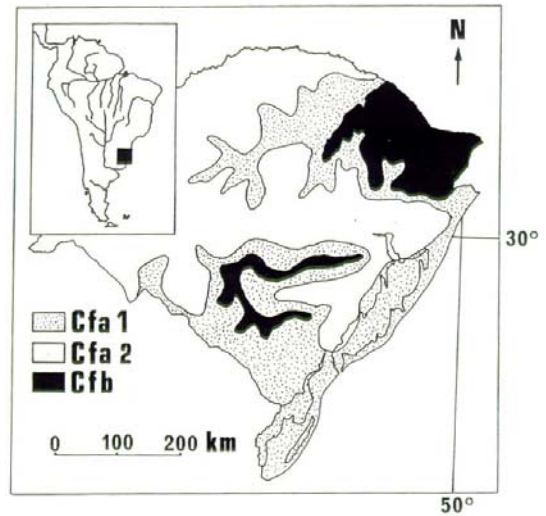


Figura 3. Diferenciação climatológica no Rio Grande do Sul.

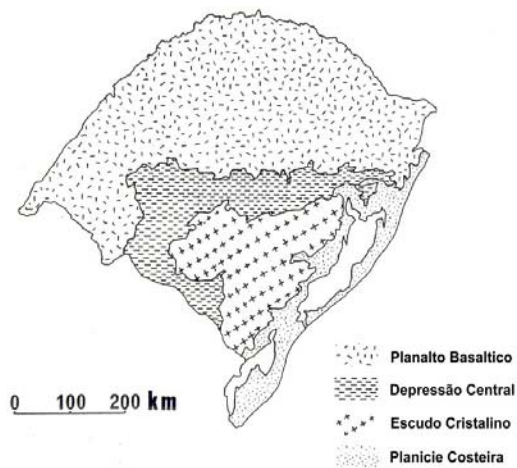


Figura 4. Províncias Geomorfológicas.

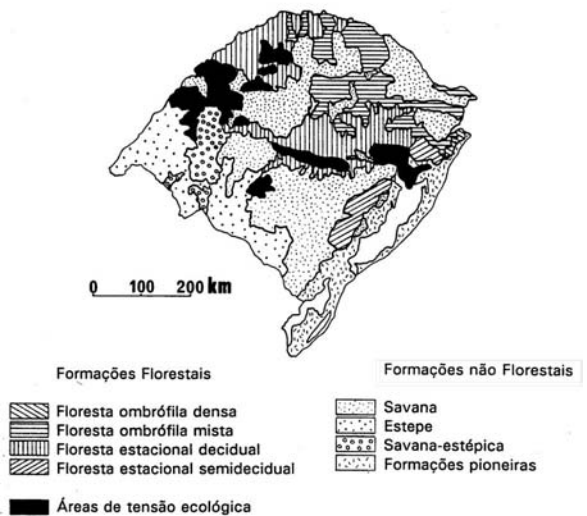


Figura 5. Vegetação do Rio Grande do Sul.

CAPÍTULO 4:

**VARIABILIDADE GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL EM
Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss, ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD.**

**VARIABILIDADE GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL
EM *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, ATRAVÉS DE MARCADORES
RAPD.**

**Altemir José Mossi ^{a*}, Rogério Luis Cansian ^a, Oleg Leontiev-Orlov ^a, Michel Luis
Cechet ^a, Alexandre Z. Carvalho ^a, Sérgio Echeverrigaray ^b**

^a Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621.
CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil.

E-mail: amossi@uricer.edu.br

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil. E-
mail: selaguna@yahoo.com

* Para quem a correspondência deve ser enviada.

Telefone: 55-54-520-9000

Fax: 55-54-520-9090

RESUMO

A flora brasileira possui uma grande biodiversidade e um potencial imenso para estudo e descoberta de novos fitoterápicos. *Maytenus ilicifolia* é uma planta medicinal bastante utilizada na região sul do Brasil. Estudos realizados com extratos de folhas de espinheira santa comprovaram seu efeito antiulcerogênico. O objetivo deste estudo foi determinar a variabilidade genética intra e interpopulacional em três populações de *Maytenus ilicifolia* visando à conservação genética desta espécie, que se encontra ameaçada pela grande ação antrópica que vem sofrendo. Para isto, foram utilizados marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em 30 amostras de plantas de cada uma das três populações coletadas aleatoriamente na região do Alto Uruguai Gaúcho. Foram selecionados 14 *primers* com média de 10,9 fragmentos cada, o que gerou 158 bandas analisadas, sendo 71,5% delas polimórficas. O polimorfismo encontrado nas populações variou de 53,5% a 62% e o índice de similaridade ficou entre 0,71 e 0,90 para população do município de Barão de Cotegipe, 0,69 e 0,98 para Erechim e 0,67 e 0,87 para São José. A variância intrapopulacional (0,102 a 0,140) foi superior àquela observada entre populações (0,076 a 0,099). A análise de agrupamentos permitiu separar as três populações, porém com significância menores que 40%. A frequência alélica das populações demonstrou 28,48% alelos idênticos, 39,6% com diferença de frequência menor que 50% e 31,9 com diferença de frequência superior a 50%. Além disto, 7,6 % dos alelos encontraram-se ausentes em pelo menos uma das populações. Apesar da proximidade genética entre as populações, separadas com um baixo valor de significância, apontar para realização de coletas em um menor número de populações, e um maior número de indivíduos por população, a presença de alelos raros nas populações indica a necessidade de coletas nas diferentes populações na região para que estes alelos sejam resgatados e preservados.

Palavras-chave: Espinheira Santa, *Maytenus ilicifolia*, RAPD, Variabilidade Genética, Conservação da Natureza.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no Brasil é intenso, especialmente pelas populações de menor renda, são usadas tanto plantas exóticas introduzidas pelos imigrantes, bem como plantas nativas.

A flora brasileira possui uma grande biodiversidade, e um grande potencial para estudo e descoberta de novos fitoterápicos. Entretanto, o pouco conhecimento e o mau uso dos recursos naturais tem levado diversas espécies a serem incluídas em listas de espécies ameaçadas de extinção. A ação antrópica, bem como a fragmentação dos ecossistemas pode provocar a diminuição do fluxo gênico e aumento da endogamia e conseqüentemente a diminuição da variabilidade genética (1).

O gênero *Maytenus* pertence à família Celastraceae, possuindo diversas espécies de uso medicinal em vários países, sobressaindo-se *M. chubutensis* no Chile, *M. horrida* no Paraguai, *M. krukovii* e a *M. macrocarpa* no Peru e Equador, *M. diversifolia* e *M. emarginata* em Taiwan, *M. rothiana* na Índia, *M. mosambicensis* em Moçambique, *M. senegalensis* na Tanzânia e *M. canariensis* nas Ilhas Canárias, entre outras.

No Brasil, as duas espécies do gênero utilizadas na medicina popular são *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*. Devido a sua semelhança morfológica estas espécies são frequentemente confundidas. *M. ilicifolia* é um subarbusto, ramificado desde a base, medindo cerca de 5,0 m de altura, os ramos glabros são tetra ou multicarenados e as folhas são coriáceas, glabras com margem inteira ou com espinhos de 1 a vários (2). Através de observações, Carvalho-Okano (2) sugere que devido à redução dos órgãos reprodutivos, ora do gineceu, ora do androceu, possa estar havendo uma tendência de transição da bissexualidade para unissexualidade das flores em indivíduos desta espécie.

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss, é uma das poucas espécies brasileiras com estudos químicos e farmacológicos. Estudos realizados com extratos de folhas de *M. ilicifolia* comprovaram seu efeito antiulcerogênico (3, 4, 8), analgésico (5), antitumoral (6), e abortivo (7).

Carvalho-Okano (2), identificou a região sudeste como o centro primário de diversidade específica de *Maytenus* no Brasil, por abrigar o maior número de espécies. Porém a distribuição geográfica de *Maytenus ilicifolia* se dá prioritariamente na região

sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), habitando preferencialmente o sub-bosque de floresta ou as margens de rios. A autora também menciona não ter encontrado material em herbários de São Paulo e Mato Grosso do Sul, onde a ocorrência seria rara.

Siqueira (9) revisando 63 levantamentos de ocorrência na literatura em componentes arbóreos da Mata Atlântica não encontrou nenhum relato de *Maytenus ilicifolia*, demonstrando a ocorrência pouco freqüente desta espécie, sendo por vezes superada por espécies raras como o cedro.

A baixa freqüência de ocorrência, o intenso uso como fitoterápico pela população e grande ação antrópica na região de ocorrência natural desta espécie tem levado a degradação da mesma. Neste sentido estudos genéticos são de fundamental importância para manejo e conservação desta espécie. O uso de marcadores moleculares é uma poderosa ferramenta no estudo genético de populações, sendo o RAPD (*Random Amplified polymorphic DNA*) adequado para análise de diversidade genética em populações naturais de espécies alógamas (10).

Até o momento poucos estudos foram realizados, Bittencourt (11) estudou a variabilidade genética de duas populações de *Maytenus ilicifolia* no Paraná com o uso de marcadores moleculares (RAPD) e Percin (12), com o uso de marcadores bioquímicos (isoenzimas) estudou a diversidade genética em cinco populações de *Maytenus aquifolia* no estado de São Paulo e uma população de *Maytenus ilicifolia* de Santa Catarina.

Este trabalho tem como objetivo analisar a variabilidade genética intrapopulacional e interpopulacional, com o uso de marcadores moleculares (RAPD), em três populações nativas de *Maytenus ilicifolia* localizadas dentro de uma mesma região agroecológica no norte do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico. No presente trabalho foram analisadas três populações nativas de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*), oriundas dos municípios de Erechim, Barão de Cotegipe e São José, norte do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Tabela 1). Para fins deste trabalho foi considerada como população o grupo de plantas isoladas geograficamente. Cada população foi representada por 30 plantas adultas coletadas aleatoriamente e

representando toda a área amostrada. A distância mínima entre duas plantas foi de dez metros. As folhas coletadas foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, e posteriormente, armazenadas em freezer à - 80°C até a extração do DNA.

Tabela 1. Coordenadas e distância (m) das populações de *Maytenus ilicifolia* nos municípios de ocorrência.

| Local | Coordenadas | Distância (m) | | |
|-------------------|--------------------------------|---------------|-------------------|----------|
| | | Erechim | Barão de Cotegipe | São José |
| Erechim | S 28° 38'300 W 52° 17'500 | - | - | - |
| Barão de Cotegipe | S 27° 34.352' W 52° 20.892' | 19.360 | - | - |
| São José | S 27° 32.454' W 52° 20.892' | 22.535 | 3.367 | - |

Extração de DNA. Para o isolamento de DNA total de cada planta foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (13) modificado para uso em Espinheira Santa (11). O processo básico consiste em: maceração de aproximadamente 150 mg de folhas em nitrogênio líquido; adição de 750µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2% 2-Mercaptoetanol, 0,01% Proteinase K, 1% PVP); manutenção em banho-maria por 45 min. à 65°C; duas desproteínizações com 1 volume clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) até limpeza total do DNA; precipitação com 2/3 volume de isopropanol e duas lavagens com 1000µl etanol 70%; ressuspensão em 150µl de TE (Trisma:EDTA-10:1); quantificação em espectrofotômetro UV a 260nm e confirmação da integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280nm e em gel de agarose 0,8%.

Reação de amplificação de RAPD. Foi utilizada a reação descrita por Williams et al. (14), com algumas modificações. Em um volume total de 25 µl: tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl), dNTPs (200mM de cada), 0,2 mM de *primer*, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de Triton-X-100, 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL e aproximadamente 40ng de DNA.

Primers de RAPD. Foram utilizados os kits OPA, OPB, OPD, OPF, OPH, OPW e OPY da *Operon Technologies*, com 20 *primers* cada um, visando identificar os que apresentam os melhores resultados em espinheira santa, avaliando-se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas, a sua repetibilidade e o polimorfismo gerado pelas mesmas.

Amplificação de RAPD. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research INC. O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C. Após, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras.

Análise eletroforética dos fragmentos amplificados. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M Ácido bórico e 0,008M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90Volts. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Ladder 100bp da Gibco BRL. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO.

Análise dos dados. Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional NTSYS versão 1.7 (Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System). Os dendogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), desenvolvido por Sokal e Michener (15), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os limites de confiança dos agrupamentos formados foram calculados pela randomização de 100 amostragens dos resultados usando o programa Winboot (16). A frequência alélica foi determinada pelo percentual de fragmentos presentes em relação ao total das 30 plantas analisadas em cada população, comparando-se cada alelo nas três populações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo da variabilidade intra e interpopulacional nas três populações foram utilizados 14 *primers* da *Operon Technologies* (**Tabela 2**). Os *primers* utilizados foram selecionados de um total de 140 *primers* decaméricos dos *kits*

OPA, OPB, OPD, OPF, OPH, OPW e OPY. A seleção dos *primers* foi baseada na quantidade, intensidade e a repetibilidade dos fragmentos amplificados e resultados obtidos por Bittencourt (11). Considerando que a amplificação de fragmentos pode ser afetada por fatores como concentração dos componentes da reação e diferentes condições dos ciclos de amplificação (17, 18), foram consideradas, para fim de avaliação, unicamente os fragmentos amplificados que apresentaram alta intensidade e reprodutibilidade, determinados por três repetições de amplificação.

Levando em consideração dos 90 indivíduos estudados foi identificado um total de 158 fragmentos, sendo que destes, 113 (71,52%) mostraram-se polimórficos. Nos 30 representantes de cada população, considerados para fins de análise, foram considerados 155 fragmentos para a população Erechim, 154 para Barão de Cotegipe e 150 para São José (**Tabela 2**). Os fragmentos amplificados apresentavam entre 50 e 2200 bp. O número médio de fragmentos por *primer* foi de 10,9, sendo de 11,1, 11,0 e 10,7 nas plantas das populações oriundas de Erechim, Barão de Cotegipe e São José, respectivamente. O número médio de fragmentos por *primer* foi relativamente baixo se comparado com o obtido por Gauer e Cavalli-Molina (19) em *Ilex paraguariensis* A. St. Hil, e superior ao encontrado por Bittencourt (11) em *Maytenus ilicifolia* de 7,42 bandas por *primer*. Esta diferença pode ser atribuída as condições laboratoriais distintas, aos *primers* utilizados, mas principalmente ao rigor estabelecido na escolha dos fragmentos para análise no presente estudo.

O polimorfismo encontrado nas populações foi de 53,5% , 53,9% e 62% para as populações Erechim, Barão de Cotegipe e São José, respectivamente (**Tabela 2**). Os valores podem ser considerados baixos quando comparados com outras espécies arbóreas como *Acácia raddiana* com 90,69% (20), *Olea europaea* com 91,5% (21). A **Figura 1** mostra a variabilidade observada dentro dos representantes da população de Erechim utilizando o *primer* OPF01.

Tabela 2: Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada *primer* utilizado nas três populações analisadas.

| Primer | Seqüência (5' para 3') | Total de fragmentos | | | Fragmentos polimórficos | | |
|-------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|----------|-------------------------|----------------------|----------|
| | | Erechim | Barão de Cotegipe | São José | Erechim | Barão de Cotegipe | São José |
| OPA-01 | CAGGCCCTTC | 12 | 11 | 12 | 7 | 4 | 7 |
| OPA-02 | TGCCGAGCTG | 13 | 13 | 13 | 9 | 9 | 8 |
| OPA-08 | GTGACGTAGG | 11 | 11 | 12 | 8 | 10 | 10 |
| OPA-09 | GGGTAACGCC | 11 | 11 | 11 | 8 | 9 | 10 |
| OPB-03 | CATCCCCCTG | 11 | 11 | 10 | 8 | 8 | 10 |
| OPB-07 | GGTGACGCAG | 9 | 9 | 9 | 6 | 6 | 8 |
| OPD-20 | ACCCGGTCAC | 12 | 12 | 11 | 6 | 5 | 7 |
| OPF-01 | ACGGATCCTG | 14 | 14 | 13 | 7 | 8 | 4 |
| OPF-10 | GGAAGCTTGG | 12 | 12 | 11 | 4 | 4 | 3 |
| OPH-08 | GAAACACCCC | 10 | 10 | 8 | 2 | 5 | 4 |
| OPW-04 | CAGAAGCGGA | 14 | 14 | 15 | 6 | 4 | 8 |
| OPW-08 | GA CTGCCTCT | 11 | 11 | 11 | 7 | 6 | 7 |
| OPY-11 | AGACGATGGG | 5 | 5 | 6 | 2 | 1 | 3 |
| OPY-13 | GGGTCTCGGT | 10 | 10 | 8 | 3 | 4 | 4 |
| TOTAL | | 155 | 154 | 150 | 83 | 83 | 93 |
| % de Polimorfismo | | | | | 53,5% | 53,9% | 62,0% |

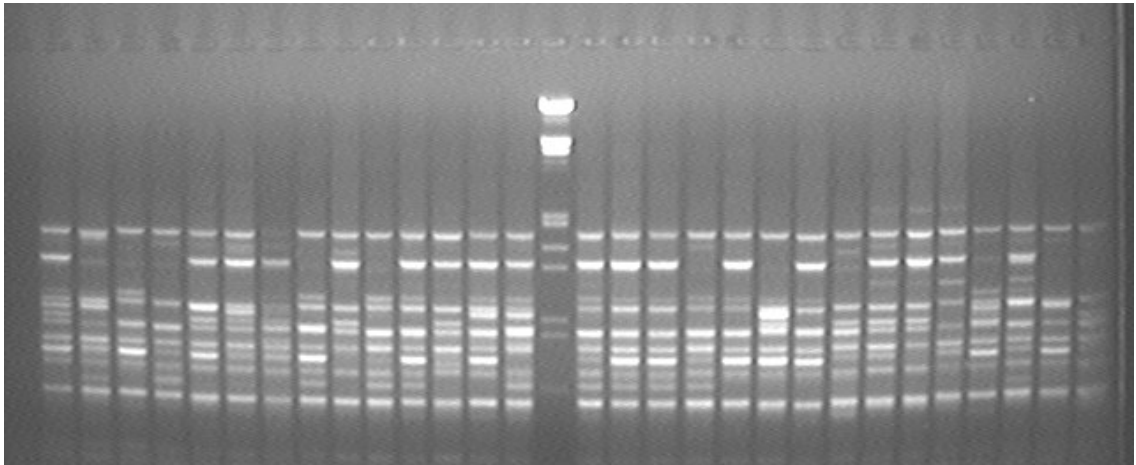


Figura 1: Gel de agarose demonstrativo, obtido com o primer OPF 01 na população Erechim.

O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre as plantas representantes da população Barão de Cotegipe variou entre 0,71 e 0,90 com média de 0,78, na população de Erechim 0,69 e 0,98 com média de 0,79 e São José 0,67 e 0,87 com média de 0,76 (**Tabela 3**).

A alta variabilidade intrapopulacional em *M. ilicifolia* foi também constatada por Bittencourt (11) estudando duas populações do Paraná. Entretanto, a amplitude de variação dos índices de diversidade nas populações paranaenses mostrou-se maior do que os detectados nas populações do RS. Este resultado pode estar relacionado ao número de bandas utilizadas para análise, sendo 52 (44 polimórficas) nas populações do Paraná e 158 (113 polimórficas) nas populações do Rio Grande do Sul, ou um *pool* gênico de formação mais amplo nas populações do Paraná, por estarem mais próximas ao centro de origem.

Conforme **Tabela 3**, os índices de similaridade entre as populações variaram de 0,62 a 0,87 com média de 0,72, assim como as amplitudes de variação, são ligeiramente inferiores aos encontrados nos índices intrapopulacionais.

A variância para cada uma das populações e entre as populações (**Tabela 3**), demonstra que as variâncias intrapopulacionais (0,102 a 0,140) são superiores as variâncias entre as populações (0,076 a 0,099), embora existam alelos presentes de forma diferencial nas distintas populações que permitem a separação destas. Carvalho-Okano (2) sugere que possa estar havendo uma tendência de transição da bissexualidade para a unissexualidade das flores e indivíduos desta espécie.

Tabela 3. Similaridades intra e inter populacionais de *Maytenus ilicifolia* coletadas no Alto Uruguai, RS.

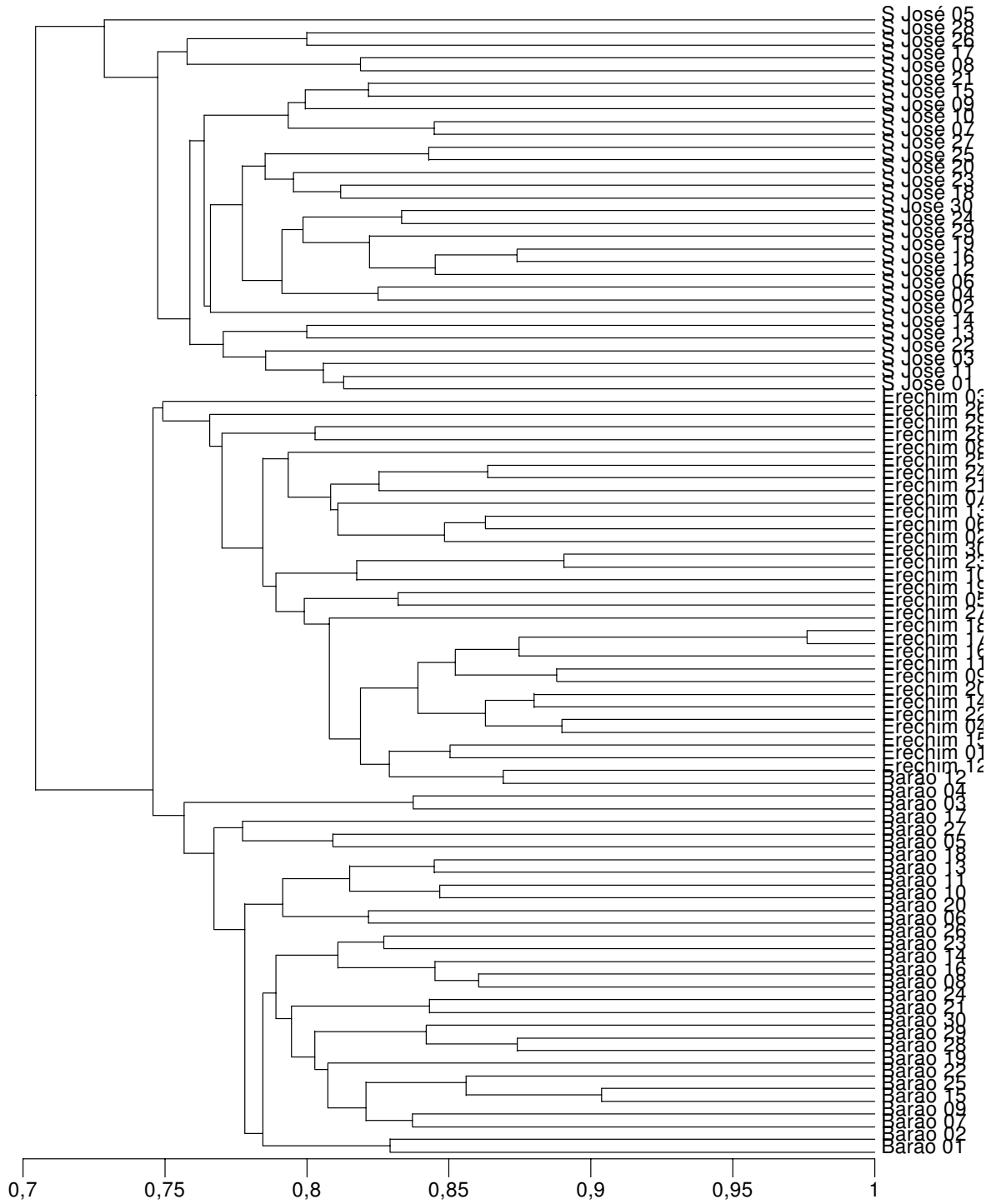
| População | Média | Valor Mínimo | Valor Máximo | Variância | Desvio Padrão | *C V % |
|------------------------------|-------|-----------------|-----------------|-----------|------------------|--------|
| Barão de Cotegipe | 0,78 | 0,71 | 0,90 | 0,107 | 0,0327 | 4,19 |
| Erechim | 0,79 | 0,69 | 0,98 | 0,140 | 0,0374 | 4,73 |
| São José | 0,76 | 0,67 | 0,87 | 0,102 | 0,0319 | 4,19 |
| Barão de Cotegipe – Erechim | 0,75 | 0,67 | 0,87 | 0,096 | 0,0310 | 4,13 |
| Barão de Cotegipe – São José | 0,71 | 0,62 | 0,81 | 0,099 | 0,0315 | 4,44 |
| Erechim – São José | 0,70 | 0,62 | 0,80 | 0,076 | 0,0276 | 3,94 |

* Coeficiente de Variação

O coeficiente de variação calculada entre as populações, mostrou maior proximidade entre Erechim e São José (3,94) quando comparado com Erechim e Barão de Cotegipe (4,13) e Barão de Cotegipe e São José (4,44). Este resultado não pode ser explicado pela distribuição geográfica, uma vez que a população Erechim está a 19,4 Km de Barão de Cotegipe e a 22,5 Km de São José, enquanto Barão de Cotegipe está a 3,4 Km de São José.

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA (**Figura 2**) permitiu separar as 90 plantas analisadas em três grupos correspondentes a cada uma das populações avaliadas, com exceção de uma planta da população Barão de Cotegipe que agrupou com a população de Erechim. Porém os valores de significância obtidos através de análise de bootstrap (16) são baixos (inferiores a 40%) indicando que apesar da separação, as populações estão bastante próximas. Os índices de confiança internos de cada grupo formado são baixos, demonstrando não haver formação de sub-grupos dentro das populações.

A análise de coordenadas principais (PCO) usando distâncias euclidianas mostrou separação entre as três populações, onde 13,13% do total da variação foi determinada pela coordenada 1, 11,76%, pela coordenada 2 e 7,03% pela coordenada 3. As três coordenadas principais explicam somente 31,92% do evento, sendo necessário dez coordenadas para explicar mais de 50% do evento.



UPGMA (Coeficiente de Jaccard)

Figura 2: Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD.

Considerando a frequência alélica das populações, 28,48% foram idênticos para as três populações e 39,6% apresentaram frequência com diferenças menores que 50% e 31,01% tiveram diferença de frequência superior a 50%. A diferença de frequência entre as populações superior a 50%, confirma os resultados obtidos por Perecin (12) com o uso de marcadores isoenzimáticos. As diferenças alélicas entre populações podem estar associadas ao sistema reprodutivo da planta, a um fluxo gênico relativamente baixo entre populações, e a efeito fundador (12). Além disto foram encontrados 12 alelos (7,6%) que não estavam presentes em pelo menos uma das populações. Cabe ressaltar a importância da preservação dos fragmentos de matas, pois as populações contidas nestes fragmentos contêm alelos raros, que com a ação antrópica (fragmentação dos ecossistemas, eliminação da fauna que ajuda na dispersão das sementes, etc) tendem a ser perdidos.

Os resultados obtidos apontam para algumas considerações no que diz respeito à conservação da base genética em *Maytenus ilicifolia*. Apesar da proximidade genética entre as populações, separadas com um baixo valor de significância apontar para realização de coletas em um menor número de populações, e um maior número de indivíduos por população, a presença de alelos raros nas populações indica a necessidade de coletas nas diferentes populações na região para que estes alelos sejam resgatados e preservados. Cabe ressaltar, que quaisquer medidas a serem tomadas no sentido da preservação de germoplasmas *ex-situ*, não descartam a necessidade de conservação *in situ*, a qual depende do controle estrito da ação antrópica.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e SCT - RS pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I de. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, 12(32):65-70, 1998.
- 2- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-amazônico.** 1992. 252 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- 3- 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 Brasileiras**. Central de Medicamentos, CEME/AFIP, 1998. Brasília 128p.
- 4- SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G. M. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34(1):21-27, 1991.
- 5- OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P. CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34:1, 29-41, 1991.
- 6- FOX, B. W. Medicinal plants in tropical medicine: Natural products in cancer treatment from bench to the clinic. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 85:1, 22-25, ref.13, 1991.
- 7- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, 65:2,171-175, 2002.
- 8- NIERO, R.; MOSER, R. BUSATO, A. C. B.; YUNES, R. A.; CECHINEL V. F. A Comparative chemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss and *Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung, Section C, Biosciences**. 56: 1-2, 158-161, 2001.
- 9- SIQUEIRA, M. **Análise florística e ordenação de espécies arbóreas da Mata Atlântica através de dados binários**. 1994. 143 p. Tese (Mestrado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 10- FERREIRA E. M.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998, 220p.
- 11- BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. 2000, 58 p. Tese (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 12- PERECIN, M. B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae)**. 2000, 133 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- 13- DOYLE, J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Am J Bot.** 75:1238, 1988.
- 14- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18:6531-6535, 1990.
- 15- SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Univ. Sci. Bull.** 38:1409-1438, 1958.
- 16- YAP, I.; NELSON, R.J. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. **International Rice Research Institute.** Manila, Philippines. Discussion Paper series n° 14. 1996.
- 17- KRESOVICH, S.; WILLIAMS, J. G. K.; MCFERSON, J. R.; ROUTMAN, E. J.; SCHAAL, B. A. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. **Theor. Appl. Genet.** 85:190-196, 1992.
- 18- WEEDEN, N.F.; MUEHLBAUER, F.J.; LADIZINSKI, G. Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. **J. Heredity.** 83:123-129, 1992.
- 19- GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S.. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil, Aquifoliaceae) using RAPD markers. **J. Heredity.** 84:647-656, 2000.
- 20- SHRESTHA, M. K.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; WARD, D. Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert. **Biological Conservation.** 108: 119-127, 2002.
- 21- MEKURIA, G. T.; COLLINS, G.; DEDGLEY, M. Genetic diversity within an isolated olive (*Olea europaea* L.) population in relation to feral spread. **Scientia Horticulturae.** 1756: 1-15, 2002.

CAPÍTULO 5:

**ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES
NATIVAS DE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. ATRAVÉS DE
MARCADORES RAPD**

ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD

Altemir José Mossi ^{a*}, Rogério Luis Cansian ^a, Oleg Leontiev-Orlov ^a, Michel Luis Cechet ^a, Marcelo Fernando Pinto ^a, Sérgio Echeverrigaray ^b

^a Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621. CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil.

E-mail: amossi@uricer.edu.br

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil. E-mail: selaguna@yahoo.com

* Para quem a correspondência deve ser enviada.

Telefone: 55-54-520-9000

Fax: 55-54-520-9090

RESUMO

O Objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética em dezoito populações de *M. ilicifolia*, e representantes de *M. aquifolia* e *M. evonymoidis*, coletadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, utilizando marcadores moleculares RAPD. Considerados todos os representantes das três espécies, foram identificados 263 fragmentos amplificados, dos quais 72,2% mostraram-se polimórficos. O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) foi em média de 0,64 entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*, de 0,47 entre *M. ilicifolia* e *M. evonymoidis* e de 0,44 entre *M. aquifolia* e *M. evonymoidis*. A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA permitiu separar claramente as três espécies analisadas. Na determinação da variabilidade dentro de *M. ilicifolia* foram identificadas 222 bandas, em média de 11,1 bandas por *primer*, sendo 43,2% polimórficas. O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) dentro dos *bulks* de cada população em *M. ilicifolia* foi em média de 0,92, e índices de similaridade entre as populações de 0,83. A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA e análise de coordenadas principais (PCO), permitiram separar as populações analisadas em três grupos, destacando as populações do sul do RS e a população de MS das outras populações avaliadas. Uma relação entre os agrupamentos encontrados e as características edafoclimáticas dos locais de coleta foi observada.

Palavras-chave: Espinheira Santa, *Maytenus ilicifolia*, RAPD, Variabilidade Genética, Conservação da Natureza.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no Brasil é intenso, especialmente pelas populações de menor renda, pois a flora brasileira possui uma grande biodiversidade. No entanto, o pouco conhecimento e mau uso dos recursos naturais tem levado a perda de populações, e várias plantas medicinais estão incluídas em listas de espécies ameaçadas de extinção. O gênero *Maytenus* pertence à família Celastraceae, e possui diversas espécies utilizadas na medicina popular nas mais diferentes regiões do mundo.

No Brasil, as espécies *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia* são utilizadas popularmente para como antiespasmódico, contraceptivo, antiulceroso, diurético, cicatrizante e analgésico. Estudos realizados com animais em laboratório (1, 2), comprovaram o efeito antiulcerogênico de *M. aquifolia* e *M. ilicifolia*, efeito este atribuído ao aumento do volume e pH do suco gástrico (2), e suas atividade como antioxidante (3), e efeito anti-séptico e cicatrizante (4, 5). Diversos compostos estão presentes no extrato, tais como fenóis, taninos e terpenos (6).

Carvalho-Okano (7), identificou a região sudeste como o centro primário de diversidade específica de *Maytenus* no Brasil, por abrigar o maior número de espécies. Porém a distribuição geográfica atual de *M. ilicifolia* é prioritariamente na região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul); habitando preferencialmente o sub-bosque de floresta ou as margens de rios. A autora também menciona não ter encontrado material em herbários de São Paulo e Mato Grosso do Sul, onde a ocorrência seria rara. Siqueira (8), revisando 63 levantamentos de ocorrência na literatura em componentes arbóreos da Mata Atlântica não encontrou nenhum relato de *M. ilicifolia*, demonstrando a ocorrência pouco frequente desta espécie, sendo por vezes superada por espécies raras como o cedro.

A baixa frequência de ocorrência, o intenso uso como fitoterápico pela população e grande ação antrópica na região de ocorrência natural desta espécie tem levado a degradação da mesma. Neste sentido, estudos genéticos são de fundamental importância para manejo e conservação desta espécie.

O uso de marcadores moleculares é uma poderosa ferramenta no estudo genético de populações, sendo o RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) adequado para análise de diversidade genética em populações naturais de espécies alógamas (9). Até o momento poucos estudos de diversidade genética e química foram realizados em *M. ilicifolia*,

Bittencourt (11) estudou com o uso de marcadores moleculares RAPD, a variabilidade genética de duas populações de *M. ilicifolia* no Paraná e Perecin (12, 13), empregando marcadores bioquímicos (isoenzimas) estudou a diversidade genética em cinco populações de *M. aquifolia* no estado de São Paulo e uma população de *M. ilicifolia* de Santa Catarina.

O presente trabalho teve como objetivo analisar utilizando marcadores moleculares (RAPD) a variabilidade genética em 18 populações nativas de *M. ilicifolia* localizadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com vistas a contribuir na determinação de estratégias para conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas das dezoito populações nativas de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*), foram feitas em três estados brasileiros: Mato Grosso do Sul, no município de Ponta Porã; Paraná, nos municípios de Lapa, Irati, Guarapuava e Mangueirinha no Paraná; Santa Catarina nos municípios de Lages, São Joaquim e Caçador e Rio Grande do Sul nos municípios de Santana do Livramento, Canguçu, Unistalda, Vale Verde, Soledade, Flores da Cunha, Bom Jesus, Erechim, Barão de Cotegipe e São José (Figura 1). Foi considerada como população o grupo de plantas isoladas geograficamente. Cada população foi representada por 30 plantas adultas coletadas aleatoriamente em cada área. A distância mínima entre duas plantas foi de 10 metros. Além da análise genética em populações de *M. ilicifolia* foram utilizadas para comparação interespecífica plantas de *M. aquifolia* e *M. evonymoidis*.

Análise Genética

As folhas coletadas de cada planta separadamente foram identificadas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, e posteriormente, armazenadas em freezer à - 80°C até a extração do DNA a qual ocorreu com a formação de 3 bulks com 10 plantas por população.

Para o isolamento de DNA total foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle (14) modificado para uso em Espinheira Santa (11). O processo básico consiste em: maceração de aproximadamente 150 mg de folhas em nitrogênio líquido; adição de 750µl de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2% 2-Mercaptoetanol, 0,01% Proteinase K, 1% PVP); manutenção em banho-maria por 45 min. à 65°C; duas desproteínas com 1 volume clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) até limpeza total do DNA; precipitação com 2/3 volume de isopropanol e duas lavagens com 1000µl etanol 70%; ressuspensão em 150µl de TE (Trisma:EDTA - 10:1); quantificação em espectrofotômetro UV a 260nm e confirmação da integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280nm e em gel de agarose 0,8%.



Figura 1. Locais de coleta das 18 populações de *M. ilicifolia* nos estados do Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, Brasil.

As reações de amplificação de RAPD foram realizadas de acordo com Williams et al. (15), com algumas modificações. Em um volume total de 25 µL: tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl), dNTPs (200mM de cada), 0,2 mM de *primer*, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de TRITON e 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL (*Life Technologies*, São Paulo, Brasil) e 40-50ng de DNA.

Para seleção dos *Primers* foram utilizados os *kits* OPA, OPB, OPD, OPF, OPH, OPW, OPF e OPY da *Operon Technologies*, contendo 20 *primers* cada um, visando identificar os que apresentam os melhores resultados em espinheira santa, avaliando-se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas, a sua repetibilidade e o polimorfismo gerado pelas mesmas.

A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ *Research* INC., *Watertown*, MA). O processo de amplificação foi baseado na seguinte sequência: 3 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C. Após, 3 min a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras.

A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M Ácido bórico e 0,008M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90Volts. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Ladder 100bp da *Gibco BRL*. A visualização dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (*Media Cybernetics*, *Silver Spring*, MD). Para cada *primer* analisado foram preparados 3 géis contendo 1 *bulk* de cada população de *M. ilicifolia* junto com um representante das outras duas espécies.

A análise dos dados foi realizada da seguinte forma: na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do pacote estatístico (MVSP) Os dendogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*), desenvolvido por Sokal e Michener (16), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os limites de confiança dos agrupamentos formados foram calculados pela randomização de 100 amostragens dos resultados usando o programa Winboot (17). A análise de coordenadas principais intra e interespecífica foi analisada por MVSP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo da variabilidade foram utilizados 20 *primers* da *Operon Technologies* (**Tabela 1**). Os *primers* utilizados foram selecionados de um total de 140 *primers* decaméricos dos kits OPA, OPB, OPD, OPF, OPH, OPW e OPY. A seleção dos *primers* foi baseada na quantidade, intensidade e a repetibilidade dos fragmentos amplificados e

resultados obtidos por Bittencourt (11). Tendo em vista que a amplificação de fragmentos pode ser afetada por fatores como concentração dos componentes da reação e diferentes condições dos ciclos de amplificação (18, 19), considerou-se para fim de avaliação unicamente os fragmentos amplificados que apresentaram alta intensidade e reprodutibilidade em três repetições de amplificação.

Tabela 1: Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada primer utilizado nas três populações analisadas.

| Primer | Sequência (5' para 3') | Fragmentos Totais | | | | Fragmentos Específicos | | |
|--------|---------------------------|-------------------|----------------|----------------|-------------|------------------------|----------------|----------------|
| | | <i>M. ilic</i> | <i>M. aqui</i> | <i>M. evon</i> | <i>Poli</i> | <i>M. ilic</i> | <i>M. aqui</i> | <i>M. evon</i> |
| OPA-04 | CAGGCCCTTC | 12 | 6 | 8 | 12 | 1 | 1 | - |
| OPA-08 | GTGACGTAGG | 8 | 6 | 6 | 11 | 3 | 1 | 3 |
| OPA-09 | GGGTAACGCC | 9 | 5 | 4 | 8 | 3 | - | 1 |
| OPA-11 | CAATCGCCGT | 16 | 11 | 10 | 11 | 4 | - | 1 |
| OPA-19 | CAAACGTCCGG | 9 | 4 | 8 | 9 | 3 | 1 | 2 |
| OPB-07 | GGTGACGCAG | 13 | 9 | 9 | 12 | 3 | 1 | 2 |
| OPB-11 | GTAGACCCGT | 15 | 9 | 10 | 14 | 4 | - | 1 |
| OPB-12 | CCTTGACGCA | 8 | 4 | 7 | 10 | 1 | 1 | 2 |
| OPB-13 | TTCCCCGCT | 6 | 4 | 2 | 4 | 1 | - | - |
| OPD-20 | ACCCGGTCAC | 13 | 10 | 11 | 9 | 2 | - | 1 |
| OPD-08 | GTGTTGCCCA | 13 | 13 | 9 | 8 | 2 | - | - |
| OPF-01 | ACGGATCCTG | 16 | 9 | 10 | 13 | 6 | 2 | 1 |
| OPF-10 | GGAAGCTTGG | 11 | 10 | 8 | 11 | 1 | - | 4 |
| OPH-03 | AGACGTCCAC | 12 | 9 | 9 | 7 | 2 | - | 2 |
| OPW-08 | GACTGCCTCT | 8 | 6 | 6 | 6 | 3 | 1 | 1 |
| OPW-16 | CAGCCTACCA | 9 | 7 | 5 | 12 | 2 | - | 4 |
| OPY-08 | AGGCAGAGCA | 9 | 7 | 7 | 8 | 2 | 1 | 2 |
| OPY-10 | CAAACGTGGG | 9 | 4 | 6 | 7 | 2 | - | - |
| OPY-13 | GGGTCTCGGT | 13 | 8 | 12 | 7 | 1 | - | - |
| OPY-18 | GTGGAGTCAG | 13 | 10 | 8 | 11 | 3 | - | 2 |
| Total | | 222 | 158 | 155 | 190 | 49 | 9 | 27 |

Na análise dos *bulks* representantes de cada uma das 18 populações de *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolia* e *Maytenus evonymoidis* foram considerados 263 fragmentos sendo destes 190 (72,2%) polimórficos e 73 (27,8%) monomórficos. Os fragmentos amplificados apresentavam entre 100 e 2200 bp. A média de fragmentos amplificados por primer foi de 13,15, resultado este superior ao encontrado na análise intrapopulacional em *M. ilicifolia* de 10,9 (20). Esta diferença se deve a presença de 41 (15,6%) bandas características de *M. aquifolia* e *M. evonymoidis*. O número médio de bandas obtido por primer é superior ao encontrado por Bittencourt (11) em *M. ilicifolia* que foi 7,42 por primer. Esta diferença pode ser atribuída as condições laboratoriais distintas, aos primers utilizados e ao rigor estabelecido na escolha dos fragmentos para análise.

Com relação à presença e à ausência de bandas nas espécies, das 263 bandas analisadas foram observadas 49 bandas (18,6%) com ocorrência apenas em *M. ilicifolia*, 9 (3,4%) em *M. aquifolia* e 27 (10,3%) em *M. evonymoidis*. Tanto *M. ilicifolia* como *M. aquifolia* são bastante utilizadas na medicina popular, e muitas vezes são confundidas devido às semelhanças morfológicas entre elas (7). O baixo número de bandas específicas para *M. aquifolia* confirma esta proximidade, mas abre a possibilidade de utilização de marcadores moleculares na identificação de misturas e adulterações.

O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* variou entre 0,59 e 0,69 com média de 0,64, entre *M. ilicifolia* e *M. evonymoidis* foi de 0,43 a 0,50 com média de 0,47 e entre *M. aquifolia* e *M. evonymoidis* foi em média de 0,44. Conforme esperado os índices de similaridade entre as espécies foram inferiores aos obtidos dentro da espécie (0,72 a 0,79) (20).

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA (**Figura 2**) permitiu separar claramente as espécies analisadas com 100% de confiança, sendo *M. evonymoidis* a mais distante. A alta presença de fragmentos compartilhados entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*, indica uma proximidade filogenética grande entre as espécies. Da mesma forma, Perecin e Kageyama (13) em estudos com isoenzimas constataram a presença de muitos alelos compartilhados entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* e os autores sugerem a possibilidade de que as espécies não estejam completamente isoladas reprodutivamente ou que este fato ocorreu a um espaço de tempo não muito distante.

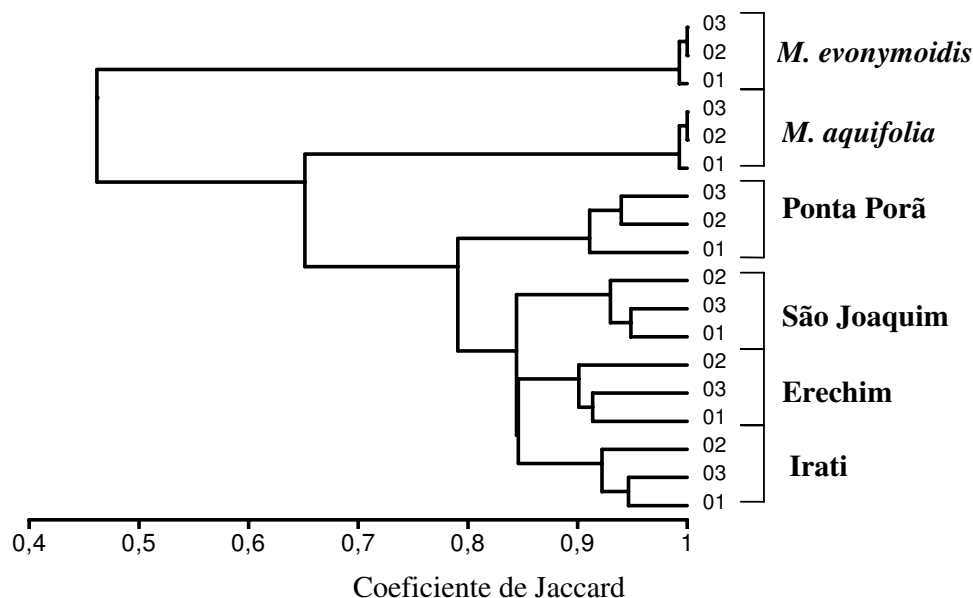


Figura 2. Dendrograma de algumas populações de *M. ilicifolia* e das espécies *M. aquifolia* e *M. evonymoidis* determinado por RAPD, usando coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.

No estudo intra-específico foram utilizados para a espécie *Maytenus ilicifolia* um total de 540 indivíduos, sendo estes oriundos de 18 populações coletadas nos estados de Mato Grosso do Sul (1), Paraná (4), Santa Catarina (3) e Rio Grande do Sul (10). Coletaram-se amostras de 30 indivíduos de cada população, formando 3 bulks de 10 indivíduos para cada população.

Foram analisadas em *M. ilicifolia* 222 bandas provenientes de 20 primers, que originaram, em média, 11,1 bandas por primer. Deste total, 126 (56,8%) foram monomórficas e 96 (43,2%) polimórficas. Como esperado, o nível de polimorfismo foi inferior ao encontrado em comparações interespecíficas.

O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) dentro dos bulks de cada população na espécie *M. ilicifolia* variou entre 0,87 e 0,96 com média de 0,92, e índices de similaridade entre as populações variou de 0,83 a 0,91 com média de 0,83.

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA (**Figura 3**) permitiu caracterizar cada uma das populações, já que os bulks internos permaneceram próximos e se agrupam com índices de confiança médios de 88%. As 18 populações analisadas foram

separadas em 3 grupos, porém com índices de confiança baixos. O grupo I foi formado pela população oriunda de Ponta Porã (MS), o grupo II, pelas populações de Santana do Livramento, Vale Verde, Canguçu e Unistalda, todas da região sul do Rio Grande do Sul, e o grupo III pelas 13 populações restantes. A separação destes três grupos foi confirmada pela análise de coordenadas principais (PCO), usando distâncias euclidianas (**Figura 4**) na qual também se observa uma tendência a separação entre a população de Ponta Porã e das populações da região sul do estado do Rio Grande do Sul.

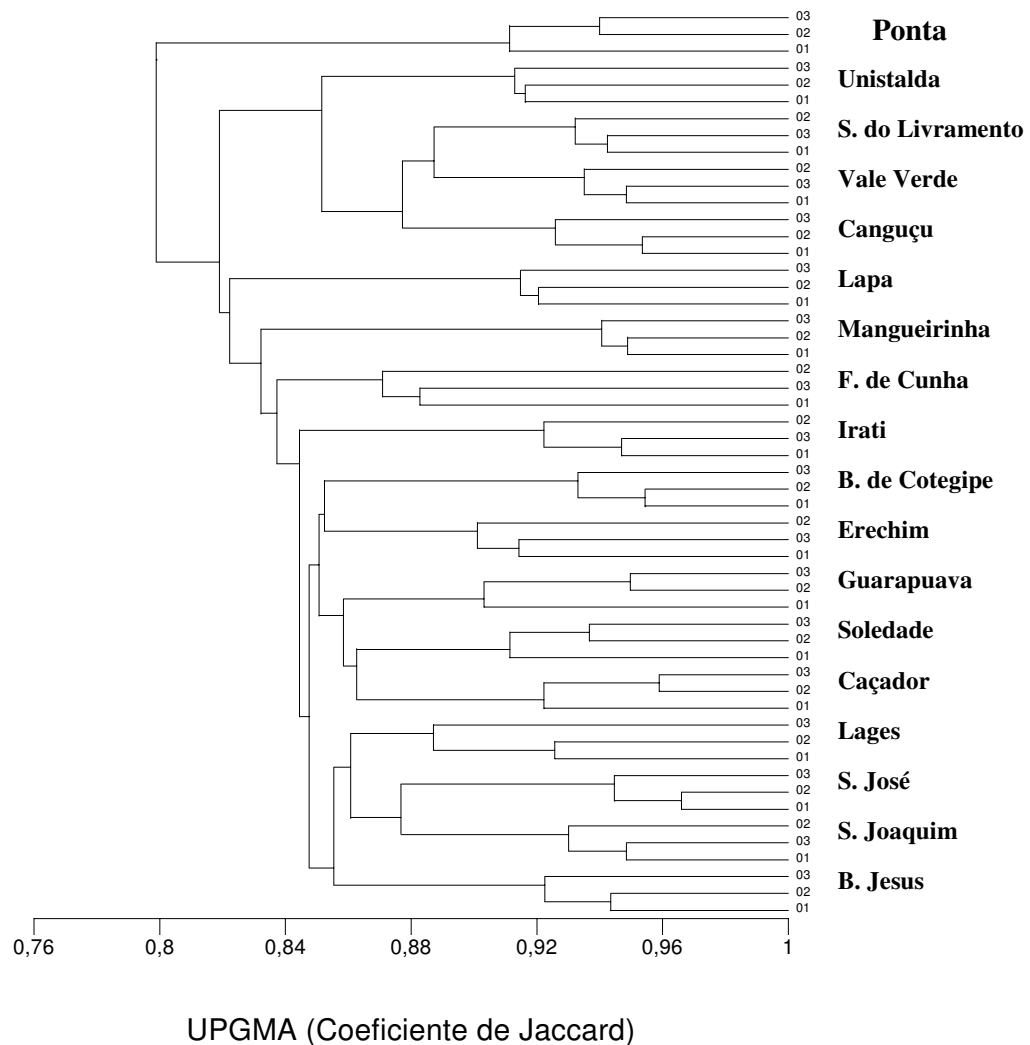


Figura 3. Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD em populações de *Maytenus ilicifolia*.

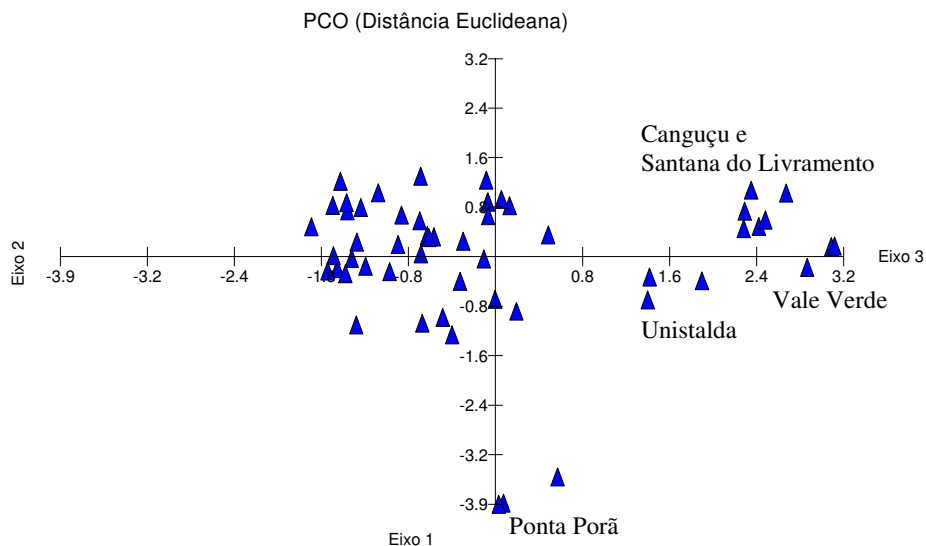


Figura 4. Análise de Coordenadas Principais por distância Euclidiana das 18 populações de *M. ilicifolia* analisadas.

A comparação entre os agrupamentos obtidos pela análise de marcadores moleculares e o agrupamento das regiões de coleta com base nas características ambientais (latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima (segundo classificação de Köppen), geomorfologia e tipos de solo) (**Figura 5**) demonstrando que a separação dos grupos corresponde a ambientes distintos.

As altas similaridades entre as populações e a baixa definição de grupos corroboram com os resultados obtidos por Bittencourt (11). Isto pode estar relacionado com o fato da região sudeste ser o centro primário de diversidade específica de *Maytenus* sp., sendo que *Maytenus ilicifolia* tem ocorrência preferencial no sub-bosque das florestas de araucária e às margens de rios (7) e nos agrupamentos arbóreos (capões) em regiões de estepes. A floresta de araucária tem uma origem recente (2.500 a 4.000 anos) na região sul do Brasil (21), sendo portanto também recente a ocorrência das espécies a ela relacionadas.

Mesmo com esta proximidade genética, percebe-se uma tendência de distanciamento e isolamento da população de Ponta Porã, possivelmente influenciado por um efeito de fundador e mantido pelo seu relativo isolamento das demais regiões de ocorrência da espécie. Na região sul, também ocorre uma tendência de agrupamento e distanciamento das populações de

Santana do Livramento, Canguçu, Unistalda e Vila Verde, possivelmente devido à pressão de seleção associada a diferenças climáticas e de vegetação. Considerando o centro de dispersão da espécie, a região sul corresponde a uma área marginal da distribuição, com ocupação de novos ambientes, o que normalmente acarreta variação das frequências alélicas.

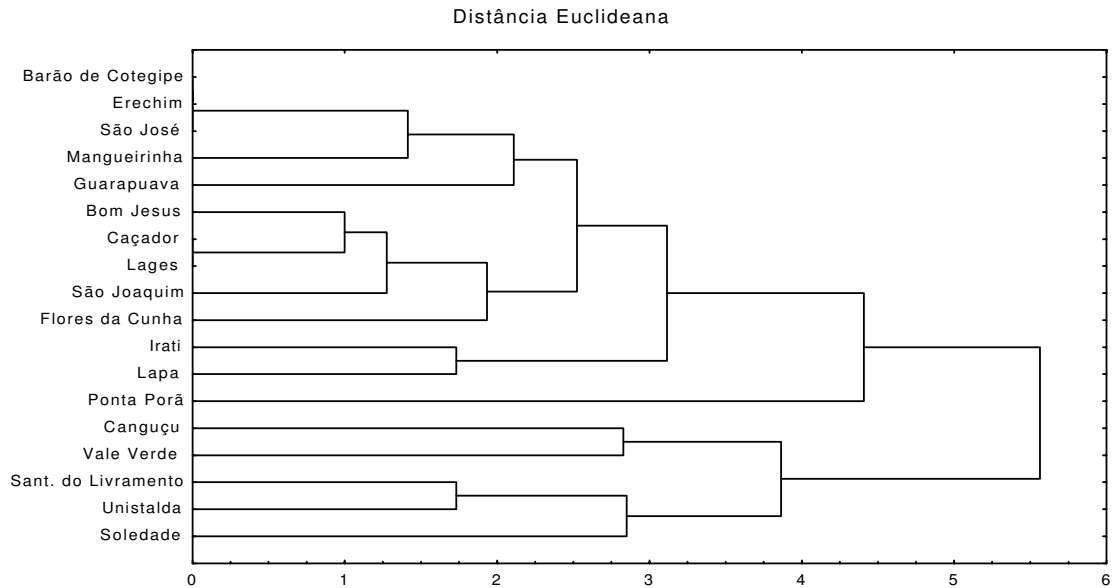


Figura 5. Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 18 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Köppen, geomorfologia e tipos de solo).

Os resultados obtidos permitem concluir que os marcadores moleculares RAPD são eficientes na diferenciação das espécies estudadas (*M. ilicifolia*, *M. aquifolia* e *M. evonymoidis*) e no estudo da variabilidade genética em *M. ilicifolia*, mostrando elevada similaridade genética nesta espécie, mas permitindo a separação das populações em grupos de similaridade que por sua vez estão relacionados com os distintos ambientes de ocorrência de *M. ilicifolia*, quais sejam os campos do sul do Brasil, a mata Atlântica e as serras de Mato Grosso do Sul.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e SCT - RS pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G. M. Antiulcerogenic affects of two *Maytenus* species in laboartory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34(1):21-27, 1991.
- 2- OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P. CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34:1, 29-41, 1991.
- 3- MELO, S. de F.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F.; SILVA, C. R. da; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; CALDEIRA de ARAUJO, A.; BERNARDO, M. F.; MELO, S. de F.; da COSTA, R. F.; da SILVA, C. R.; de OLIVEIRA, M. B. N. Effect of the *Cymbopogon ctratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 496:1, 33-38, 2001.
- 4- 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 Brasileiras**. Central de Medicamentos, CEME/AFIP, 1998. Brasília 128p.
- 5- SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONERI, R. **Plantas Medicinais: herbarium, Flora et Scientia**. Curitiba, 1987. 160p.
- 6- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. de O.; MANTOVANI, M. S. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cell. **Genetics and Molecular Biology**. 25(1):85-89, 2002.
- 7- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-amazônico**. 1992. 252 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 8- SIQUEIRA, M. **Análise Florística e Ordenação de Espécies Arbóreas da Mata Atlântica Através de Dados Binários**. 1994. 143 p. Tese (Mestrado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 9- FERREIRA E. M.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998, 220p.
- 10- VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATON, A.; SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flovonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**. 29:287-304, 2001.

- 11- BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Maytenus ilicifolia* por Meio de Marcadores RAPD.** 2000, 58 p. Tese (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 12- PERECIN, M. B. **Diversidade Genética em Populações Naturais de Espécies de Espinheira-Santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae).** 2000, 133 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 13- PERECIN, M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Variabilidade isoenzimática em populações naturais de espinheira-santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss e suas implicações para o manejo da conservação. **Rev. Brasileira Planta Médica.** 4(2):80-90, 2002.
- 14- DOYLE, J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Am J Bot.** 75:1238, 1988.
- 15- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18:6531-6535, 1990.
- 16- SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Univ. Sci. Bull.** 38:1409-1438, 1958.
- 17- YAP, I.; NELSON, R.J. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. **International Rice Research Institute.** Manila, Philippines. Discussion Paper series nº 14. 1996.
- 18- KRESOVICH, S.; WILLIAMS, J. G. K.; MCFERSON, J. R.; ROUTMAN, E. J.; SCHAAL, B. A. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. **Theor. Appl. Genet.** 85:190-196, 1992.
- 19- WEEDEN, N.F.; MUEHLBAUER, F.J.; LADIZINSKI, G. Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. **J. Heredity.** 83:123-129, 1992.
- 20- MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CECHET, M. L.; CARVALHO, A. Z.; ECHEVERRIGARAY, S. Variabilidade genética intra e interpopulacional em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, através de marcadores RAPD. **J. Heredity,** (submetido).
- 21- JOLY, C. A.; AIDAR, M. P. M.; KLINK, C. A.; MCGRATH, D. G.; MOREIRA, A.G.; MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D. C.; OLIVEIRA, A. A.; POTT, A.; RODAL, M. J. N.; SAMPAIO, E. V. S. B. Evolution of the Brazilian phytogeography classification systems: implications for biodiversity conservation. **Ciência e Cultura.** 51(5/6):331-348, 1999.

CAPÍTULO 6:

ESTUDO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS, VIA CROMATOGRÁFIA GASOSA (CG-EM) DE *Maytenus ilicifolia* MART. EX REISS, OBTIDO POR CO₂ A ALTA PRESSÃO.

ESTUDO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS, VIA CROMATOGRAFIA GASOSA (CG-EM) DE *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss, OBTIDO POR CO₂ A ALTA PRESSÃO.

Altemir J. Mossi^{a*}, Rogério L. Cansian^a, Alexandre Z. Carvalho^a, Cláudio Dariva^b, José Vladimir de Oliveira^b, Marcio Mazutti^b, Irajá do Nascimento F^o. e Sergio Echeverrigaray^d.

^a Laboratório de Biotecnologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Campus de Erechim, Erechim, RS, Brasil. E-mail: amosi@uricer.edu.br

^b Laboratório de Termodinâmica, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Campus de Erechim, Erechim, RS, Brasil. E-mail: cdariva@uri.com.br

^c Laboratório de Química Ambiental, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Campus de Erechim, Erechim, RS, Brasil. E-mail: iraja@uri.com.br

^d Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil. E-mail: selaguna@yahoo.com

Endereço para correspondência.

Av. Sete de Setembro, 1621

99 700-000, Erechim, RS, Brasil.

Fone: 55 54 520 9000

Fax: 55 54 520 9090

RESUMO

A utilização de plantas medicinais assume cada vez mais um papel importante na saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. *Maytenus ilicifolia* é uma planta medicinal utilizada no Brasil devido ao seu efeito antiulcerogênico, dentre outros. Neste trabalho, o óleo essencial de *Maytenus ilicifolia* foi obtido via extração com CO₂ a alta pressão, avaliando-se o efeito da granulometria, vazão, temperatura e pressão sobre a composição química dos extratos. O extrato foi separado em cinco frações de acordo com a quantidade de CO₂ (60, 120, 180, 240 e 480 g). O efeito dos tratamentos foi verificado pela aplicação da análise de variância, complementado pelo teste Tukey (p=0.05). Os resultados indicaram que o tamanho de partícula da amostra e a vazão do gás de arraste não influenciaram no rendimento do extrato, entretanto detectou-se uma influência significativa da temperatura e da densidade do solvente. Os extratos foram analisados por CG-EM onde foram identificados: Fitol, Esqualeno, Vitamina E, Stigmast-5-en-3-ol, Friedelan-3-ol, Friedelin, ácido dodecanóico e a geranil cetona.

Palavras chave : *Maytenus ilicifolia*, Extração em alta pressão, Análise química, Conservação da Natureza.

INTRODUÇÃO

O gênero *Maytenus* pertence à família Celastraceae que engloba 55 gêneros compreendendo 850 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais. Este gênero é um dos maiores desta família, onde 77 espécies são citadas para a flora Brasileira (1).

No Brasil, as espécies *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia* são utilizadas intensamente na medicina popular, sendo conhecidas como Espinheira Santa, Cancerosa e Cancarosa, dentre outras. *Maytenus ilicifolia* tem sua ocorrência natural na região Sul, sendo utilizadas popularmente na forma de chá para problemas estomacais, gastrite e úlcera. Souza-Formigori *et al.*(2), comprovaram o efeito antiulcerogênico de *Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia*, sendo que esta ação parece estar relacionada basicamente com duas classes de substâncias: fenóis e triterpenos, cujos teores ultrapassam a 1% na planta (3,4). Os princípios ativos 4-O-metilepigalocatequina, friedelina e friedelan-3-ol, nestas espécies apresentaram comprovada atividade antiúlcera gástrica (5). A atividade antiulcerogênica do extrato aquoso a quente (abafado) de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium* foi confirmada em ensaios com ratos. Frações de extratos brutos ricos em triterpenos do tipo friedelina e friedelan-3-ol apresentaram atividade superior à da cimetidina, a principal droga sintética utilizada como antiácido (2,6).

Um aspecto importante quando se trata do emprego de extratos e/ou óleos essenciais de plantas em fitoterapia diz respeito ao método de extração dos mesmos. É importante que se disponha de uma metodologia que não altere propriedades originais dos extratos, produza rendimentos brutos elevados e seja ambientalmente pouco agressivo, isto é, que não produza elevado impacto ambiental (tecnologias limpas). Neste cenário, a utilização dos fluidos supercríticos (FSC), ocorre de uma forma extremamente vantajosa para a utilização como solventes, pois os mesmos combinam as propriedades das fases líquidas e vapor. Os FSC possuem densidades próximas às dos líquidos (o que fortalece as suas propriedades de solvente). Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo de extração (7).

No processo de extração supercrítica (ESC), o rendimento bruto é geralmente alto quando comparado a processos convencionais; não há retenção de solvente nos sólidos, pois ao se descomprimir o extrator qualquer vestígio de solvente é evaporado; o gás que emana do separador praticamente não arrasta soluto devido ao seu baixo poder de

solubilização e o soluto é obtido com alto grau de pureza. Todas estas características apresentam-se atraentes na obtenção de extratos de plantas medicinais (8). A escolha de um solvente adequado em se tratando da utilização da ESC de produtos naturais deve atender alguns requisitos como: a facilidade de obtenção e armazenamento, baixa temperatura crítica (não degrada compostos termolábeis), moderada pressão crítica (baixando custos de bombeamento), ser inerte, não tóxico e não inflamável. O dióxido de carbono atende a estas condições e embora não seja um solvente poderoso, para compostos de baixa volatilidade quando comparado aos solventes orgânicos, pode se tornar seletivo pela manipulação da temperatura e pressão.

Catchpole (9) cita a utilização do FSC como uma alternativa para obtenção de “medicamentos” naturais, o dióxido de carbono é um solvente seletivo e pode ser utilizado para obtenção de componentes terapêuticos de interesse, sem o inconveniente de apresentar resíduos.

Este trabalho estuda o efeito da extração com CO₂ a alta pressão na obtenção de extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia*, como fonte de variação dos tratamentos foram testados os efeitos de pressão, temperatura, vazão e granulometria no rendimento bruto de extração e no comportamento de alguns compostos do extrato, dentre eles os triterpenos do tipo friedelina e friedelan-3-ol.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico. As amostras de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss foram coletadas no município de Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil. As folhas coletadas de diversas plantas foram secas em temperatura ambiente à sombra. Após secas, foram moídas em moinho de facas e homogeneizadas, permanecendo conservadas em ambiente inerte até o momento das análises. As extrações foram realizadas com aproximadamente 25 g de folhas, peneiradas e classificadas quanto a granulometria em peneiras da série Tyler. A análise do efeito da granulometria foi realizada utilizando três classes: mesh 35 (material retido na mesh 35), mesh 115 (material entre mesh 35 e 115) e mesh 200 (material retido entre mesh 115 e 200).

Equipamentos e Processo Experimental. Os experimentos foram realizados em uma unidade experimental de bancada, utilizando CO₂ (White & Martins com 99,9% de pureza) como solvente. A unidade experimental consiste, basicamente, de um cilindro de CO₂,

dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (ISCO 500 D), um extrator encamisado com volume interno aproximado de 100 mL, um tubo coletor de vidro, uma válvula micrométrica e um transdutor absoluto de pressão (Smar LD 301), conforme esquematizado na **Figura 1**. As extrações foram realizadas em triplicata com aproximadamente 480 g de CO₂ divididas em cinco frações (60, 120, 180, 240 e 480 g de CO₂). As temperaturas investigadas foram de 293 a 323°K, pressões entre 100 e 250 bar, vazões entre 1 e 3 g de CO₂ min⁻¹ e granulometrias de 35 a 200 mesh.

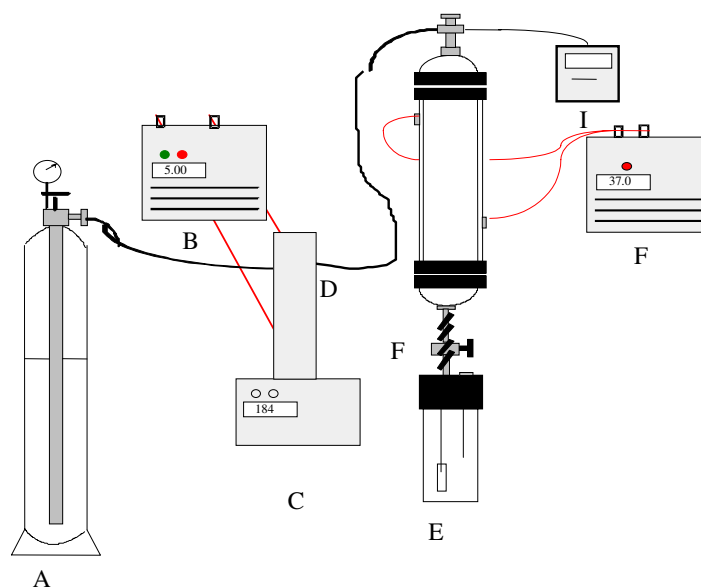


Figura 1 - Unidade experimental de extração de alta pressão. (A) cilindro de CO₂; (B,H) banhos termostáticos (Quimis) ; (C) bomba de alta pressão (ISCO 500 D); (D) extrator encamisado com volume interno aproximado de 100 mL; (E) tubo coletor de vidro, (F) válvula micrométrica.

Análise Instrumental. Os extratos foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas CG-EM (Shimadzu, Modelo QP 5050A). Foi empregada uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0.25 mm de diâmetro x 0.25 µm de espessura do filme); vazão do gás de arraste (hélio) de 1,0 mL.min⁻¹; detector em 1.0 Kv; modo split (1:10); interface em 583°K; coluna com programação: temperatura inicial de 338°K (3 min), primeira rampa de aquecimento 3°K por min até 533°K, segunda rampa de aquecimento de 2.5°K por min até a temperatura final de 585°K (10 min) e tempo de corte do solvente de 4 min. Os extratos foram diluídos em 40.000 mg.L⁻¹ em diclorometano (merck, bidestilado)

sendo injetado um volume padrão de 1 µL. Como padrão interno foi utilizada bifenila na concentração de 100 ppm. Os picos foram integrados no modo manual. A análise foi realizada comparando-se a área dos picos em relação ao padrão interno ou através de análise semiquantitativa pela área média dos picos, com relação ao padrão interno.

A identificação dos compostos foi feita pela da comparação dos tempos de retenção dos compostos padrões(Sigma-Aldrich co): Fitol, Esqualeno, Vitamina E, Stigmast-5-en-3-ol, Friedelan-3-ol e Friedelin, com aqueles presentes na amostra. Também foram comparados, para fins de identificação, os espectros de massas dos compostos padrões, dos compostos nas amostras e aqueles contidos na biblioteca do equipamento (Wiley), com aproximadamente 170.000 espectros. O ácido dodecanóico e a geranil acetona foram identificados exclusivamente através da biblioteca do sistema CG-EM. Os compostos analisados encontram-se na **Tabela 1**.

As amostras foram injetadas em triplicata e a análise estatística foi realizada através de ANOVA complementado pelo teste Tukey ($p=0.05$) no programa Statistica 5.0.

Tabela 1 – Lista dos compostos selecionados para estudo, após análise por Cromatografia Gasosa –EM acoplada a espectrometria de massas.

| Grupos | Compostos | Fórmula | Peso molecular (g/mol) | Tempo de retenção (min.) |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Grupo I | Geranil cetona | $C_{13}H_{22}O$ | 149 | 25.7 |
| | Fitol | $C_{20}H_{40}O$ | 296 | 49.7 |
| | Ácido dodecanóico | $C_{18}H_{34}O_2$ | 282 | 57.5 |
| Grupo II | Esqualeno | $C_{30}H_{50}$ | 410 | 69.2 |
| | Vitamina E | $C_{29}H_{50}O_2$ | 430 | 76.4 |
| | Stigmast-5-en-3-ol | $C_{29}H_{50}O$ | 414 | 80.6 |
| Grupo III | Friedelan-3-ol | $C_{30}H_{52}O$ | 428 | 84.8 |
| | friedelin | $C_{30}H_{50}O$ | 426 | 85.3 |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração por fluido supercrítico (EFS). A **Tabela 2** apresenta os resultados obtidos das extrações realizadas, foram avaliados os efeitos do tamanho de partícula, vazão do solvente, densidade e temperatura, pode ser observado que a temperatura e a densidade influenciaram positivamente no rendimento de extração, obtendo-se até 11.2 g de extrato por Kg de amostra.

Inicialmente, foi avaliado o efeito do tamanho das partículas das amostras no rendimento de extrato. Observaram-se rendimentos de extrato semelhantes entre as amostras com as granulometrias de 35, 115 e 200 mesh, sendo estes de 1.07; 0.98 e 1.04 % de extrato respectivamente, conforme observado na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Resultados das extrações realizadas em CO₂ alta pressão em *Maytenus ilicifolia*.

| Extração | Mesh | Vazão g CO ₂ .min ⁻¹ | T(°K) | Pressão (bar) | ρ g.cm ⁻³ | Rendimento (%) |
|----------|------|---|-------|---------------|-------------------------|-------------------|
| 1 | 200 | 2 | 308 | 175 | 0.841 | 1.04 |
| 2 | 115 | 2 | 308 | 175 | 0.841 | 0.98 |
| 3 | 35 | 2 | 308 | 175 | 0.841 | 1.07 |
| 4 | T* | 1 | 308 | 175 | 0.841 | 1.04 |
| 5 | T | 3 | 308 | 175 | 0.841 | 1.08 |
| 6 | T | 2 | 308 | 175 | 0.841 | 1.02 |
| 7 | T | 2 | 293 | 100 | 0.855 | 0.70 |
| 8 | T | 2 | 323 | 250 | 0.835 | 1.11 |
| 9 | T | 2 | 323 | 100 | 0.408 | 0.16 |
| 10 | T | 2 | 293 | 250 | 0.964 | 0.83 |

(*) amostra sem fracionamento por tamanho de partícula.

Alguns trabalhos da literatura (7,8,9), indicam um rendimento superior em amostras com menor tamanho de partícula, o que não foi observado neste estudo. Por outro lado, Gaspar *et al.* (10), estudando o efeito do preparo de amostras de orégano no processo de extração com CO₂, constatou uma diferença significativa no rendimento e na composição

do óleo essencial em função da granulometria, onde partículas menores apresentaram um rendimento menor de óleo essencial. Os autores argumentam que partículas com maior área superficial apresentam uma maior camada superficial e proporcionam um maior rendimento; porém, um processo intenso de moagem pode levar a uma perda de óleo essencial (11).

A **Figura 2** apresenta também a influência da vazão do fluido no processo de extração, onde pode ser observado que as vazões testadas (1, 2 e 3 g CO₂.min⁻¹) apresentaram um comportamento semelhante. Tal fato está indicando que, dentro da faixa de vazões investigadas, o sistema está em equilíbrio termodinâmico, o qual é influenciado somente pela temperatura e pressão de extração (12). A vazão de CO₂ foi mantida em um valor intermediário (2 g.min⁻¹) para diminuir o tempo de extração e possibilitar uma margem de segurança para o sistema se encontrar em equilíbrio. Uma vez que a granulometria apresentou uma diferença não significativa no rendimento de extração, optou-se por trabalhar com a amostra em estado original, sem fracioná-la em tamanhos específicos.

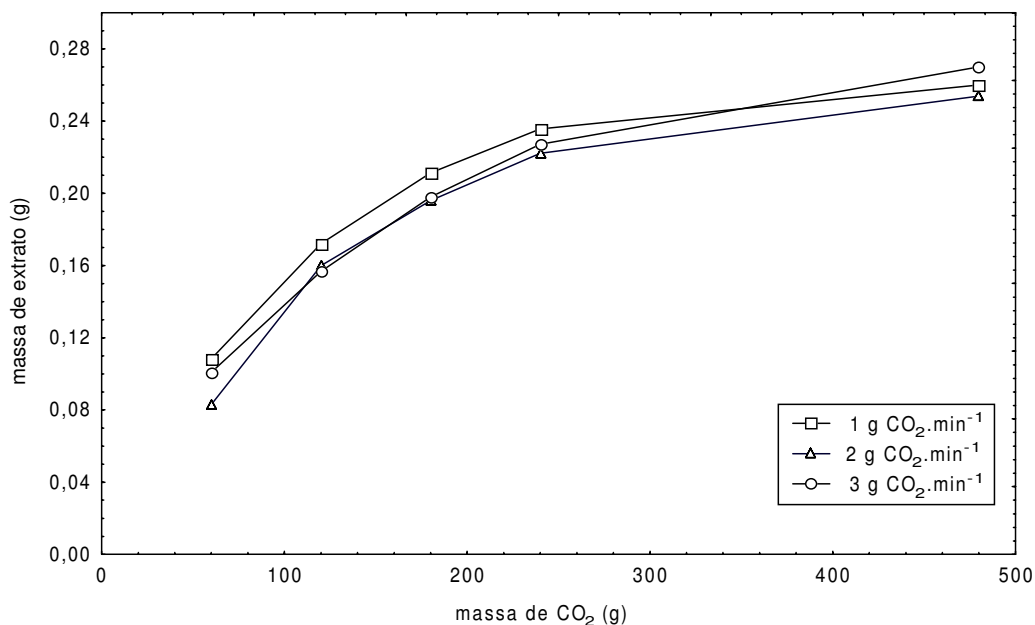


Figura 2 - Curvas de extração com as diferentes vazões testadas (1,2 e 3 g de CO₂.min⁻¹).

Para avaliar o efeito da temperatura e pressão (densidade) sobre o rendimento de extração, a granulometria e a vazão de CO₂ foram mantidas constantes. A **Figura 3** apresenta o efeito da temperatura sobre o rendimento do extrato. Comparando as extrações

6, 7 e 8 (**Tabela 2**), onde a densidade se mantém praticamente constante $\rho \cong 0,84 \text{ g.cm}^{-3}$ observa-se um acréscimo no rendimento de extração à medida que a temperatura aumenta. Tal fato é atribuído, principalmente ao aumento da pressão de vapor dos compostos mais voláteis e semi-voláteis, aumento da difusão da mistura e diminuição da viscosidade do solvente. Estes que aumentam o rendimento de extração (13). O rendimento aumentou em 58 % com o incremento da temperatura em 30°K , mantida a densidade do solvente bastante semelhante ($\rho \cong 0,84 \text{ g.cm}^{-3}$), mostrando um incremento bastante significativo no rendimento de extração com aumento da temperatura.

Comparando-se as extrações 8 e 9 evidencia-se a influência da densidade no rendimento do extrato (**Figura 3**), onde aumentando a densidade do solvente ocorre um incremento na ordem de 600% no rendimento, tal fato ocorre devido ao aumento muito pronunciado no poder de solvatação (densidade) do fluido (**Tabela 2**). Comparando as extrações 7 e 10 observa-se um aumento menos significativo no rendimento do extrato, fato este explicado pela menor diferença de densidade entre as extrações quando se mantém a temperatura constante. Assim sendo, neste trabalho a temperatura e densidade apresentam um efeito positivo no rendimento de extração, este efeito é normalmente observado (13,14), sendo que para o extrato de *Maytenus ilicifolia* a densidade mostrou exercer maior influência que a temperatura.

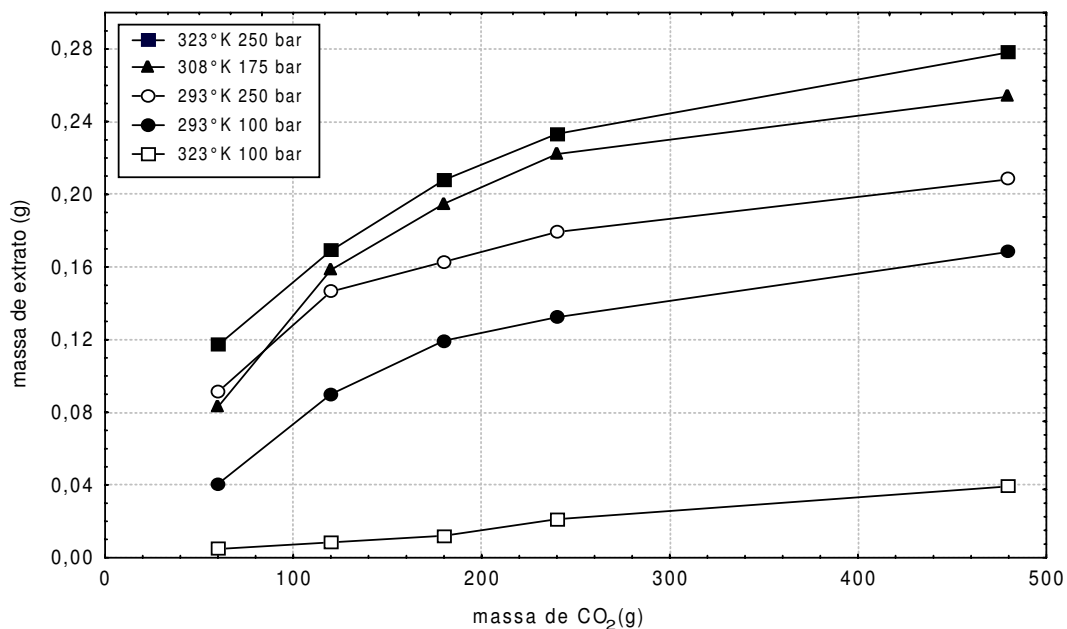


Figura 3 - Curvas de extração em diferentes temperaturas e pressões (densidades).

Análise cromatográfica dos extratos. Os extratos obtidos por ESC, foram analisados por CG-EM determinando-se a área média dos picos dos compostos voláteis e semi-voláteis selecionados, em relação ao padrão interno (**Figura 1**). Como se observa na **Tabela 1**, os oito compostos analisados foram divididos em três grupos, sendo o primeiro grupo formado por compostos de menor peso molecular (149 a 282), em um segundo grupo os compostos de maior peso molecular (410 a 414) e em um terceiro grupo os triterpenos, também de alto peso molecular (426 e 428), porém com estrutura diferente aos anteriores e de grande importância medicinal. Nos estudos de granulometria e vazão, onde o rendimento de extração foi bastante semelhante, as análises foram realizadas baseadas na área dos picos dos compostos em relação ao padrão interno. Análises semiquantitativas foram utilizadas nos estudos da influência da temperatura e densidade, que apresentaram significativas diferenças de rendimentos de extração.

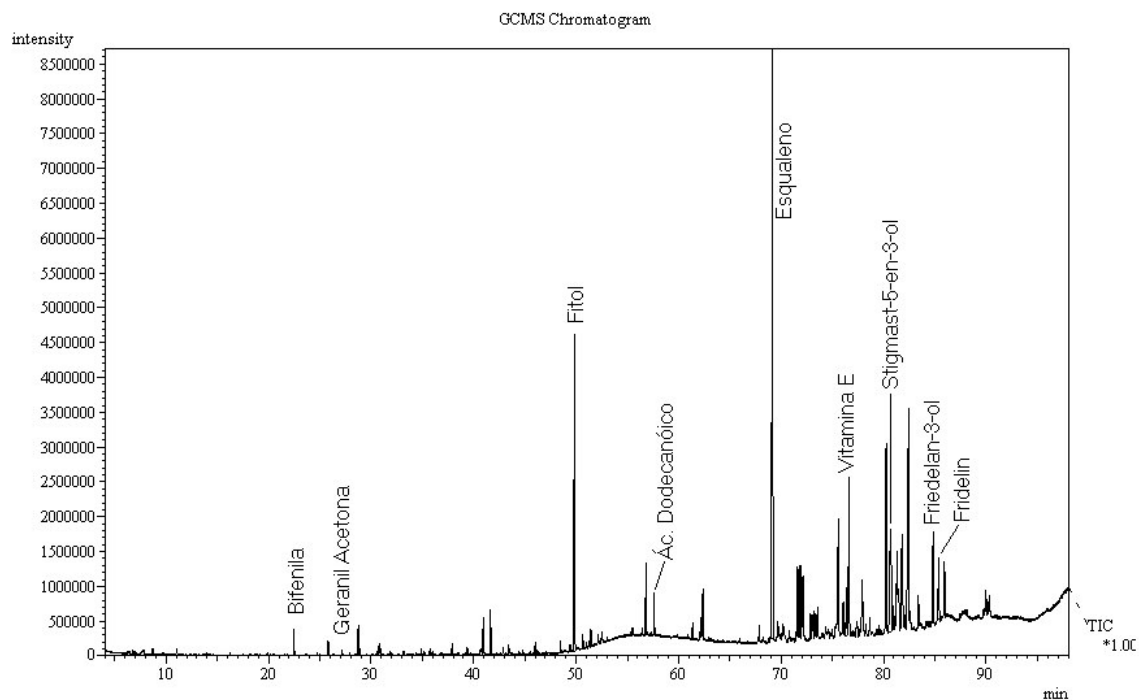


Figura 4- Cromatograma de ion total do extrato de *Maytenus ilicifolia* obtido em fluido supercrítico (175 bar, 308°K).

A **Tabela 3**, apresenta os resultados da caracterização química dos extratos obtidos com CO₂ alta pressão onde foi avaliada a influência da granulometria (extrações 1, 2 e 3).

Nesta tabela os compostos apresentam-se agrupados como discutido anteriormente. Pode ser observado que partículas menores levaram a maiores concentrações para os compostos dos grupos I e III, não havendo diferença significativa para o grupo II.

A **Tabela 4** apresenta a análise de todos os compostos individualmente. Pode ser observado que a geranyl cetona e o stigamast-5-en-3-ol apresentaram melhores teores nas granulometrias de 115 e 200 mesh, respectivamente. Como mencionado anteriormente, estes resultados indicam o uso da amostra sem classificação por granulometria como a melhor alternativa para estudo dos compostos de interesse. Na **Tabela 3**, pode também ser observado que os compostos do grupo I e II encontram-se em maior concentração nas primeiras frações (até 120 g de CO₂), enquanto que os compostos do grupo III tendem a aumentar sua concentração nas frações intermediárias e finais (120~480 g de CO₂). Coelho *et al.* (12), observaram que os compostos com menor peso molecular são extraídos no início do processo, isto não foi observado nos grupos I e II, possivelmente pelo fato das condições de extração (temperatura e densidade) serem elevadas. O mesmo não foi observado para as substâncias do grupo III que possivelmente tiveram seu comportamento influenciado pela estrutura das moléculas, que apresentam densidade superior devido aos seus anéis aromáticos (**Figura 4**).

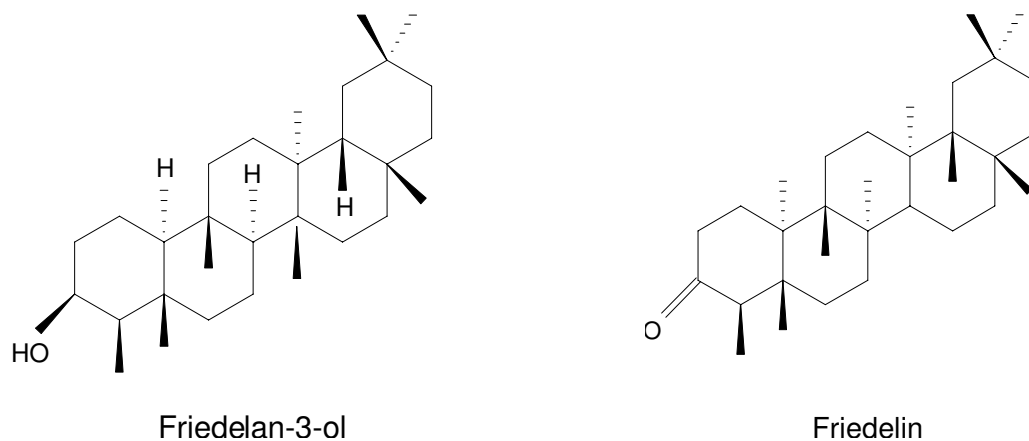


Figura 5 - Estrutura dos compostos padrões do grupo III (triterpenos).

Tabela 3 – Resultados da análise da ANOVA e teste Tukey para verificação da influência do tamanho das partículas na distribuição dos diferentes grupos de compostos analisados no extrato de *Maytenus ilicifolia*.

| Compostos | mesh | Massa de CO ₂ (g) | | | | |
|-----------|------|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Grupo I | 35a | 4.034 ^a | 2.182 ^b | 1.456 ^c | 0.868 ^d | 0.531 ^d |
| | 115b | 2.355 ^a | 1.523 ^b | 0.885 ^c | 1.117 ^c | 0.686 ^c |
| | 200b | 3.650 ^a | 0.708 ^b | 0.640 ^b | 0.675 ^b | 0.691 ^b |
| Grupo II | 35a | 53.812 ^a | 37.955 ^b | 26.486 ^c | 12.939 ^d | 5.747 ^d |
| | 115a | 46.481 ^a | 37.364 ^a | 22.866 ^b | 25.366 ^b | 7.221 ^c |
| | 200a | 72.802 ^a | 21.750 ^b | 17.307 ^b | 19.427 ^b | 5.354 ^c |
| Grupo III | 35a | 4.348 ^b | 4.431 ^b | 6.597 ^a | 7.467 ^a | 5.855 ^b |
| | 115b | 4.512 ^a | 3.715 ^a | 4.441 ^a | 4.862 ^a | 4.652 ^a |
| | 200b | 3.367 ^b | 3.940 ^{ab} | 3.943 ^{ab} | 6.005 ^a | 5.399 ^{ab} |

Áreas médias (n=3) dos picos em relação ao padrão interno.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

A **Tabela 5**, apresenta a influência da vazão do solvente na concentração dos compostos. Neste caso a vazão de 2 g.min⁻¹ apresentou os melhores resultados para os grupos II e III e a vazão de 1 g.min⁻¹ para o grupo I. Estes resultados indicam que possivelmente esteja ocorrendo algum tipo de arraste para os compostos dos grupos II e III. Estes resultados, em conjunto com os resultados de rendimento de extrato, onde não houve diferença significativa de rendimento, justificam, novamente a escolha da vazão intermediária de 2 g.min⁻¹ para avaliar os demais efeitos (temperatura e Pressão). Observa-se ainda na **Tabela 5**, a mesma tendência dos compostos pertencentes aos grupos I e II apresentarem uma maior concentração nas primeiras frações e os do grupo III nas últimas frações da extração foi novamente constatada. Esta observação está baseada no fato dos compostos dos grupos I e II já terem sido extraídos em maior quantidade no início da extração, o que possibilita uma maior concentração dos compostos do grupo III na fase final. Similarmente ao apresentado para o efeito da granulometria a **Tabela 6** apresenta a distribuição de todos os compostos analisados individualmente.

Tabela 4 – Resultado da aplicação de ANOVA e teste Tukey para verificação da influência do tamanho das partículas na distribuição dos diferentes compostos analisados no extrato.

| Composto | mesh | MASSA (gCO ₂) | | | | |
|-------------------|------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Geranil | 35b | 0.097 ^a | 0.048 ^b | 0.025 ^c | 0.013 ^c | 0.014 ^c |
| Cetona | 115a | 0.114 ^a | 0.049 ^b | 0.022 ^d | 0.035 ^c | 0.014 ^d |
| | 200b | 0.137 ^a | 0.018 ^b | 0.022 ^{bc} | 0.013 ^c | 0.005 ^c |
| Fitol | 35a | 3.490 ^a | 1.866 ^b | 1.266 ^c | 0.778 ^d | 0.495 ^d |
| | 115b | 1.857 ^a | 1.253 ^b | 0.759 ^c | 0.948 ^{bc} | 0.658 ^c |
| | 200b | 3.081 ^a | 0.620 ^b | 0.565 ^b | 0.621 ^b | 0.681 ^b |
| Ácido Dodecanóico | 35a | 0.447 ^a | 0.268 ^b | 0.165 ^c | 0.077 ^d | 0.023 ^d |
| | 115b | 0.383 ^a | 0.220 ^b | 0.103 ^c | 0.133 ^c | 0.014 ^d |
| | 200c | 0.432 ^a | 0.059 ^b | 0.053 ^b | 0.041 ^b | 0.005 ^b |
| Esqualeno | 35a | 36.109 ^a | 22.198 ^b | 13.593 ^c | 5.382 ^d | 2.417 ^d |
| | 115a | 31.167 ^a | 22.211 ^b | 10.332 ^c | 13.514 ^c | 1.896 ^d |
| | 200a | 56.793 ^a | 7.103 ^b | 4.733 ^{bc} | 1.995 ^{bc} | 0.221 ^c |
| Vitamina E | 35a | 9.784 ^a | 8.226 ^{ab} | 5.899 ^b | 2.779 ^c | 1.117 ^c |
| | 115a | 7.997 ^a | 7.358 ^a | 5.080 ^a | 4.873 ^a | 1.240 ^b |
| | 200a | 6.513 ^a | 5.877 ^a | 5.482 ^a | 6.540 ^a | 0.707 ^b |
| Stimast-5-en-ol | 35c | 6.221 ^a | 5.957 ^a | 5.645 ^a | 3.974 ^{ab} | 1.896 ^b |
| | 115b | 6.526 ^a | 6.041 ^a | 5.855 ^{ab} | 5.580 ^{ab} | 3.506 ^b |
| | 200a | 7.461 ^{ab} | 6.753 ^{ab} | 5.316 ^{bc} | 8.692 ^a | 4.014 ^c |
| Friedelan-3-ol | 35a | 2.183 ^b | 2.173 ^b | 3.484 ^a | 4.231 ^a | 3.358 ^a |
| | 115b | 2.484 ^a | 1.972 ^a | 2.516 ^a | 2.807 ^a | 2.352 ^a |
| | 200b | 1.441 ^b | 2.054 ^{ab} | 2.116 ^{ab} | 3.070 ^a | 2.803 ^a |
| Friedelin | 35a | 2.165 ^b | 2.258 ^{ab} | 3.113 ^{ab} | 3.237 ^a | 2.496 ^{ab} |
| | 115b | 2.027 ^a | 1.743 ^a | 1.925 ^a | 2.055 ^a | 2.300 ^a |
| | 200b | 1.926 ^{ab} | 1.886 ^b | 1.827 ^b | 2.934 ^a | 2.596 ^{ab} |

Áreas médias (n=3) dos picos em relação ao padrão interno.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

Tabela 5 – Resultados de ANOVA e teste Tukey relativo à influência da vazão do solvente da extração na distribuição dos diferentes grupos analisados no extrato.

| Composto | Vazão CO ₂ g.min ⁻¹ | MASSA (gCO ₂) | | | | |
|-----------|--|---------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Grupo I | 1a | 3.313 ^a | 1.428 ^{cd} | 1.364 ^d | 1.801 ^c | 2.696 ^b |
| | 2b | 2.509 ^a | 1.616 ^b | 1.294 ^b | 1.338 ^b | 2.256 ^a |
| | 3c | 2.354 ^a | 1.208 ^b | 1.174 ^b | 1.027 ^b | 1.353 ^b |
| Grupo II | 1b | 63.452 ^a | 29.964 ^b | 14.969 ^c | 17.767 ^c | 17.074 ^c |
| | 2a | 51.619 ^a | 39.057 ^b | 31.433 ^{bc} | 25.549 ^c | 28.470 ^{bc} |
| | 3a | 57.146 ^a | 37.188 ^b | 34.947 ^{bc} | 26.081 ^c | 26.308 ^{bc} |
| Grupo III | 1b | 3.914 ^b | 3.962 ^b | 3.709 ^b | 6.593 ^a | 8.487 ^a |
| | 2a | 4.893 ^c | 4.177 ^c | 7.133 ^b | 6.524 ^{bc} | 11.379 ^a |
| | 3b | 4.030 ^b | 4.428 ^b | 5.200 ^b | 6.109 ^b | 10.463 ^a |

Áreas médias (n=3) dos picos em relação ao padrão interno.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

Os resultados da **Tabela 7**, mostram um efeito positivo da temperatura sobre o rendimento dos compostos dos grupos I e III, sendo o incremento em torno de 160 %. O grupo II não apresentou incremento significativo, porém, de acordo com a **Tabela 8** (análise dos comportamentos individuais), um incremento significativo para a Vitamina E e para o Stigmast-5-en-3-ol foi observado. Tal fato não ocorreu para o esqualeno, composto majoritário, este fato ocasionou uma diferença não significativa para o grupo II. Pode ser notado que a maior quantidade de compostos extraídos em todos os grupos situam-se nas 3 frações iniciais (60 a 180 g CO₂), as quais com 37,5% da massa de CO₂ utilizada, foram extraídos cerca de 75, 90 e 60 % da massa total dos compostos analisados, respectivamente.

Tabela 6 – Resultados de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da vazão do solvente da extração na distribuição dos diferentes compostos analisados no extrato.

| Composto | Vazão CO ₂ g.min ⁻¹ | MASSA (gCO ₂) | | | | |
|-----------------|--|---------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Geranil | 1a | 0.168 ^a | 0.035 ^b | 0.017 ^{bc} | 0.016 ^c | 0.0096 ^c |
| Cetona | 2b | 0.103 ^a | 0.040 ^b | 0.017 ^c | 0.012 ^c | 0.015 ^c |
| | 3c | 0.081 ^a | 0.031 ^b | 0.020 ^b | 0.016 ^b | 0.014 ^b |
| Fitol | 1a | 2.649 ^a | 1.247 ^b | 1.307 ^b | 1.729 ^b | 2.646 ^a |
| | 2b | 2.029 ^a | 1.381 ^b | 1.183 ^b | 1.258 ^b | 2.150 ^a |
| | 3c | 1.920 ^a | 1.021 ^b | 1.019 ^b | 0.931 ^b | 1.258 ^b |
| Ácido | 1a | 0.497 ^a | 0.146 ^b | 0.039 ^b | 0.055 ^b | 0.041 ^b |
| Dodecanóico | 2a | 0.377 ^a | 0.194 ^b | 0.094 ^{bc} | 0.070 ^c | 0.091 ^{bc} |
| | 3a | 0.353 ^a | 0.158 ^b | 0.134 ^b | 0.081 ^b | 0.081 ^b |
| Esqualeno | 1a | 42.853 ^a | 12.107 ^b | 4.195 ^c | 3.439 ^c | 3.749 ^c |
| | 2b | 34.952 ^a | 22.048 ^b | 10.607 ^c | 7.610 ^c | 8.421 ^c |
| | 3b | 37.692 ^a | 18.559 ^b | 14.797 ^b | 9.486 ^c | 9.661 ^c |
| Vitamina E | 1b | 12.927 ^a | 11.497 ^a | 4.954 ^b | 4.949 ^b | 4.647 ^b |
| | 2a | 10.901 ^a | 11.379 ^a | 11.814 ^a | 8.435 ^a | 8.382 ^a |
| | 3a | 13.598 ^a | 12.599 ^a | 11.986 ^a | 7.900 ^b | 7.883 ^b |
| Stimast-5-en-ol | 1ab | 7.671 ^{abc} | 6.360 ^{bc} | 5.820 ^c | 9.378 ^a | 8.677 ^{ab} |
| | 2a | 5.767 ^b | 5.900 ^b | 9.012 ^a | 9.503 ^a | 11.667 ^a |
| | 3b | 5.928 ^c | 6.029 ^{bc} | 8.164 ^{abc} | 8.694 ^{ab} | 8.7623 ^a |
| Friedelan-3-ol | 1a | 2.023 ^b | 2.194 ^b | 2.026 ^b | 3.565 ^a | 4.232 ^a |
| | 2a | 2.500 ^c | 2.330 ^c | 4.236 ^b | 3.328 ^{bc} | 5.911 ^a |
| | 3a | 2.215 ^b | 2.462 ^b | 2.690 ^b | 3.261 ^b | 5.735 ^a |
| Friedelin | 1a | 1.890 ^{bc} | 1.768 ^c | 1.683 ^c | 3.038 ^b | 4.255 ^a |
| | 2a | 2.393 ^{bc} | 1.847 ^c | 2.897 ^{bc} | 3.196 ^b | 5.468 ^a |
| | 3a | 1.815 ^b | 1.966 ^b | 2.510 ^b | 2.848 ^b | 4.728 ^a |

Áreas médias (n=3) dos picos em relação ao padrão interno.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

Tabela 7 – Resultados da aplicação da ANOVA e teste Tukey sobre a influência da temperatura de extração na distribuição dos diferentes grupos analisados no extrato (densidade constante em aproximadamente 0,84 g CO₂/mL).

| Composto | T(°K) | MASSA (gCO ₂) | | | | |
|-----------|------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Grupo I | 293 ^c | 7.225 ^a | 5.200 ^b | 1.372 ^c | 0.429 ^c | 0.024 ^c |
| | 308 ^b | 8.320 ^a | 4.881 ^b | 1.884 ^c | 1.461 ^c | 0.722 ^c |
| | 323 ^a | 19.301 ^a | 5.998 ^b | 4.778 ^{bc} | 3.744 ^c | 2.941 ^c |
| Grupo II | 293 ^a | 138.269 ^a | 128.754 ^a | 50.832 ^b | 21.751 ^{bc} | 1.053 ^c |
| | 308 ^a | 171.170 ^a | 118.782 ^b | 45.767 ^c | 27.899 ^{cd} | 9.110 ^d |
| | 323 ^a | 240.573 ^a | 68.762 ^b | 35.083 ^{bc} | 18.733 ^c | 8.780 ^c |
| Grupo III | 293 ^c | 11.370 ^a | 10.513 ^b | 6.113 ^{bc} | 2.971 ^{cd} | 0.168 ^d |
| | 308 ^b | 16.226 ^a | 12.614 ^{ab} | 10.386 ^{bc} | 7.125 ^{cd} | 3.641 ^d |
| | 323 ^a | 20.948 ^a | 16.557 ^{ab} | 15.505 ^b | 14.392 ^b | 13.004 ^b |

Médias das análises semiquantitativas (n=3) da massa em mg presente no extrato para cada 60 g de CO₂ utilizado na extração.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

O efeito da densidade do solvente de extração, **Tabela 9**, foi a variável que apresentou os resultados mais significativos. Este efeito foi observado em todos os grupos, sendo cerca de 100, 300 e 900%, para os grupos I, II e III respectivamente. Observa-se que o efeito positivo se intensifica para compostos de maior peso molecular, como os triterpenos. Estudos realizados por Simándi *et al.*(15), constataram que a extração por FSC é eficiente e seletiva para os triterpenos β-amyrin e β-sitosterol, quando comparado com a extração por soxhlet. Neste mesmo trabalho obteve incremento positivo na extração destes triterpenos com aumento da temperatura e densidade do solvente supercrítico.

Tabela 8 – Resultados da análise de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da temperatura de extração na distribuição dos compostos analisados no extrato (densidade constante em aproximadamente 0,84 g CO₂/mL).

| Composto | T(°K) | MASSA (gCO ₂) | | | | |
|-------------------|-------|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Geranil | 293a | 0.320 ^a | 0.164 ^b | 0.033 ^c | 0.008 ^c | 0.0005 ^c |
| Cetona | 308a | 0.341 ^a | 0.124 ^b | 0.025 ^c | 0.013 ^c | 0.005 ^c |
| | 323a | 0.482 ^a | 0.053 ^b | 0.026 ^b | 0.015 ^b | 0.006 ^b |
| Fitol | 293c | 5.781 ^a | 4.251 ^a | 1.155 ^b | 0.370 ^b | 0.021 ^b |
| | 308b | 6.729 ^a | 4.170 ^b | 1.722 ^c | 1.373 ^c | 0.688 ^c |
| | 323a | 17.104 ^a | 5.725 ^b | 4.625 ^{bc} | 3.661 ^{cd} | 2.905 ^d |
| Ácido Dodecanóico | 293a | 1.124 ^a | 0.784 ^b | 0.183 ^c | 0.050 ^c | 0.003 ^c |
| | 308a | 1.230 ^a | 0.587 ^b | 0.137 ^c | 0.075 ^c | 0.029 ^c |
| | 323a | 1.715 ^a | 0.220 ^b | 0.128 ^b | 0.069 ^b | 0.030 ^b |
| Esqualeno | 293a | 95.273 ^a | 81.936 ^a | 21.980 ^b | 7.179 ^{bc} | 0.343 ^c |
| | 308a | 115.900 ^a | 66.585 ^b | 15.444 ^c | 8.310 ^c | 2.695 ^c |
| | 323a | 165.973 ^a | 25.017 ^b | 10.335 ^{bc} | 5.313 ^{bc} | 2.135 ^c |
| Vitamina E | 293b | 25.725 ^{ab} | 29.919 ^a | 19.050 ^b | 8.204 ^c | 0.343 ^c |
| | 308a | 36.148 ^a | 34.366 ^a | 17.201 ^b | 9.211 ^{bc} | 2.682 ^c |
| | 323ab | 45.323 ^a | 23.005 ^b | 9.690 ^c | 4.983 ^c | 2.314 ^c |
| Stimast-5-en-ol | 293c | 17.271 ^a | 16.898 ^a | 9.802 ^b | 6.368 ^b | 0.367 ^c |
| | 308b | 19.122 ^a | 17.831 ^{ab} | 13.121 ^{bc} | 10.378 ^c | 3.733 ^d |
| | 323a | 29.276 ^a | 20.741 ^b | 15.058 ^c | 8.437 ^d | 3.331 ^d |
| Friedolean-3-ol | 293c | 6.457 ^a | 5.937 ^a | 3.748 ^{ab} | 1.785 ^{bc} | 0.0940 ^c |
| | 308b | 8.290 ^a | 7.037 ^a | 6.167 ^{ab} | 3.634 ^{bc} | 1.891 ^c |
| | 323a | 10.799 ^a | 8.902 ^{ab} | 8.707 ^{ab} | 8.167 ^{ab} | 7.526 ^b |
| Friedelin | 293c | 4.912 ^a | 4.576 ^a | 2.366 ^{ab} | 1.186 ^b | 0.074 ^b |
| | 308b | 7.936 ^a | 5.577 ^{ab} | 4.218 ^{bc} | 3.490 ^{bc} | 1.750 ^c |
| | 323a | 10.148 ^a | 7.656 ^{ab} | 6.797 ^b | 6.225 ^b | 5.478 ^b |

Médias das análises semiquantitativas (n=3) da massa em mg presente no extrato para cada 60 g de CO₂ utilizado na extração.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

Tabela 9 – Resultados da análise de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da densidade de extração na distribuição dos diferentes grupos analisados no extrato (temperatura constante em aproximadamente 323°K).

| Composto | Densidade g.cm ⁻³ | MASSA (gCO ₂) | | | | |
|-----------|---------------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Grupo I | 0.408 ^b | 2.532 ^a | 2.808 ^a | 2.838 ^a | 2.899 ^a | 2.909 ^a |
| | 0.835 ^a | 19.301 ^a | 5.998 ^b | 5.778 ^{bc} | 3.744 ^c | 2.941 ^c |
| Grupo II | 0.408 ^b | 16.459 ^a | 7.260 ^a | 10.972 ^a | 13.960 ^a | 12.684 ^a |
| | 0.835 ^a | 240.573 ^a | 68.762 ^b | 35.082 ^c | 18.733 ^{cd} | 7.780 ^d |
| Grupo III | 0.408 ^b | 2.676 ^a | 1.523 ^a | 2.13 ^a | 1.821 ^a | 0.956 ^a |
| | 0.835 ^a | 20.948 ^a | 16.557 ^b | 15.504 ^b | 14.392 ^b | 13.004 ^b |

Médias das análises semiquantitativas (n=3) da massa em mg presente no extrato para cada 60 g de CO₂ utilizado na extração.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

Estudos realizados por Lanças *et al.*(16), demonstraram ocorrer um incremento na extração de friedolen-3-ol e friedelin em *Maytenus ilicifolia* com a utilização de co-solventes na EFS. Os autores citam uma baixa eficiência no processo de extração quando não são utilizados co-solventes. Tal fato pode ter ocorrido em função da baixa densidade do solvente na extração, pois a mesma ocorreu a 338°K e 80 bar em uma ρ de aproximadamente 0,18 g.cm⁻³. Na **Tabela 10** (análise dos compostos individualmente), percebe-se que a geranil cetona, apresenta um maior rendimento na primeira fração mesmo com baixa densidade do solvente, isto ocorre possivelmente pelo baixo peso molecular deste composto. Neste contexto é possível avaliar que com o aumento da temperatura e da densidade, um incremento muito significativo para os triterpenos (friedolean-3-ol e friedelin), compostos que são atribuídas propriedades medicinais (2,6), foi alcançado. Para todos os grupos, percebe-se também que quando a extração ocorre à baixa densidade, a quantidade de massa extraída de composto permanece constante em relação à quantidade de CO₂ utilizado e, como esperado, quando a densidade do solvente aumenta os compostos que são extraídos em maior quantidade.

Tabela 10 – Resultados da análise de ANOVA e teste Tukey sobre a influência da densidade do solvente de extração na distribuição dos diferentes compostos analisados no extrato (temperatura constante em aproximadamente 323° K).

| Composto | Densidade g.cm ⁻³ | MASSA (gCO ₂) | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | | 60 | 120 | 180 | 240 | 480 |
| Geranyl | 0.408b | 0.156 ^a | 0.079 ^b | 0.057 ^c | 0.070 ^{bc} | 0.033 ^d |
| Cetona | 0.835a | 0.482 ^a | 0.053 ^b | 0.025 ^c | 0.015 ^{cd} | 0.006 ^d |
| Fitol | 0.408b | 2.022 ^a | 2.451 ^a | 2.550 ^a | 2.583 ^a | 2.732 ^a |
| | 0.835a | 17.104 ^a | 5.725 ^b | 4.625 ^{bc} | 3.661 ^c | 2.905 ^c |
| Ácido Dodecanóico | 0.408b | 0.353 ^a | 0.278 ^a | 0.232 ^a | 0.245 ^a | 0.144 ^a |
| | 0.835a | 1.715 ^a | 0.220 ^b | 0.128 ^b | 0.068 ^b | 0.030 ^b |
| Esqualeno | 0.408b | 11.403 ^a | 5.121 ^a | 7.666 ^a | 10.323 ^a | 9.865 ^a |
| | 0.835a | 165.973 ^a | 25.017 ^b | 10.335 ^c | 5.313 ^c | 2.135 ^c |
| Vitamina E | 0.408b | 2.333 ^a | 0.469 ^a | 1.436 ^a | 1.778 ^a | 1.425 ^a |
| | 0.835a | 45.323 ^a | 23.005 ^b | 9.690 ^c | 4.983 ^c | 2.314 ^c |
| Stigmast- 5-en-3- ol | 0.408b | 2.723 ^a | 1.669 ^a | 1.870 ^a | 1.859 ^a | 1.393 ^a |
| | 0.835a | 29.176 ^a | 20.741 ^b | 15.058 ^c | 8.437 ^d | 3.331 ^c |
| Friedolean-3-ol | 0.408b | 1.663 ^a | 0.919 ^a | 1.250 ^a | 1.058 ^a | 0.525 ^a |
| | 0.835a | 10.799 ^a | 8.902 ^{ab} | 8.707 ^{ab} | 8.167 ^b | 7.526 ^b |
| Friedelin | 0.408b | 1.013 ^a | 0.603 ^a | 0.880 ^a | 0.762 ^a | 0.431 ^a |
| | 0.835a | 10.1482 ^a | 7.655 ^b | 6.797 ^{bc} | 6.224 ^{bc} | 5.478 ^c |

Médias das análises semiquantitativas (n=3) da massa em mg presente no extrato para cada 60 g de CO₂ utilizado na extração.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais na linha são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

(a,b,c) Médias com letras iguais na coluna são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

Observa-se neste trabalho que o tamanho de partícula e vazão do solvente apresentam pouca influência no rendimento de extração, entretanto a temperatura e densidade influenciam no rendimento de extração em 58 e 600% respectivamente. Os compostos dos grupos I e II estão em concentrações superiores nas primeiras frações (até 120 g de CO₂) e os compostos do grupo III nas frações final, porém quando se leva em

conta o rendimento do extrato, observa-se um maior rendimento de extração nas frações iniciais, com 37.5% da massa total de solvente (120 g de CO₂) obtém-se rendimentos de 75, 90 e 60% da massa total para os grupos I,II e III, respectivamente. O incremento na densidade de 100 e 300% para os grupos I e II e de 900% para os triterpenos friedolean-3-ol e friedelin do grupo III.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio recebido da Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-amazônico.** 1992. 252 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 2- SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G. M. Antiulcerogenic affects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34(1):21-27, 1991.
- 3- PEREIRA, A. M. S.; MENEZES, JR. A.; PEREIRA, P. S.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C.; VILEGAS J. H. Y.; COERDEIRO, P. J. M.; LANÇAS, F. M. Effect of fertilization on morfogenic characteristics and Secondary Metabolites of *Maytenus aquifolium* Martius. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. 3:43-50, 1995.
- 4- PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S.; CERDEIRA, R.M.M.; RODRIGUES, D.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; FRANÇA, S. C. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia*. **Acta Horticulturae**. 333:205-210, 1993.
- 5- OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** 34(1):29-41, 1991.
- 6- CARLINI, H.H.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp. (Espinheira Santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos. Em: **Estudo da Ação Antiúlcera Gástrica de Plantas Brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira Santa” e outras)**. CEME – Central de Medicamentos, Brasília-DF. pp. 67-74, 1988.

- 7- COELHO, L. A. F. **Extração Supercrítica de Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis*: dados experimentais, modelagem do processo e predição da solubilidade.** 1996, 189p. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- 8- SALDANHA, M. D. A.; ZETZL, C.; MOHAMED, R. S.; BRUNNER, G. Extraction of methylxanthines from guaraná seeds, mate leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 50:4820-4826, 2002.
- 9- CATCHPOLE, O. J.; PERRY, N. B.; SILVA, B. M. T. DA; GREY, J. B.; SMALLFIELD, B. M. Supercritical extraction of herbs I: Saw palmetto, St John's Wort, Kava Root, and Echinacea. **Journal of supercritical fluids.** 22:129-138, 2002.
- 10- GASPAR, F.; SANTOS, R.; KING, M. B. Extration of essential oils and cuticular waxes with compressed CO₂: effect of matrix pretreatment. **Ind. Eng. Chem. Res.** 39:4603-4608, 2000.
- 11- GERMER, S. P. M. **Extração de Óleo Essencial de Cravo da Índia em Leito Fixo com Dióxido de Carbono Líquido Subcrítico.** 1989, p. 140. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil
- 12- COELHO, L. A. F.; OLIVEIRA, J. V. DE; D'ÁVILA, S. G. The effects of temperature and solvent density on the characteristics of the extracts from SCFE of Rosemary oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** 13:51-62, 1996.
- 13- LUCAS, A. DE; MARTINEZ DE LA OSSA, E.; RÍNCON, J.; BLANCO, M. A.; GRACIA, I. Supercritical fluid of tocopherol concentrates from olive tree leaves. **Journal of Supercritical Fluids.** 22:221-228, 2002.
- 14- DAUKSA, E.; VENSKUTORIS, P. R.; SIVIK, B. Supercritical fluid extraction of borage (*Borago officinalis* L.) seeds with pure CO₂ and its mixture with caprylic acid methyl ester. **Journal of Supercritical Fluids.** 22:211-219, 2002.
- 15- SIMÁNDI, B.; KRISTO, SZ. T.; KÉRY, Á.; SELMECZI, L. K.; KMECZ, I.; KEMÉNY, S. Supercritical fluid extraction of dandelion leaves. **Journal of Supercritical Fluids.** 23:135-142, 2002.
- 16- LANÇAS, F. M.; VILEGAS, J. H. Y.; VASCONCELOS, E. C.; CELEGHINI, R. M. S. Novas aplicações do sistema SFE 'home made'. I. Plantas medicinais Brasileiras. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 4:413-417, 1997.

CAPÍTULO 7:

VARIABILIDADE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

**VARIABILIDADE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E
SEMI-VOLÁTEIS EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Maytenus ilicifolia*
Mart. ex Reiss.**

**Altemir José Mossi ^{a*}, Rogério Luis Cansian ^a, Oleg Leontiev-Orlov ^a, Marcio
Mazutti ^a, Marcelo Fernando Pinto ^a, Sérgio Echeverrigaray ^b**

^a Departamento de Ciências Agrárias, URI-Campus de Erechim, Av. 7 de setembro, 1621.
CEP 99700-000 Erechim - RS, Brasil.
E-mail: amossi@uricer.edu.br

^b Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul – RS, Brasil.
E-mail: selaguna@yahoo.com

* Para quem a correspondência deve ser enviada.
Telefone: 55-54-520-9000
Fax: 55-54-520-9090

RESUMO

Dezoito populações de *Maytenus ilicifolia* foram coletadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul sendo analisadas quanto à composição química dos seus óleos essenciais. Os óleos foram extraídos de folhas secas através de fluido supercrítico, nas condições de temperatura (50°C), vazão (2 g de CO₂/min) e pressão de 175 bar. Os rendimentos das extrações variaram de 0,488 a 0,976 % (p/p). A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas dos extratos permitiu a identificação positivamente de 10 compostos (limoneno, geranil acetato, ácido palmítico, fitol, esqualeno, vitamina E, stigmasterol, friedelan-3-ol, friedelin, friedelan-3-one) e a identificação através da biblioteca de massas oito compostos. As diferenças quantitativas nas médias dos compostos identificados foram observadas entre populações avaliadas. Apesar da alta variabilidade constatada dentro das populações, a análise de agrupamentos (UPGMA) dos dados permitiu a separação das populações em dois grupos. Não foi constatada uma relação entre os grupos formados e as características ambientais dos locais de coleta, o que pode ser indicativo de que as variáveis locais como microclima, insolação, condições nutricionais do solo, posição e idade da planta entre outros, possuem uma influência maior para os compostos analisados que as condições macroambientais.

Palavras-chave: Espinheira Santa, *Maytenus ilicifolia*, Cromatografia Gasosa, Variabilidade Química, Conservação da Natureza.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no Brasil é intenso, especialmente pelas populações de menor renda, pois a flora brasileira possui uma grande biodiversidade. Entretanto, o pouco conhecimento e o mau uso dos recursos naturais tem levado à perda de populações, e várias plantas medicinais estão incluídas em listas de espécies ameaçadas de extinção.

Carvalho-Okano (1), identificou a região sudeste como o centro primário de diversidade específica de *Maytenus* no Brasil, por abrigar o maior número de espécies. Porém a distribuição geográfica atual de *Maytenus ilicifolia* é prioritariamente na região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), habitando preferencialmente o sub-bosque de floresta ou as margens de rios.

No Brasil, as espécies *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia* são utilizadas popularmente como antiespasmódico, contraceptivo, antiulceroso, diurético, cicatrizante e analgésico. Estudos realizados com animais em laboratório (2, 3), comprovaram o efeito antiulcerogênico do extrato abafado de *Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia*, efeito este atribuído ao aumento do volume e do pH do suco gástrico (3), atividade anti-radicaís livres de oxigênio (4), efeito anti-séptico e cicatrizante (5, 6). Diversos compostos orgânicos estão presentes no extrato, tais como fenóis, taninos e terpenos (7). Alguns autores atribuem o efeito antiulcerogênico aos triterpenos e polifenóis (8, 9, 10), pois eles possuem a capacidade de aumentar as defesas do organismo, estimulando a síntese de mucos ou mantendo alta a concentração de prostaglandim da mucosa gástrica (11). Esta afirmação foi contestada por Queiroga em estudo realizado com alguns triterpenos (12).

Um aspecto importante quando se trata do emprego de extratos e/ou óleos essenciais de plantas em fitoterapia diz respeito ao método de extração dos mesmos. É importante que o método empregado para extração não altere as propriedades originais dos extratos e, além disso, produza rendimentos elevados. Neste cenário, a utilização dos fluidos supercríticos (FSC), mostra-se extremamente vantajosa, sendo uma alternativa para obtenção de produtos naturais, sem o inconveniente de produzir resíduos (13).

A utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), transforma o conjunto das duas técnicas na melhor ferramenta de separação e identificação dos constituintes de uma mistura complexa (14). Alguns trabalhos já foram realizados em *Maytenus ilicifolia* com a utilização destes equipamentos, dentre estes podemos citar: a determinação de compostos farmacologicamente ativos em cultura de tecidos de *Maytenus ilicifolia* (10), a análise de friedelan-3-ol e friedelin como marcadores na identificação de adulterantes em *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolia* (8), o efeito da fertilização nas características morfológicas e metabólitos secundário em *Maytenus aquifolia* (15), a análise de terpenóides de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolia* (16), a avaliação da atividade antiulcerogênica de friedelan-3 β -ol e friedelin isolados de *Maytenus ilicifolia*.

Cordeiro (16) identificou em *Maytenus ilicifolia*, friedelin, friedelan-3-ol, vitamina E, simiarenol, lupeol, lupenone, β -amydrin, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, esqualeno e ácido hexadecanoico, através do acoplamento da cromatografia gasosa de alta resolução e espectrometria de massas.

Radomski (17), estudando uma população de *Maytenus ilicifolia* no município de Lapa no Paraná, concluiu que a luminosidade foi o principal fator ambiental responsável pelas diferenças observadas nas variáveis analisadas (solos, luminosidade) em folhas e ramos de *M. ilicifolia*. O peso específico de 100 folhas foi maior nas plantas crescendo a pleno sol, enquanto que os teores foliares de N, K, B, Si, P, Mn e Cu variaram entre os ambientes, principalmente em função da intensidade luminosa. Os teores de polifenóis totais, polifenóis não tanantes e taninos variaram entre os ambientes, sendo maiores nas plantas crescendo a pleno sol. O aumento na concentração dos polifenóis foi diretamente influenciado pelo aumento da intensidade luminosa e pela disponibilidade de nutrientes do solo.

Considerando-se a carência de informações sobre a variabilidade química entre populações de *M. ilicifolia*, o objetivo do presente trabalho foi comparar a composição quali-quantitativa dos óleos essenciais de 18 populações nativas de *M. ilicifolia* representando uma ampla área da distribuição natural da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS:

As coletas das dezoito populações nativas de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*), foram feitas em três estados brasileiros: Mato Grosso do Sul, no município de Ponta Porã; Paraná, nos municípios de Lapa, Irati, Guarapuava e Mangueirinha no Paraná; Santa Catarina nos municípios de Lages, São Joaquim e Caçador e Rio Grande do Sul nos municípios de Santana do Livramento, Canguçu, Unistalda, Vale Verde, Soledade, Flores da Cunha, Bom Jesus, Erechim, Barão de Cotegipe e São José (Figura 1). Foi considerada como população o grupo de plantas isoladas geograficamente. Cada população foi representada por 30 plantas adultas coletadas aleatoriamente em toda a área, com uma distância mínima de 10 metros entre plantas. As coletas correram durante os meses de inverno e em estágio de florescimento.



Figura 1. Locais de coleta das 18 populações de *Maytenus ilicifolia* nos estados do Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, Brasil.

Extração em Fluido Supercrítico (EFS)

As folhas coletadas das 30 plantas de cada população foram secas em temperatura ambiente à sombra. Após secas, foram preparadas três amostras com plantas (1 a 10, 11 a 20 e 21 a 30) por população. As amostras foram compostas com 25 g de folhas, sendo moídas em moinho de facas, homogeneizadas e peneiradas em peneiras da série Tyler retirando-se as partículas com mais de 200mesh.

As extrações foram realizadas através de fluido supercrítico em uma unidade experimental de bancada, utilizando CO₂ (White & Martins com 99,9% de pureza) como solvente. Esta unidade experimental consiste, basicamente, de um cilindro de CO₂, dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (ISCO 500 D), um extrator encamisado com volume interno aproximado de 100 mL, um tubo coletor de vidro, uma válvula micrométrica e um transdutor absoluto de pressão (Smar LD 301), conforme esquematizado na **Figura 2**.

As condições utilizadas para extração foram 175 bar, 50°C e vazão de 2 g de CO₂/min durante 90 minutos, o extrato foi coletado em uma única fração permanecendo conservados em ambiente inerte até o momento das análises.

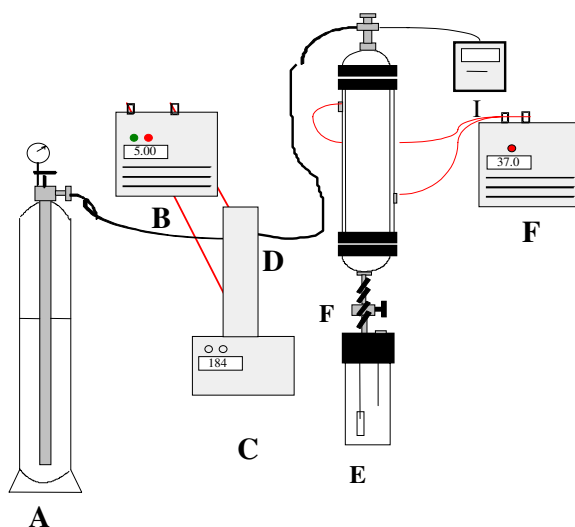


Figura 2 - Unidade experimental de extração de alta pressão. (A) cilindro de CO₂; (B,H) banhos termostáticos (Quimis); (C) bomba de alta pressão (ISCO 500 D); (D) extrator encamisado com volume interno aproximado de 100 mL; (E) tubo coletor de vidro, (F) válvula micrométrica.

Análise instrumental

Os extratos foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas CG-EM (Shimadzu, Modelo QP 5050A). Foi empregada uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura do filme); vazão do gás de arraste (hélio) de 0,8 mL.min⁻¹; detector em 1,0 Kv; modo *split* (1:20); injetor a 290°C e interface em 300°C. Programação da temperatura inicial 70°C (3 min); primeira rampa de aquecimento: 4°C/min até 260°C; segunda rampa de aquecimento: 2,5°C/min até a temperatura final de 300°C permanecendo por 23,5 min e um tempo de corte do solvente de 4 min. O tempo total de análise foi de 90. As amostras foram padronizadas em 40.000 mg.L⁻¹ em diclorometano (merck, bidestilado) sendo o volume da injeção padrão de 1 µL. Como padrão interno foi utilizada a bifenila na concentração de 100 mg.L⁻¹. Os picos selecionados foram integrados no modo manual.

A análise quantitativa foi realizada pelo método da padronização interna. Os compostos para os quais não se dispunha de padrão interno, foram semiquantificados pela área individual em relação ao padrão interno.

A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos dos compostos na amostra com os tempos de retenção dos compostos padrões (Sigma-Aldrich co). Também foi feita, para fins de identificação, a comparação dos espectros de massas dos picos dos compostos na amostra, com aqueles armazenados na biblioteca do sistema CG-EM com aproximadamente 170.000 espectros. Foram considerados tentativamente identificados pela biblioteca do sistema GC-EM, aqueles compostos para os quais não se dispunha de padrões e com similaridade maior ou igual a 90%.

As amostras foram injetadas em triplicata e a análise estatística foi realizada através de ANOVA (Tukey < 0.05) no programa Statistica 5.0. Os agrupamentos das populações com base nos compostos voláteis e semi-voláteis analisados e o agrupamento das regiões com base nas características ambientais (latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima segundo classificação de Köppen, geomorfologia e tipos de solos) foi realizado com Cluster Analise no programa Statistica 5.0, assim como a correlação dos compostos com a caracterização ambiental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos rendimentos brutos obtidos das extrações em fluido supercrítico variaram entre as 18 populações de *Maytenus ilicifolia*, de 0,976 % para a população de Erechim a 0,488% (p/p) na população de São Joaquim, sendo o rendimento médio de 0,704 % (**Tabela 1**). O rendimento de extrato (relação da massa de extrato pela massa de amostra) apresenta diferença significativa entre as populações e chegou próximo a 1% na população de Erechim. Radomski (17) constatou diferenças na composição e peso específico nas folhas de plantas crescendo a pleno sol. Considerando-se que as amostras foram coletadas de maneira aleatória, este pode ser um dos fatores que influenciaram no rendimento do extrato que apresentaram uma variação próxima a 100% entre as populações.

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (conforme cromatograma da **figura 3**), dos extratos obtidos por extração em fluido supercrítico permitiu a quantificação de 10 compostos, sendo estes: liloneno (TR=8,2 min), geranil acetato (TR=25,1 min), ácido palmítico (TR=37,2 min), fitol (TR=40,8 min), esqualeno (TR=56,2 min), vitamina E (TR=62,9min), stigmasterol (TR=67,2min), friedelan-3-ol (TR=72,3min), friedelin (TR=73,0min) e friedelan-3-one (73,3min). Oito compostos na amostra não puderam ser identificados tentativamente pela biblioteca do sistema GC-EM por que, para cada um deles, cinco ou mais compostos apresentaram possibilidades de identificação muito próximas e todas superiores a 90%. Com certeza, pode-se afirmar apenas que se trata de um ácido (TR=6,9 min), um éster (TR=46,3 min), um éter (TR=58,5 min), três hidrocarbonetos lineares (TR=61,9; 64,15 e 66,3 min) e dois triterpenóides (TR=68,4 e 69, 0 min).

Cordeiro (16) utilizando cromatografia gasosa de alta resolução acoplado ao espectrometro de massa para análise de extratos de *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolia*, também identificou nas amostras, friedelin, friedelan-3-ol, vitamina E e stigmasterol.

Tabela 1. Resultados dos rendimentos médios dos extratos obtidos em fluido supercrítico das 18 populações de *M. ilicifolia* e da análise da ANOVA e teste Tukey.

| Local | Rendimento % (p/p) |
|-----------------------|----------------------|
| Erechim | 0,976 ^a |
| Soledade | 0,872 ^{ab} |
| Mangueirinha | 0,796 ^{abc} |
| Guarapuava | 0,760 ^{abc} |
| Bom Jesus | 0,748 ^{bc} |
| Unistalda | 0,748 ^{bc} |
| Barão de Cotegipe | 0,720 ^{bc} |
| São José | 0,704 ^{bcd} |
| Ponta Porã | 0,696 ^{bcd} |
| Irati | 0,684 ^{bcd} |
| Lapa | 0,672 ^{bcd} |
| Santana do Livramento | 0,660 ^{bcd} |
| Vale Verde | 0,648 ^{cd} |
| Canguçu | 0,648 ^{cd} |
| Lages | 0,636 ^{cd} |
| Caçador | 0,608 ^{cd} |
| Flores da Cunha | 0,592 ^{cd} |
| São Joaquim | 0,488 ^d |
| Média Final | 0,704 |

Áreas médias (n=3) dos picos em relação ao padrão interno.

(^{a, b, c, d}) Médias com letras iguais são estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$).

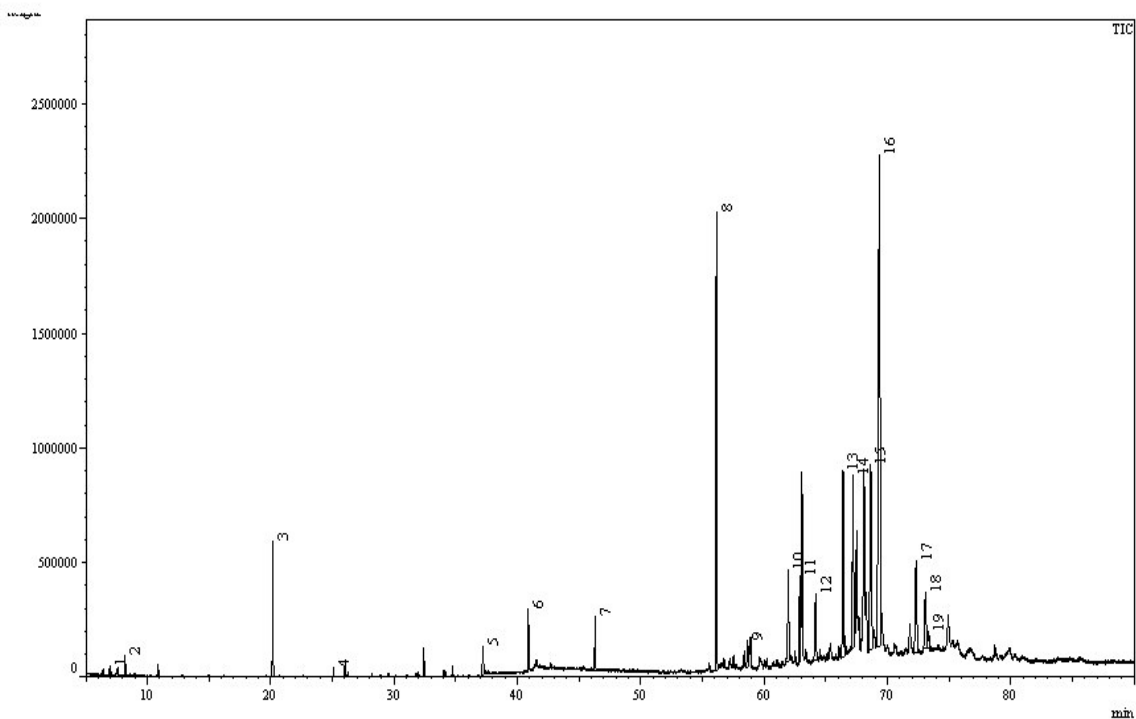


Figura 3. Cromatograma de ion total do extrato de *Maytenus ilicifolia* obtido em fluido supercrítico do *bulk 1* da população de Erechim.

Picos no cromatograma: com padrões o limoneno (2), geranyl acetato (4), ácido palmítico (5), fitol (6), esqualeno (8), vitamina E (11), stigmasterol (14), friedelan-3-ol (17), friedelin (18), friedelan-3-one (19) e como padrão interno a bifenila (3) e sem padrões os ácidos (1), éster (7), éter (9), hidrocarbonetos lineares (10,12,13) e triterpenóides (15,16).

As diferenças entre as concentrações médias de cada composto identificado e quantificado com padrões, analisadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$), mostrou haver diferenças significativas na concentração dos compostos analisados entre as populações (**Tabela 2**). As diferenças nas concentrações destes variaram desde 2,7 vezes para o stigmasterol até 36 vezes para o ácido palmítico. A diferença das concentrações da vitamina E (antioxidante), entre as populações de Mangueirinha e Lages foi de 5,7 vezes (87,88 e 15,34 mg/g de extrato, respectivamente).

Quanto aos triterpenos analisados (friedelan-3-ol, friedelin e friedelan-3-one), classe de compostos ao qual é atribuída propriedade medicinal, também se percebe grandes variações nas concentrações destes compostos entre as populações. Populações como Erechim, Barão de Cotegipe e Bom Jesus apresentaram respectivamente 28,56, 22,02 e 22,4 mg destes terpenos por grama de extrato, enquanto as populações de São José, Caçador, São Joaquim e Flores da Cunha apresentaram concentrações bem inferiores destes compostos, sendo de 9,7, 9,14, 8,67 e 7,76 mg destes terpenos por grama de extrato, respectivamente. Observa-se também não haver relação entre a concentração de esqualeno, precursor dos triterpenos, e as concentrações dos triterpenos analisados. Este resultado é evidente quando se compara a população de Barão de Cotegipe com alta concentração de triterpenos (22,02 mg/g de extrato) e de esqualeno (32,05 mg/g de extrato) e a população de Bom Jesus com alta concentração de triterpenos (22,4 mg/g de extrato) e baixa concentração de esqualeno (6,61 mg/g de extrato).

A diferença na concentração dos triterpenos entre populações próximas, como Barão de Cotegipe (22,02 mg/g de extrato) e São José (9,7 mg/g de extrato) pode ser considerada como indicativo de efeito ambiental sobre a composição de química dos extratos de *M. ilicifolia*. Esta suposição é corroborada pelos resultados obtidos por Pereira (1995) que constatou efeito da adubação sobre a concentração de metabólitos secundários (fenóis, friedelan-3-ol e friedelin) em experimentos com *M. ilicifolia*.

Os dados quantitativos obtidos nas análises químicas foram utilizados para o cálculo de distâncias Euclidianas médias e análise de agrupamentos pelo método UPGMA. Como pode ser observado na **figura 4**, as 18 populações foram separadas em dois grupos. Um formado pelas populações de Barão de Cotegipe, Iratí, Lapa, Santana do Livramento e Bom Jesus, e o outro pelas populações de Canguçu, Caçador, Ponta Porã, Lages, Flores da Cunha, Soledade, Unistalda, São Joaquim, Vale Verde, Guarapuava, São José, Manguieirinha e Erechim.

Tabela 2. Resultados dos valores médios da composição química do extrato em (mg/g de extrato) obtidos das 18 populações de *M. ilicifolia* e analisados por GC-MS e da análise da ANOVA complementada pelo teste Tukey.

| | Limoneno | Ácido Palmítico | Geraniol Acetato | Fitol | Esqualeno | Vitamina E | Stigmasterol | Friedelan -3-ol | Friedelin | Friedelan -3-one |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Barão de Cotegipe | 1,21 ^{bcd} | 23,30 ^{bcd} | 0,20 ^a | 4,18 ^{bc} | 32,05 ^a | 39,55 ^{bcdte} | 122,62 ^a | 12,16 ^{ab} | 9,44 ^{ab} | 0,42 ^c |
| Bom Jesus | 1,04 ^{bcd} | 3,14 ^d | 0,05 ^c | 1,40 ^{de} | 6,61 ^{de} | 39,82 ^{bcdte} | 119,1 ^{ab} | 11,55 ^{ab} | 10,50 ^d | 0,35 ^c |
| Canguçu | 1,19 ^{bcd} | 13,09 ^d | 0,19 ^a | 4,30 ^{bc} | 14,50 ^{bcdte} | 20,15 ^{de} | 66,94 ^{abc} | 7,09 ^b | 4,29 ^{bc} | 0,38 ^c |
| Caçador | 1,20 ^{bcd} | 20,93 ^{bcd} | 0,06 ^{bc} | 1,71 ^{bc} | 7,34 ^{de} | 22,09 ^{cde} | 67,46 ^{abc} | 4,90 ^b | 3,65 ^{bc} | 0,59 ^{bc} |
| Erechim | 1,38 ^{abcd} | 113,44 ^a | 0,07 ^{bc} | 1,73 ^{bc} | 9,66 ^{cde} | 18,78 ^e | 122,92 ^a | 16,41 ^a | 10,45 ^{ab} | 1,70 ^a |
| Flores da Cunha | 1,01 ^{bcd} | 46,45 ^{abcd} | 0,11 ^{abc} | 0,58 ^c | 4,38 ^e | 20,58 ^{de} | 45,30 ^c | 4,30 ^b | 2,90 ^c | 0,56 ^{bc} |
| Guarapuava | 0,77 ^{bcd} | 9,24 ^d | 0,17 ^{ab} | 6,18 ^{bc} | 26,18 ^{ab} | 60,47 ^{ab} | 59,88 ^{abc} | 7,92 ^{ab} | 2,61 ^c | 0,83 ^{bc} |
| Irati | 0,86 ^{bcd} | 6,99 ^d | 0,20 ^a | 8,95 ^b | 33,74 ^a | 84,45 ^a | 97,28 ^{abc} | 9,37 ^{ab} | 5,56 ^{abc} | 0,63 ^{bc} |
| Lapa | 0,82 ^{bcd} | 18,25 ^{cd} | 0,10 ^{abc} | 3,77 ^{bc} | 13,93 ^{bcdte} | 41,94 ^{bcdte} | 108,91 ^{abc} | 12,27 ^{ab} | 7,87 ^{abc} | 0,98 ^{ab} |
| Lages | 0,73 ^{cd} | 12,01 ^d | 0,06 ^{bc} | 1,29 ^c | 4,70 ^e | 15,34 ^e | 88,06 ^{abc} | 8,52 ^{ab} | 5,79 ^{abc} | 0,43 ^c |
| Mangueirinha | 1,38 ^{abcd} | 31,94 ^{bcd} | 0,11 ^{abc} | 7,68 ^{bc} | 19,57 ^{abcd} | 87,88 ^a | 64,19 ^{abc} | 6,4 ^b | 4,34 ^{bc} | 0,39 ^c |
| Ponta Porã | 1,20 ^{bcd} | 30,12 ^{bcd} | 0,10 ^{abc} | 3,71 ^{bc} | 10,37 ^{cde} | 23,73 ^{cde} | 102,52 ^{abc} | 9,38 ^{ab} | 6,01 ^{abc} | 0,48 ^{bc} |
| São Joaquim | 1,19 ^{bcd} | 89,40 ^{ab} | 0,14 ^{abc} | 1,51 ^c | 7,64 ^{de} | 16,15 ^e | 85,01 ^{abc} | 3,52 ^b | 4,61 ^{bc} | 0,54 ^{bc} |
| São José | 1,21 ^{bcd} | 20,66 ^{cd} | 0,22 ^a | 4,05 ^{bc} | 22,77 ^{abc} | 55,47 ^{abcd} | 69,24 ^{abc} | 5,93 ^b | 3,04 ^c | 0,73 ^{bc} |
| Santana do Livramento | 1,55 ^{abc} | 12,10 ^d | 0,19 ^a | 16,79 ^a | 15,43 ^{bcdte} | 56,44 ^{abc} | 107,22 ^{abc} | 11,06 ^{ab} | 7,36 ^{abc} | 0,50 ^{bc} |
| Soledade | 2,38 ^a | 27,81 ^{bcd} | 0,12 ^{abc} | 2,94 ^{bc} | 16,42 ^{bcdte} | 18,49 ^e | 112,60 ^{ab} | 8,68 ^{ab} | 4,20 ^{bc} | 1,34 ^{ab} |
| Unistalda | 1,78 ^{ab} | 24,70 ^{bcd} | 0,14 ^{abc} | 1,49 ^c | 16,35 ^{bcdte} | 19,92 ^{de} | 56,37 ^{bc} | 7,24 ^{ab} | 2,76 ^c | 0,63 ^{bc} |
| Vale Verde | 0,39 ^d | 85,07 ^{abc} | 0,11 ^{abc} | 6,28 ^{bc} | 10,55 ^{cde} | 16,50 ^e | 80,06 ^{abc} | 7,39 ^{ab} | 3,95 ^{bc} | 0,94 ^{abc} |

Médias obtidas de 3 repetições de extração (CO₂ Supercrítico) e 3 repetições de injeção.

(^{a, b, c, d, e}) Médias com letras iguais são estatisticamente semelhantes (p≥0,05).

Os grupos formados pela análise de agrupamentos baseada nos dados de composição química das populações não mostram relação com os agrupamentos formados com base nas características dos ambientes dos quais estas populações foram coletadas (**Figura 5**). A análise de agrupamentos das diferentes condições ambientais levando em consideração latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima (segundo classificação de Koppen), geomorfologia e tipos de solo, permitiu separar a região de Ponta Porã no Mato Grosso do Sul e a região ao sul do Rio Grande do Sul (Santana do Livramento, Canguçu, Vale Verde, Unistalda e Soledade), das demais regiões correspondentes à mata atlântica e planalto do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

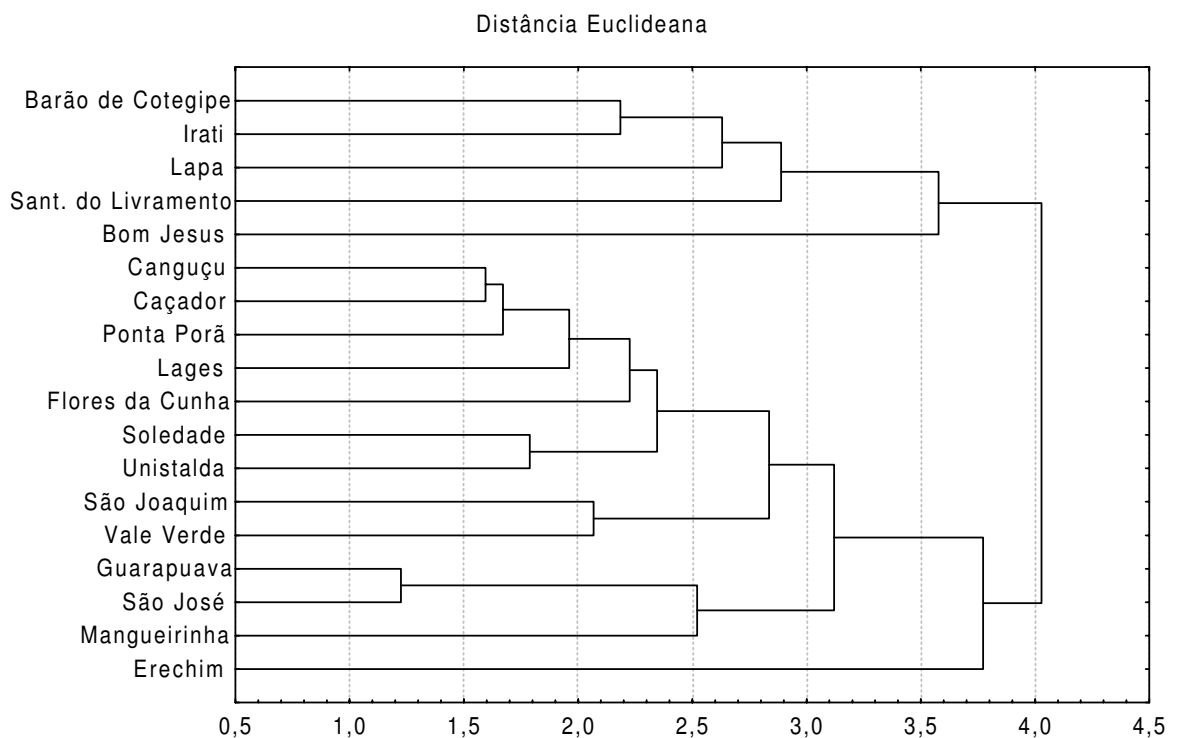


Figura 4. Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas da média dos três *bulks* de 10 plantas de cada uma das 18 populações, com base na composição química analisada.

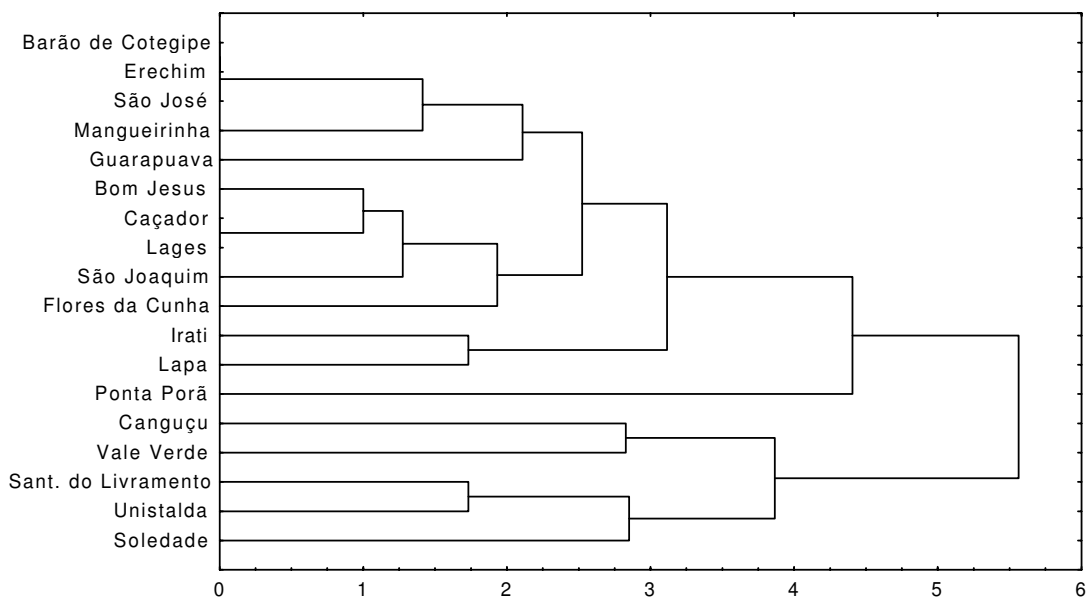


Figura 5 : Agrupamento UPGMA com distâncias Euclidianas das 18 populações analisadas, com base em características ambientais de cada local (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipos de solo).

Também não houve agrupamento dos *bulks* dentro de cada população, demonstrando que neste caso, as diferenças químicas são maiores dentro das populações do que entre populações.

Estes resultados indicam que as variáveis locais como microclima, insolação, condições nutricionais do solo, posição e idade da folha, variabilidade genética dentro das populações, dentre outros, possuem uma influencia maior para os compostos analisados que as condições macro-ambientais consideradas neste trabalho (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipos de solo).

Embora alguns autores já tenham encontrado correlações entre agrupamentos químicos e genéticos em algumas plantas aromáticas e medicinais (18, 19), os agrupamentos obtidos com base na composição química não apresenta relação com os grupos formados pela análise genética (20) destas populações.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e SCT - RS pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos Taxonômicos do Gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil Extra-amazônico.** 1992. 252 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 2- SOUZA-FORMIGONI, M. L.; OLIVEIRA, M. G. M. Antiulcerogenic affects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 34(1):21-27, 1991.
- 3- OLIVEIRA, M. G.; MONTEIRO, M. G.; MACAUBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** 34(1):29-41, 1991.
- 4- MELO, F. S.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F. da; SILVA, C. R. da; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; CALDEIRA, A. de A.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon cstratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** 496(1): 33-38, 2001.
- 5- CARLINI, H.H.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp. (Espinheira Santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos. Em: **Estudo da Ação Antiúlcera Gástrica de Plantas Brasileiras (*Maytenus ilicifolia* “Espinheira Santa” e outras).** CEME – Central de Medicamentos, Brasília-DF. pp. 67-74, 1988.
- 6- SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONERI, R. **Plantas Medicinais: herbarium, Flora et Scientia.** Curitiba, 1987. 160p.
- 7- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. de O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cell. **Genetics and Molecular Biology.** 25(1):85-89, 2002.
- 8- VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C.. High resolution gas chromatography analysis of “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*): analysis of crude drug adulterations. **Phytotherapy Research.** 8(4):241-244, 1994.
- 9- VILEGAS J. H. Y.; LANÇAS, F.H.; ANTONIOSI-FILHO, N. R. High-temperature capillary GC analysis of phytopreparations of espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant. **Chromatographia.** 40(5-6):341-344, 1995.
- 10- PEREIRA A. M. S. et al. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Acta Horticulturae.** 333:205-210, 1993.

- 11- LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: Ellis, G.P., **Progress Medicinal Chemistry**, Elsevier Science Publisher, 1991. vol. 28, 201-231.
- 12- QUEIROGA, C. L.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J, E. de. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 72:465-468, 2000.
- 13- MCHUGH, M.A. AND KRUKONIS, V.J. **Supercritical Fluid Extraction**. 2nd edition, 1994, 340 p.
- 14- NASCIMENTO FILHO, I. **Estudos de Compostos Orgânicos em Lixiviados em Aterro Sanitário**. 2002,149f. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química da UFRGS, Porto Alegre.
- 15- PEREIRA A. M. S.; MENEZES, A.Jr.; PEREIRA, P. S.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANÇA, S. C.; LILEGAS, J. H. Y.; CORDEIRO, P. J. M.; LANÇAS, F. M. Effect of fertilization on morphologic characteristics and secondary metabolites of *Maytenus aquifolium* Mart. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**. 3(2):43-50, 1995.
- 16- CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F.M. HRGC-MS Analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (Espinheira Santa). **J. Braz. Chem. Soc.** 10(6):523-526, 1999.
- 17- RADOMSKI, M. I. **Caracterização Ecológica e Fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em Populações Nativas, no Município de Lapa-Paraná**. 1998, 98p. Tese (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 18- ECHEVERRIGARAY, S.; AGOSTINI, G.; ATTI-SERAFINI, L.; PAROUL, N.; PAULETTI, G.F.; ATTI DOS SANTOS, A.C. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial Thyme cultivars. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**. 49: 4220-4223, 2001.
- 19- CAMPOS, I. F. P.; FERREIRA, H. D.; PORTES, D. A.; PAULA, J.R.; SILVA, J. G.; SERAPHIM, J. C.; AZEVEDO, N. R.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Volatile constituents of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from brazilian cerrado. **Acta Horticulturae**. 569:195-201, 2002.
- 20- MOSSI, A. M.; CANSIAN, R. L.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CECHET, M. L. PINTO, M. F.; ECHEVERRIGARAY, S. Estimativa da variabilidade genética em populações nativas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., através de marcadores RAPD. **Heredity** (submetido).

CAPÍTULO 8:

DISCUSSÕES GERAIS

8. DISCUSSÕES GERAIS

A ação antrópica sobre os ecossistemas como na utilização de plantas com fins medicinais, têm ocasionado uma grande degradação sobre as mesmas. Este fato, associado à importância medicinal que a espinheira-santa possui, tem levado 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. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos o estudo da ocorrência e distribuição do gênero *Maytenus* no estado do Rio Grande do Sul, a análise da variabilidade genética intra e interpopulacional de *Maytenus ilicifolia*, e determinação das melhores condições de obtenção de extrato via extração em fluido supercrítico e identificação e quantificação dos compostos voláteis e semi-voláteis para análise de diversidade química nestas populações nativas coletadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

As informações sobre as diversas espécies de *Maytenus* ainda são restritas, tendo em vista o enorme potencial farmacológico destas. Após levantamento em 13 herbários no estado do Rio Grande do Sul foram encontradas três novas espécies (*M. glaucescens* Reiss, *M. gonoclada* Mart. e *M. robusta* Reiss.), para o estado do Rio Grande do Sul, não citadas por Carvalho-Okano (*M. Cassineformis* Reiss., *M. dasyclada* Mart., *M. evonymoidis* Reiss., *M. boaria* Mol., *M. ilicifolia* Mart ex Reiss. e *M. aquifolia* Mart). Verificou-se que a distribuição destas espécies não ocorre de maneira similar, algumas espécies são de ocorrência mais restrita, como *M. evonymoidis*, *M. gonoclada*, *M. glaucescens* e *M. robusta*, enquanto outras como *M. aquifolia*, *M. dasyclada* e *M. ilicifolia*, apresentam uma ampla distribuição pelo estado. *M. ilicifolia* apresentou distribuição em todas as regiões agroecológica do estado, com exceção do litoral.

No estudo da variabilidade genética intra e interpopulacional em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, através de marcadores RAPD, em três populações do Alto Uruguai Gaúcho verificou-se que o índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre as plantas representantes das populações variou entre 0,69 e 0,98. Os índices de similaridade entre estas populações variaram de 0,62 a 0,87 e assim como as amplitudes de variação, são ligeiramente inferiores aos encontrados nos índices intrapopulacionais. A variabilidade intrapopulacional em *M. ilicifolia* foi também constatada por Bittencourt (2000) em duas populações do Paraná. As variâncias intrapopulacionais (0,102 a 0,140) são superiores as variâncias entre as populações (0,076 a 0,099), embora existam alelos presentes de forma

diferencial nas distintas populações que permitem a separação destas. Carvalho-Okano (1992) sugere que possa estar havendo uma tendência de transição da bissexualidade para a unissexualidade das flores e indivíduos desta espécie, este fato poderia explicar os resultados encontrados, pois em espécies dióicas a taxa de recombinação é alta pela fecundação cruzada. O coeficiente de variação calculada entre as populações, mostrou maior proximidade entre Erechim e São José (3,94) quando comparado com Erechim e Barão de Cotegipe (4,13) e Barão de Cotegipe e São José (4,44). Este resultado não pode ser explicado pela distribuição geográfica, uma vez que a população Erechim está a 19,4 Km de Barão de Cotegipe e a 22,5 Km de São José, enquanto Barão de Cotegipe está a 3,4 Km de São José.

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA permitiu separar as 90 plantas analisadas em três grupos correspondentes a cada uma das populações avaliadas. Porém com baixos valores de significância, indicando que apesar da separação, as populações estão bastante próximas. Os índices de confiança internos demonstram não haver formação de subgrupos dentro das populações.

Considerando a frequência alélica das populações, 28,48% foram idênticos para as três populações e 39,6% apresentaram frequência com diferenças menores que 50% e 31,01% tiveram diferença de frequência superior a 50%. A diferença de frequência entre as populações superiores a 50%, confirma os resultados obtidos por Perecin (2002) com o uso de marcadores isoenzimáticos. As diferenças alélicas entre populações podem estar associadas ao sistema reprodutivo da planta, a um fluxo gênico relativamente baixo entre populações, e a efeito fundador. Além disto foram encontrados 12 alelos (7,6%) que não estavam presentes em pelo menos uma das populações. Cabe ressaltar a importância da preservação dos fragmentos de matas, pois populações contidas nestes fragmentos possuem alelos raros, que com a ação antrópica (fragmentação dos ecossistemas, eliminação da fauna que ajuda na dispersão das sementes, etc), tendem a ser perdidos.

No estudo da variabilidade genérica em populações nativas de *Maytenus ilicifolia*, foram analisados *bulks* representantes de cada uma das 18 populações de *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolia* e *Maytenus evonymoidis*.

O índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* foi em média de 0,64; entre *M. ilicifolia* e *M. evonymoidis* de 0,47 e entre *M. aquifolia* e *M. evonymoidis* de 0,42. Conforme esperado os índices de similaridade entre as espécies foram inferiores aos obtidos dentro da espécie (0,72 a 0,79).

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA permitiu separar claramente as três espécies analisadas sendo que *M. ilicifolia* e *M. aquifolia* permaneceram próximas geneticamente, esta alta presença de fragmentos compartilhados entre *M. ilicifolia* e *M. aquifolia*, indicando uma proximidade filogenética grande entre as espécies. Perecin e Kageyama (2002) em estudos com isoenzimas constataram resultados semelhantes e os autores sugerem a possibilidade de que as espécies não estejam completamente isoladas reprodutivamente ou que este fato ocorreu a um espaço de tempo não muito distante.

Nas populações de *Maytenus ilicifolia* a análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA permitiu caracterizar cada uma das populações já que os *bulks* internos permaneceram próximos, as 18 populações analisadas foram separadas em 3 grupos, porém com baixos valores do índice de confiança. O grupo I foi formado pela população oriunda de Ponta Porã (MS), o grupo II, pelas populações de Santana do Livramento, Vale Verde, Canguçu e Unistalda, todas da região sul do Rio Grande do Sul, e o grupo III pelas 13 populações restantes. A separação destes três grupos foi confirmada pela análise de coordenadas principais (PCO) usando distâncias euclidianas. A alta similaridade entre as populações e a baixa definição de grupos corrobora com os resultados obtidos por Bittencourt (2002). Isto pode estar relacionado com o fato da região sudeste ser o centro primário de diversidade específica de *Maytenus* sp., sendo que *Maytenus ilicifolia* tem ocorrência preferencial no sub-bosque das florestas de araucária e às margens de rios e nos agrupamentos arbóreos (capões) em regiões de estepes. A floresta de araucária tem uma origem recente (2.500 a 4.000 anos) na região sul do Brasil, sendo portanto também recente a ocorrência das espécies a ela relacionadas.

Observa-se semelhança entre o agrupamento genético das populações e o agrupamento ambiental das regiões de coleta, elaborado com base nas características ambientais como: latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima (segundo classificação de Koppen), geomorfologia e tipos de solo. Esta semelhança pode ser um indicativo da influência das condições ambientais na seleção genética e no possível distanciamento genético destas populações das demais e também da existência de um certo isolamento destas populações.

No que diz respeito à conservação da base genética em *Maytenus ilicifolia*, a proximidade genética entre as populações dentro e entre as diferentes regiões, que foram separadas com um baixo valor de significância, aponta para realização de coletas em um menor número de populações sendo coletando um maior número de indivíduos por população. Entretanto, a presença de alelos raros nas populações indica a necessidade de coletas nas

diferentes populações para que estes alelos sejam resgatados e preservados. Cabe ressaltar, que quaisquer medidas a serem tomadas no sentido da preservação de germoplasmas “*ex-situ*”, não descartam a necessidade de conservação “*in situ*”, a qual depende do controle estrito da ação antrópica.

No estudo da caracterização química, via cromatografia gasosa dos extratos obtidos por CO₂ a alta pressão, visando determinar as melhores condições de extração para o estudo químico das diferentes populações, foram avaliados os efeitos do tamanho de partícula, vazão do solvente, densidade e temperatura no rendimento de extrato e na distribuição dos compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis.

Inicialmente avaliando-se o efeito do tamanho das partículas das amostras e vazão do solvente. Observou-se pouco efeito destes no rendimento do extrato. Partículas com maior área superficial apresentam uma maior camada superficial e proporciona teoricamente um maior rendimento, porém, um processo intenso de moagem pode levar a uma perda de óleo essencial.

Observa-se um acréscimo no rendimento de extração à medida que a temperatura aumenta. Tal fato é atribuído, principalmente ao aumento da pressão de vapor dos compostos mais voláteis e semi-voláteis, aumento da difusão da mistura e diminuição da viscosidade do solvente, fatores estes que aumentam o rendimento de extração. Evidencia-se também, uma alta influência da densidade do solvente no rendimento do extrato, tal fato ocorre devido ao aumento bastante pronunciado no poder de solvatação (densidade) do fluido.

A identificação dos compostos fitol, Esqualeno, Vitamina E, Stigmast-5-en-ol, Friedelan-3-ol e Friedelin foram realizada com padrões. O ácido dodecanóico e a geranil acetona foram identificados pela biblioteca do sistema CG-EM. Para caracterização do extrato eles foram separados em 3 grupos: grupo I de menor peso molecular (149 a 282); grupo II os compostos de maior peso molecular (410 a 414) e no grupo III os triterpenos, também de alto peso molecular (426 e 428), e com grande importância medicinal.

Pode ser observado que a menor granulometria da amostra levaram a maiores concentrações para os compostos dos grupos I e III, não havendo diferença significativa para o grupo II. Os compostos dos grupos I e II encontram-se em maior concentração nas primeiras frações, enquanto que os do grupo III tendem a aumentar sua concentração nas frações intermediárias e finais, nas mesmas condições de extração. Esta observação está baseada no fato dos compostos dos grupos I e II já terem sido extraídos em maior quantidade no início da extração, o que possibilita uma maior concentração dos compostos do grupo III, na fase final.

Observou-se o efeito positivo da temperatura sobre o rendimento dos compostos dos grupos I e III. O grupo II não apresentou incremento para o esqualeno, porém, houve incremento significativo para a Vitamina E para o Stigmast-5-en-ol. O efeito da densidade do solvente de extração, foi a variável que apresentou os resultados mais significativos em todos os grupos e este efeito positivo se intensifica para compostos de maior peso molecular, como os triterpenos. Tal fato ocorre devido ao aumento bastante pronunciado no poder de solvatação do fluido, especialmente para compostos com maior dificuldade em serem extraídos.

A análise da variabilidade química dos compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis dos extratos obtidos por CO₂ em alta pressão das 18 populações de *Maytenus ilicifolia* demonstrou que o rendimento de extrato apresenta diferença significativa entre as populações. Considerando que Radomski, constatou diferenças no peso específico nas folhas de plantas crescendo a pleno sol, e que as amostras neste trabalho foram coletadas de maneira aleatória, este pode ser um dos fatores que influenciaram nestes resultados.

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, dos extratos obtidos por extração em fluido supercrítico permitiu a quantificação de 10 compostos, sendo estes: liloneno (TR=8,2 min), geranil acetato (TR=25,1 min), ácido palmítico (TR=37,2 min), fitol (TR=40,8 min), esqualeno (TR=56,2 min), vitamina E (TR=62,9min), stigmasterol (TR=67,2min), friedelan-3-ol (TR=72,3min), friedelin (TR=73,0min) e friedelan-3-one (73,3min). Oito compostos na amostra não puderam ser identificados tentativamente pela biblioteca do sistema GC-EM por que, para cada um deles, cinco ou mais compostos apresentaram possibilidades de identificação muito próximas e todas superiores a 90%. Com certeza, pode-se afirmar apenas que se trata de um ácido (TR=6,9 min), um éster (TR=46,3 min), um éter (TR=58,5 min), três hidrocarbonetos lineares (TR=61,9; 64,15 e 66,3 min) e dois triterpenóides (TR=68,4 e 69, 0 min).

A diferença entre as áreas ou concentrações médias de cada composto identificado e quantificado com padrões, mostrou haver variação química dos compostos analisados entre as populações. Os triterpenos analisados (friedelan-3-ou, friedelan e friedelan-3-une), classe de compostos ao qual é atribuída propriedade medicinal, apresentou maiores concentrações nas populações Erechim, Barão de Cotegipe e Bom Jesus. Tendo em vista a grande diferença na concentração dos triterpenos encontrada entre populações próximas, como Barão de Cotegipe e São José que estão a menos de 4 Km, pode-se supor que as diferenças encontradas não sejam devido aos fatores ambientais. Os estudos genéticos indicam uma alta variabilidade genética

dentro das populações e são um indicativo que estas variações na concentração dos triterpenos podem estar ocorrendo devido a este fator e não devido aos fatores ambientais.

Os grupos formados pela análise de agrupamentos baseada nos dados de composição química das populações não mostram relação com os agrupamentos formados com base nas características dos ambientes dos quais estas populações foram coletadas. A análise de agrupamentos das diferentes condições ambientais levando em consideração latitude, longitude, vegetação, temperatura média anual, clima (segundo classificação de Koppen), geomorfologia e tipos de solo, permitiu separar a região de Ponta Porã no Mato Grosso do Sul e a região ao sul do Rio Grande do Sul (Santana do Livramento, Canguçu, Vale Verde, Unistalda e Soledade), das demais regiões correspondentes à mata atlântica e planalto do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Também não houve um agrupamento dentro de cada população, demonstrando que neste caso, as diferenças químicas são maiores dentro das populações do que entre populações. Estes resultados indicam que as variáveis locais como microclima, insolação, condições nutricionais do solo, posição e idade da folha, variabilidade genética dentro das populações, entre outros fatores, possuem uma influência maior para os compostos analisados que as condições macro-ambientais consideradas neste trabalho.

Embora alguns autores já tenham encontrado correlações entre agrupamentos químicos e genéticos em algumas plantas aromáticas e medicinais, o agrupamento obtido com base na composição química não apresenta relação com os grupos formados pela análise genética das mesmas populações.

Os resultados deste trabalho estão sendo utilizados na implantação de um banco genético desta espécie na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões no Campus de Erechim, que já possui mais de quarenta matrizes e podem ser utilizados para se estabelecer estratégias de conservação desta espécie.

CAPÍTULO 9:

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

- 1- Foram encontradas três novas espécies de *Maytenus* (*M. glaucescens* Reiss, *M. gonoclada* Mart. e *M. robusta* Reiss.) para o estado do Rio Grande do Sul e *M. ilicifolia* apresentou distribuição em todas as regiões agroecológicas do estado, com exceção do litoral.
- 2- A variabilidade genética intrapopulacional é maior que a variabilidade interpopulacional, sendo que as populações estudadas no Alto Uruguai Gaúcho estão bastante próximas geneticamente, não formando sub grupos dentro das populações.
- 3- Não houve relação entre a distância genética e a distância geográfica nas populações estudadas do Alto Uruguai Gaúcho.
- 4- Os valores estimados do índice de similaridade de Jaccard entre as espécies de *Maytenus* foram inferiores aos obtidos dentro de *Maytenus ilicifolia*, sendo que *Maytenus ilicifolia* está mais próxima geneticamente de *Maytenus aquifolia* do que de *M. evonymoidis*, indicando uma proximidade filogenética grande entre as espécies.
- 5- A análise de agrupamentos com base nos dados de RAPD permitiu separar as 18 populações em 3 grupos. O grupo I formado pela população oriunda de Ponta Porá (MS), o grupo II pelas populações de Santana do Livramento, Vale Verde, Canguçu e Unistalda, todas da região sul do Rio Grande do Sul, e o grupo III pelas populações de Erechim, Barão de Cotegipe, São José, Bom Jesus, Lapa, Mangueirinha, Flores da Cunha, Irati, Guarapuava, Soledade, Caçador, Lages e São Joaquim. Observa-se semelhança entre o agrupamento genético das populações e o agrupamento ambiental das regiões de coleta. Esta semelhança pode ser um indicativo da influência das condições ambientais na seleção genética e no possível distanciamento genético destas populações das demais e também da existência de um certo isolamento destas populações.
- 6- O rendimento bruto de extrato na extração em fluido supercrítico aumenta com a elevação da temperatura e da densidade do solvente. No caso da temperatura, tal fato é atribuído, principalmente ao aumento da pressão de vapor dos compostos mais voláteis e semi-voláteis, aumento da difusão da mistura e diminuição da viscosidade do solvente. A alta influência da densidade do solvente no rendimento do extrato ocorre devido ao aumento bastante pronunciado no poder de solvatação (densidade) do fluido.

- 7- Os compostos ácido dodecanóico, geranil acetona, fitol, Esqualeno, Vitamina E e Stigmast-5-en-3-ol são extraídos em maior concentração nas primeiras frações, enquanto que os compostos Friedelan-3-ol e Friedelin, são extraídas em maior quantidade nas frações seguintes, dentro das mesmas condições de extração.
- 8- Ocorre um efeito positivo da temperatura sobre o rendimento de extração dos compostos analisados, com exceção do esqualeno, sendo que a densidade do solvente foi a variável que apresentou o maior efeito positivo, especialmente para os triterpenos.
- 9- Foram identificados 18 compostos, sendo dez com padrões (limoneno, geranil acetato, ácido palmítico, fitol, esqualeno, vitamina E, stigmasterol, friedelan-3-ol, friedelin e friedelan-3-one).
- 10- Houve diferença significativa no rendimento de extrato e distribuição dos compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis obtidos por CO₂ em alta pressão nas 18 populações de *Maytenus ilicifolia*.
- 11- Não houve relação entre o agrupamento químico das populações e os agrupamentos ambientais e genéticos, bem com, não houve agrupamento dos *bulks* dentro de cada população, concluindo-se que as variáveis locais como microclima, insolação, condições nutricionais do solo, posição e idade da folha, variabilidade genética dentro das populações, dentre outros, possuem uma influencia maior para os compostos analisados que as condições macro-ambientais consideradas neste trabalho (latitude, longitude, altitude, temperatura média anual, vegetação, classificação climática de Koppen, geomorfologia e tipos de solo).