



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**AMANDA SILVA DE SOUSA**

**Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek: ASPECTOS ANALÍTICOS  
QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DA DROGA VEGETAL**

**João Pessoa/PB**

**2017**

**AMANDA SILVA DE SOUSA**

**Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek: ASPECTOS ANALÍTICOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DA DROGA VEGETAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora do curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal da Paraíba como exigência para conclusão do curso de Graduação em Farmácia (Generalista)

Orientador: Prof. Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio

**João Pessoa/PB**

**2017**

S725m      Sousa, Amanda Silva de.

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek: aspectos analíticos  
qualitativos e quantitativos da droga vegetal/ Amanda Silva de Sousa. -  
- João Pessoa: [s.n.], 2017.

34f.; il.--

Orientador: Ionaldo José Lima Diniz

BS/CCS/UFP

CDU:

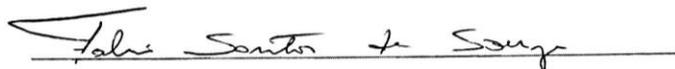
AMANDA SILVA DE SOUSA

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek: ASPECTOS ANALÍTICOS  
QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DA DROGA VEGETAL

Aprovado em: 30/11/2017



Orientador



Examinador



Examinadora

## **DEDICATÓRIA**

Primeiramente a Deus, pela força e discernimento que me deu para conseguir chegar tão longe em minha caminhada.

Aos meus pais que sempre foram as pessoas a mais acreditar no meu potencial, e que de todas as maneiras possíveis sempre me apoiaram.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por todas as conquistas que ele me proporcionou até agora, e peço ainda mais sabedoria para me guiar sempre de forma justa dentro da minha profissão.

Aos meus pais, por tudo que eles já fizeram por mim até hoje. Pois eles sempre foram a minha maior inspiração e força para seguir na minha caminhada. Com eles aprendi valores essenciais e principalmente o quanto a educação é importante na vida de uma pessoa. Me sinto grata e honrada de neste momento poder os deixar orgulhosos.

A meu irmão Artur, por sempre me presentear com seu carinho de irmão e me fazer querer ser forte para também o guiar pelos caminhos que a vida ainda vai trilhar.

A Gui, por se fazer presente neste momento tão importante, sempre me apoiando e incentivando para o meu melhor.

As minhas amigas Marcela, Rhyanne e Camilla, por terem me acompanhado ao longo de todos esses anos na UFPB e por terem se tornado uma segunda família durante esse tempo juntas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ionaldo Basilio, por ter me acolhido na UFPB desde a minha chegada de outra universidade, me proporcionando muito aprendizado desde a época de iniciação científica, até essa minha última tarefa acadêmica.

Ao Prof. Dr. Fábio e a querida Ms. Maria Denise, pela presença neste momento de realização e pela disponibilidade em fazer parte da minha banca examinadora.

## RESUMO

SOUSA, A.S.D., *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek: Aspectos quantitativos e qualitativos da droga vegetal. fls. 34 Monografia (Graduação). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

O presente estudo consiste na revisão bibliográfica dos métodos qualitativos e quantitativos utilizados no controle de qualidade da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. Espécie popularmente conhecida como, “espinheira-santa”, “erva cancerosa”, “espinho-de-deus”, “salva-vidas”. O objetivo principal foi o de reunir um conjunto de informações de considerável relevância, fundamentadas na literatura nacional e internacional, sobre os métodos qualitativos e quantitativos utilizados no controle de qualidade da *M. ilicifolia*. Além de descrever as características principais da *M. ilicifolia*, propriedades gerais, com ênfase nas propriedades utilizadas no tratamento de gastrite e úlceras gástricas. Algumas técnicas de controle de qualidade foram selecionadas, como os métodos gravimétricos, espectrofotométricos e a cromatográficos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Concluiu-se que temos uma boa variedade de técnicas a se utilizar para o controle de qualidade da droga vegetal *M. ilicifolia*, desde técnicas mais simples que podem ser utilizadas em laboratórios menos elaboradas, a técnicas sofisticadas e mais avançadas como a CLAE.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Maytenus ilicifolia*, CLAE, UV, Gravimetria.

## **ABSTRACT**

SOUSA, A.S.D., *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek: Quantitative and qualitative aspects of the vegetal drug. fls. 34 Monograph (Graduation). Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2017.

The present study consists of the bibliographic review of the qualitative and quantitative methods used in the quality control of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. Species popularly known as, "espinheira-santa", "cancerous herb", "thorn", "life-saving". The main objective was to gather a set of information of considerable relevance, based on the national and international literature, on the qualitative and quantitative methods used without quality control of *M. ilicifolia*. In addition to describing as main features of *M. ilicifolia*, general properties, with emphasis on real estate, without treatment of gastritis and gastric ulcers. Some quality control techniques were selected, such as gravimetric, spectrophotometric and chromatographic methods, such as High Performance Liquid Chromatography (HPLC). It was concluded that it is a good variety of techniques for a quality control application of the *M. ilicifolia* plant drug, from simpler techniques that can be used in less elaborated laboratories to sophisticated and more advanced techniques such as HPLC.

**KEY WORDS:** *Maytenus ilicifolia*, HPLC, UV, Gravimetry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1: Características morfológicas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 2: Flores de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....</b>	<b>19</b>

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1: Gradientes da fase móvel ..... 25**

**Tabela 2: Métodos e parâmetros de comparação dos artigos selecionados ..... 27**

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Artigos científicos selecionados .....	20
--	----

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 Problemática .....	14
1.3 Justificativa da pesquisa .....	14
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivos geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
4.1 Família Celastaceae .....	17
4.2 <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek .....	18
4.3 Métodos analíticos utilizados no controle de qualidade de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	20
4.3.1 Gravimetria e espectrofotometria na determinação de taninos .....	21
4.3.2 Espectrofotometria .....	22
4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	24
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>28</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	

# 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, observou-se um crescimento no uso da medicina tradicional e complementar pela população dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, como uma alternativa a terapia alopática na atenção básica, já que esta, possui um menor custo e também maior acessibilidade (WHO, 1999).

Em 3 de maio de 2006 foi criada a portaria do ministério da saúde de nº 971, que em suas diretrizes aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Está que engloba a Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e também medidas para incentivar o acesso dos usuários (Brasil, 2006). Também visando melhorias no controle de qualidade de fitoterápicos foi criada a RDC 14/2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), publicada, no dia 5 de abril de 2010, onde ela atualiza os procedimentos de registro desse tipo de medicamento, com as principais mudanças focadas no controle de qualidade, adequando os testes utilizados ao nível de conhecimento científico internacional (ANVISA, 2010).

De forma a melhorar o controle de qualidade dos fitoterápicos e dos produtos tradicionais fitoterápicos, foi implementada a RDC 26/2014 que dispõe sobre seus registros. Onde está estabelece os requisitos mínimos para o registro e renovação de registro de medicamento fitoterápico e dos produtos tradicionais fitoterápicos (ANVISA, 2014).

Entre os anos de 2013 e 2015 foi possível observar que, no Brasil houve um aumento na busca por tratamentos que utilizam como base as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2016). A maior procura e crescimento da popularidade das plantas medicinais e dos fitoterápicos, nos faz atentar para problemas adversos de saúde que podem ser causados por: adulteração dos produtos com outros componentes, erros de identificação dessas drogas, contaminação por substâncias tóxicas e interações com outras medicações (KLETER et al., 2009).

É de grande importância para o consumidor ao adquirir produtos como fitoterápicos e drogas vegetais, que este tenha a segurança de estar comprando a droga com o ativo correto e também que este esteja na quantidade mínima descrita nas literaturas oficiais. Os métodos analíticos qualitativos e quantitativos aplicados ao

controle de qualidade vão ter justamente o papel de garantir a qualidade do produto que o consumidor está adquirindo, fato diretamente ligado ao efeito que esse produto vai apresentar.

## 1.1 PROBLEMÁTICA

Devemos ressaltar a importância do controle de qualidade das drogas vegetais, para assegurar que os produtos que estão sendo comercializados contenham realmente substâncias bioativas na quantidade mínima aceitável, e que este também não esteja contaminado por fungos, bactérias ou defensivos agrícolas.

A forma como a *Maytenus ilicifolia*, é comercializada, que é geralmente pulverizada ou rasurada, dificulta a identificação morfológica da droga. Onde está, pode vir contaminada por outras substâncias, ou até mesmo com a droga ativa trocada. Isto mostra a relevância do controle de qualidade aplicado as drogas vegetais.

## 1.2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A escolha do tema se deu principalmente pelo fato de que a *M. ilicifolia* é uma droga vegetal muito utilizada pela população, seja na forma de fitoterápico ou da droga na sua forma bruta, apenas rasurada. Dado o número de estudos que comprovam a sua ação e importância no tratamento de enfermidades, se faz necessário chamar atenção para métodos de controle de qualidade que possam ser utilizados para trazer uma maior confiabilidade no produto que está sendo comercializado para a população.

O levantamento bibliográfico feito sobre os métodos utilizadas no controle de qualidade da *M. ilicifolia*, visa justamente dar um embasamento inicial das técnicas disponíveis.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Reunir um conjunto de informações de considerável relevância, fundamentadas na literatura nacional e internacional, utilizando as principais técnicas analíticas qualitativas e quantitativas aplicadas no controle de qualidade da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Abordar sobre os principais métodos utilizadas no controle de qualidade da *M. ilicifolia*;
- Realizar uma revisão sobre os principais métodos utilizadas no controle de qualidade dos marcadores específicos da droga vegetal selecionada.

### 3 METODOLOGIA

A pesquisa bibliográfica realizada possui um caráter científico. Com informações de origem nacional e internacional sobre os métodos analíticos utilizados no controle de qualidade da *M. ilicifolia*. Os dados foram coletados de forma indireta por meio de fontes secundárias como: livros, artigos científicos, teses e na base de dados periódicos CAPES/MAC, abrangendo as plataformas: SciELO, PubMed e Google acadêmico. Foram selecionados trabalhos 6 artigos publicados entre os anos de 2004 a 2015.

A palavra chave utilizada na busca em bancos de dados foi *Maytenus ilicifolia* e os artigos selecionados para esta revisão estão de acordo com os seguintes critérios: abordagem do tema análise qualitativa e quantitativa, relacionado aos marcadores químicos e técnicas espectroscópicas, cromatográficas e alternativas.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Família Celastraceae

Segundo Spivey e colaboradores (2002), a família Celastraceae é formada por 106 gêneros e 1300 espécies, estas são amplamente encontradas em regiões tropicais e subtropicais, que incluem o norte da África, América do Sul e algumas partes do leste da Ásia, particularmente na China. Algumas características são típicas dessa família, grande parte apresenta-se como pequenas árvores, com cascas e folhas resinosas. As espécies da família são bastante estudadas, devido a sua ação terapêutica popularmente conhecida, por sua ampla distribuição geográfica e também grande diversidade e complexidade estrutural dos metabólitos secundários isolados da mesma (COPPEDE et al., 2014).

Na família Celastaceae, o gênero *Maytenus* se destaca como o de maior número, estando inserido na subfamília Celastroideae. Cerca de 76 espécies são encontradas no Brasil em diferentes ambientes, como na mata atlântica (*M. distichophylla*, *M. macrophylla*), mata de altitude (*M. erythroxyton*), campos rochosos (*M. opaca*) e em regiões da caatinga (*M. truncata*, *M. imbricata*, *M. ilicifolia*, *M. catingarum*, *M. impressa*, *M. obtusifolia*), predominantemente distribuída entre os estados da Bahia e Ceará (ROCHA et al., 2004; NIERO et al., 2011). A muitos anos, as folhas de *Maytenus* são utilizadas no Brasil, na forma de infusão pelos indígenas no tratamento de problemas gastrointestinais (hiperacidez, úlceras gástricas, duodenais e gastrite crônica) (ROCHA, et al., 2004).

Em seu estudo Niero e colaboradores (2011) mostram que as substâncias isoladas dos extratos do gênero *Maytenus* tem apresentado significativa atividade biológica. Apesar de seus bons resultados, apenas 15% das 76 espécies conhecidas, tem seu efeito farmacológicos estudados. Os efeitos corroboram com as classes de substâncias isoladas no gênero, como: flavonoides, taninos condensados triterpenos, sesquiterpenos e alcaloides.

## 4.2 *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek

A espécie *M. ilicifolia* é originária do sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e norte da Argentina. Os estudos apresentados sobre está, mostram a sua importância e uso comum no tratamento de úlceras gástricas, sendo já encontrados fitoterápicos a base do seu extrato (JORGE et al., 2004). Ela é popularmente conhecida como “espinheira-santa”, “erva cancerosa”, “espinho-de-deus”, “salva-vidas” (NIERO et al., 2011).

Estudos prévios mostram que os extratos das folhas da *M. ilicifolia* apresentam notória atividade farmacológicas, entre elas o efeito protetor em lesões gástricas. (JORGE et al., 2004; LEME et al., 2013).

Morfologicamente, a espinheira-santa é caracterizada como um subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, com cerca 5,0 m de altura. Seus ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados onde suas folhas apresentam a margem inteira ou com espinhos em número de um a vários, distribuídos regular e irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos (Fig. 01). Suas flores apresentam-se pequenas, brancas e pouco vistosas (Fig. 02) (CARVALHO-OKANO, 1992; RAMDOMSKI, 1998; BITTENCOURT, 2000).

**Figura 01:** Características morfológicas de *Maytenus ilicifolia*.



Disponível em:<<https://sites.google.com/site/florasbs/celastraceae/espinheira-santa>> Acesso em 24 out. 2017.

**Figura 02:** Flores de *Maytenus ilicifolia*.



Disponível em: <<http://meubloguezinho-dudu.blogspot.com.br/2010/10/droga-derivada-de-uma-arvore-de-folha.html>> Acesso em 24 out. 2017.

Quanto as suas propriedades farmacológicas Cunha e colaboradores (2004), relatam que a *M. ilicifolia* apresenta um leque diversificado de atividades, com destaque para o seu uso no tratamento de gastrite e úlcera péptica. Estudos feitos com o infuso das folhas da *M. ilicifolia* demonstram efeito comparável a medicamentos como ranitidina e cimetidina (SOUZA et al., 1991).

Outras ações farmacológicas também são atribuídas ao extrato da droga vegetal, como atividade antineoplásica (ALONSO, 1998), antioxidante (MATTEI et al., 1998), antimicrobiana (LIMA et al., 1969) entre outras.

Na composição química da *M. ilicifolia*, várias classes de metabolitos secundários foram identificadas, como os taninos, flavonoides (epicatequina, epigallocatequina). Além destes, também foram identificadas outras substâncias como: terpenos (maitenina, tringenona, isotenginona II, congorosinas A e B, ácido maitenólico), triterpenos (friedelanol e friedelina) e óleos essenciais (friedenelol), glicolipídeos (monogalactosildiácilglicerol, digalactosildiácilglicerol, trigalactosildiácilglicerol, tetragalactosildiácilglicerol e sulfoquinovosildiácilglicerol) e os alcaloides (maiteina, maitanprina e maitensina) (ALONSO, 1998; CARLINI et al., 1988; MENDES et al., 2006).

### 4.3 Métodos analíticos utilizados no controle de qualidade da *Maytenus ilicifolia*

Após levantamento bibliográfico foram registrados cinco artigos científicos que apresentam que tratam da análise qualitativa e quantitativa de classes de metabólitos especiais e/ou marcadores químicos (Quadro 1).

QUADRO 1 - Artigos científicos selecionados.

Título	Ano de publicação	Autores
“Comparação do teor de taninos entre duas espécies de espinheira-santa ( <i>Maytenus aquifolium</i> Mart. e <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek) cultivadas no Horto Medicinal do Refúgio Biológico Bela Vista - RBBV da Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, PR - Brasil.”	2015	HOLNIK <i>et al.</i> , 2015
“Análise farmacognóstica de amostras de espinheira santa - <i>Maytenus ilicifolia</i> (Schrad.) Planch. (Celastraceae) comercializadas em farmácias e banca popular de Votuporanga – São Paulo”	2012	SILVA <i>et al.</i> , 2012
“Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de <i>Maytenus</i> (Celastraceae) e de <i>Passiflora</i> (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV”	2008	CHABARIBERI <i>et al.</i> , 2008
“Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of <i>Maytenus ilicifolia</i> ”	2004	SOARES <i>et al.</i> , 2004
“Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in <i>Maytenus ilicifolia</i> (Schrad.) Planch., Celastraceae “	2010	LOPES <i>et al.</i> , 2010
“A quantitative validated method using liquid chromatography and chemometric analysis for evaluation of raw material of <i>Maytenus ilicifolia</i> (Schrad.) Planch., Celastraceae.”	2011	BELTRAME <i>et al.</i> , 2011

### 4.3.1 Gravimetria e espectrofotometria na determinação de taninos

Segundo Skoog e colaboradores (2006), os métodos gravimétricos são quantitativos e se baseiam na determinação da massa de um composto puro ao qual o analito está quimicamente relacionado. Esta metodologia de análise baseia-se principalmente na medida de massa feita com auxílio de uma balança analítica, instrumento que fornece dados altamente exatos e precisos. Vários métodos analíticos fundamentam-se nas medidas de massas. Entre os métodos que utilizam o fundamento da medida de massas, podemos citar a gravimetria por precipitação, onde o analito vai ser separado de uma solução da amostra como um precipitado e então convertido a uma espécie de composição já designada que possa ser pesada. A gravimetria de volatilização, onde o analito vai ser isolado dos outros componentes da amostra pela conversão a um gás de composição química elucidada. O peso desse gás vai servir como a medida da concentração do analito.

Mais outros dois tipos de gravimetria são citados na literatura. A eletrogravimetria, onde o analito é separado pela deposição em um eletrodo por meio do uso de uma corrente elétrica. A massa desse produto fornece então uma medida da concentração do analito (SKOOG et al., 2006). A titulação por gravimétrica, onde vai se medir a massa do reagente, que possua uma concentração conhecida, necessária para reagir totalmente com o analito, fornecendo então a informação necessária para determinar a sua concentração (SKOOG et al., 2006) E por último a espectrometria de massas atômicas, onde vai se empregar um espectrômetro de massas para fazer separação dos íons gasosos formados a partir dos elementos que compõem uma amostra da matéria. A concentração destes íons resultantes é então determinada pela medida da corrente elétrica que ser produzida quando esses íons atingirem a superfície de um detector iônico (SKOOG et al., 2006).

A Farmacopeia Brasileira preconiza a análise gravimétrica como teste para o controle de qualidade da espinheira-santa, por meio da quantificação de taninos totais.

Está técnica consiste na extração da droga pulverizada com água, por meio do aquecimento da amostra. Ao extrato da droga se adiciona o reagente fosfomolibdotúngstico e se faz a leitura da absorbância da amostra em 760 nm.

Nessa técnica também são medidas a absorbância da solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele e também a absorbância da solução padrão,

a porcentagem de taninos é expressa então em pirogalol (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2012). Esta técnica foi empregada em um estudo realizado por Holnik e colaboradores, onde eles quantificaram o teor de taninos totais em amostras de Maytenus. Os resultados encontrados estavam em conformidade com os valores pré-estabelecidos na farmacopeia brasileira para polifenóis e taninos totais, mostrando assim eficiência no método (HOLNIK, 2015).

Em 2008 um estudo realizado por Silva e colaboradores (2012), foi feita a quantificação de taninos totais por meio de um método gravimétrico que apresenta uma metodologia diferente do preconizado pela farmacopeia brasileira. O método de extração seguiu o mesmo princípio, onde se utilizou a água como extrator por meio de aquecimento, porém a quantificação dos taninos foi adaptada de uma metodologia descrita por Caldeira e colaboradores (1998), onde foi adicionado acetato de cobre a 4% à solução e então foram efetuadas pesagens para se observar a formação de um precipitado, o tanato de cobre. Com isso, ao final, foi possível se observar o peso dos taninos totais contidos na amostra. A metodologia em questão se mostrou eficiente e simples, conseguindo atingir o objetivo proposto e quantificando de maneira eficiente o teor de taninos totais na amostra.

#### **4.3.2 Espectrometria**

Segundo Skoog e colaboradores (2006), a espectrometria tem como fundamento as interações da radiação com a matéria. Os métodos espectroscópicos de análise baseiam-se na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse. A classificação dos métodos vai ser de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida na medida. As regiões espectrais que têm sido empregadas são raios g, os raios X, ultravioleta (UV), visível, infravermelha (IV), microondas e radiofrequência (RF). Os métodos espectroquímicos têm se mostrado como uma das ferramentas mais amplamente empregadas para a elucidação de estruturas moleculares, bem como na determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos (SKOOG et al., 2006).

Os métodos espectrométricos são muito utilizados na identificação e quantificação de compostos, se mostrando de grande importância na quantificação de

marcadores no controle de qualidade da *M. ilicifolia*, Chabariberi e colaboradores (2008), desenvolveram um trabalho utilizando uma técnica que apresenta uma modificação do método originalmente descrito nas Farmacopeias Francesa e Europeia para a quantificação de flavonoides. Na metodologia empregada o material foi extraído utilizando-se uma solução etanol:água sob refluxo. Uma alíquota da solução de trabalho rotaevaporada foi posteriormente dissolvida em metanol e adicionado os seguintes reagentes, ácido acético glacial, ácido fórmico e ácido acético anidro. Posteriormente, foi acrescentado ALCL3 a solução final e foi medida a sua absorvância no comprimento de onda de 419 nm (Pharmacopée Française, 1992; European Pharmacopoeia, 2000).

Algumas modificações importantes foram feitas na metodologia fundamentada das Farmacopeias Francesa e Europeia, com o intuito de melhorar os resultados obtidos. Uma destas foi o comprimento de onda utilizado para medir a absorvância, que foram alterados para  $\lambda$  máx = 412 nm (F.F.) e 419 nm (F.E.) para os extratos de *Maytenus* (Celastraceae). Optou-se pela leitura no máximo de absorção por conta da presença de O-glicosídeos e duas agliconas nos extratos de *M. ilicifolia* (TIBERTI et al., 2007). Outra alteração feita, foi a escolha da rutina como substância de referência para construção da curva analítica e cálculo do teor de flavonoides totais, modificação justificada por esta ser um flavonol diglicosilado (derivado de quercetina), cuja estrutura química é próxima dos flavonoides glicosilados presentes na espécie estudada e também pelo seu menor custo em relação a outros padrões de flavonoides utilizados.

Os resultados obtidos com o emprego dessa metodologia mostraram um aumento na concentração de flavonoides, quando comparados com os resultados das farmacopeias utilizadas como referência, fato que foi explicado por uma possível reação dos constituintes do extrato da *M. ilicifolia* com o ácido bórico. Uma comparação dos resultados obtidos com a metodologia modificada da Farmacopeia Francesa e a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), mostra que este método é uma alternativa para a quantificação de flavonoides, devido os seus bons resultados, seu baixo custo, rapidez e menor quantidade de reagentes utilizados quando comparado ao método de CLAE (CHABARIBERI et al., 2008).

### 4.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. Skoog preconiza o uso desta técnica para separar e determinar espécies em uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido, o qual contém a amostra na forma de uma mistura de solutos. O tipo de cromatografia líquida de alta eficiência é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária. Estes incluem a partição ou cromatografia líquido-líquido, adsorção ou cromatografia líquido-sólido, troca iônica ou cromatografia de íons, cromatografia por exclusão, cromatografia por afinidade, cromatografia quiral (SKOOG et al., 2006).

Alguns fatores são de importância para a CLAE, e a escolha destes vai depender da natureza da molécula analisada. O sistema de solventes utilizado é um destes. A eluição com um único solvente ou com uma mistura de solventes de composição constante é denominada isocrática e a eluição por gradiente, dois tipos de sistemas solventes com diferenças significativas de polaridade são empregados. Quanto aos sistemas de bombeamento utilizados, há três tipos principais de bomba: a de seringa acionada por rosca, a bomba recíproca e a bomba pneumática de pressão constante (SKOOG et al., 2006).

Além dos fatores já citados deve-se observar a importância do tipo de coluna utilizada. O tipo de colunas mais utilizada na cromatografia líquida, possui como recheio partículas de sílica, as quais são sintetizadas aglomerando-se partículas de sílica de tamanho submicrométrico sob condições que levam à formação de partículas maiores com diâmetros altamente uniformes. Outros tipos de materiais utilizados como recheio são as partículas de alumina, polímeros porosos e resinas de troca iônica (SKOOG et al., 2006).

Outro elemento de crucial importância na CLAE é o tipo de detector a ser utilizado. O detector deve ser pequeno e compatível com a vazão de líquido. Nenhum sistema de detecção universal de alta sensibilidade está disponível para a cromatografia líquida de alta eficiência. Dessa forma, o tipo de detector a ser empregado vai depender da natureza da amostra analisada. Os tipos de detectores que são mais amplamente utilizados na cromatografia líquida baseiam-se na absorção

da radiação ultravioleta ou visível fazendo o uso das linhas a 254 nm e 280, já que muitos grupos funcionais orgânicos são absorvidos nessa região. Nos instrumentos modernos se utiliza arranjos lineares de fotodiodos que podem adquirir um espectro completo à medida que o analito deixa a coluna (SKOOG et al., 2006).

A CLAE é uma das técnicas utilizadas para quantificar marcadores da *M. ilicifolia* (tabela 1). Esta metodologia é uma das descritas pela Farmacopeia Brasileira para o controle de qualidade da droga vegetal em questão. Segundo esta, deve se utilizar um cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 210 nm, uma pré coluna empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano, coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (5 µm) com fluxo da Fase móvel de 0,8 mL/minuto. Os eluentes indicados são mistura de água e ácido trifluoracético a 0,05 % (v/v) (eluyente A) e uma mistura de acetonitrila e ácido trifluoracético a 0,05% (v/v) (eluyente B), conforme tabela 2. O gradiente da fase móvel deve adotar sistema de gradiente descrito na tabela a baixo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2012).

TABELA 1: Gradiente da fase móvel.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Eluyente A (%)</b>	<b>Eluyente B (%)</b>	<b>Eluição</b>
<b>0-13</b>	82 → 75	18 → 25	Gradiente linear
<b>13-16</b>	75 → 66	25 → 34	Gradiente linear
<b>16-20</b>	66 → 58	34 → 42	Gradiente linear
<b>20-23</b>	58 → 35	42 → 65	Gradiente linear
<b>23-25</b>	35 → 82	65 → 18	Gradiente linear
<b>25-28</b>	82	18	Isocrática

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2012.

Soares e colaboradores (2004), propuseram um método simples e rápido para determinação e simultânea separação de catequina e epicatequina de extratos aquosos em folhas de *M. ilicifolia*, visando resolver alguns problemas como o uso de fases de eluição complexas, trabalho extensivo para preparação de amostras, baixa resolução e grande tempo para uma separação total do material e seus constituintes. Em sua metodologia foi utilizado um cromatografo acoplado a detector por UV a 280 nm, pré-coluna Shimadzu, coluna Nova-Pak C18RP-column 150mm x 39mm i.d., com fluxo da fase móvel de 1,5 ml / min. Como eluente foi utilizada uma solução de acetonitrilo, água, ácido acético (50:49:1 v/v/v). O ensaio de validação do método proposto mostrou adequação na separação e quantificação da catequina e epicatequina nos extratos aquosos. Não apresentando variações significativas nos picos e tempos de retenção mostrando ser um método rápido simples e preciso, que pode ser utilizado em futuras quantificações (SOARES *et al.*, 2004)

Lopes e colaboradores (2010) desenvolveram e validaram um método de CLAE para determinação de epicatequina, este que fosse simples e reprodutível. Foi utilizado um cromatografo com leitor de UV a 210 nm para detecção e determinação, coluna RP C-18 (5 µm) como fase estacionária, com fluxo de 0,8 mL/min, a fase móvel foi constituída por água (0.05% TFA) como solvente A e acetonitrilo (0.05% TFA) como solvente B. Para remoção de substâncias interferentes foi utilizada uma mistura de água e acetato de etila o que otimizou a extração de taninos condensados da amostra, modificação esta que se mostrou simples e eficaz.

Todas as técnicas de separação apresentam alguma espécie de limitação quanto a sua aplicação, na CLAE-UV/VIS há uma limitação quanto a detecção de algumas substâncias, fato que pode ser atribuído a presença de cromóforos. Com o intuito de diminuir essas limitações alguns recursos podem ser utilizados como, o uso de detector de arranjo de diodo (DAD) (BELTRAME *et al.*, 2012).

Beltrame e colaboradores (2012), fizeram modificações no detector e coluna visando contornar possíveis problemas. Outro fato observado é que os dados gerados pela análise por CLAE, em sua maioria, são complexos para serem analisados visualmente (BELTON, 1998). Com o propósito de otimizar sua compreensão algumas técnicas podem ser utilizadas, como por exemplo a análise multivariada. Esta pode ser fundamentada pela impressão digital cromatográfica dos compostos (LYANG *et*

al., 2004). Beltrame e colaboradores usaram a análise multivariada para otimizar o resultado de suas análises. Em seu estudo foi utilizada a técnica de CLAE acoplada a detector óptico matriz de diodos 200-400 nm, coluna sílica de fenilhexil, fase móvel composta por água com AcOH 0,1% como solvente A e uma solução de ACN como solvente B com fluxo de 1 mL/min. Os métodos utilizados demonstraram-se proveitosos para o controle de qualidade de matérias-primas compostas por *M. ilicifolia* (BELTRAME *et al.*, 2012).

Na tabela 2 foram resumidos os principais parâmetros utilizados por cada pesquisador em seu estudo, assim possibilitando uma melhor visualização das diferenças e semelhanças entre os artigos selecionados.

TABELA 2: Métodos e parâmetros de comparação dos artigos selecionados

Autores	SOARES <i>et al.</i> , 2004	LOPES <i>et al.</i> , 2010	BELTRAME <i>et al.</i> , 2012
Técnica	CLAE-UV	CLAE-UV	CLAE-DAD
Preparo da amostra	H <sub>2</sub> O	Acetato de etila/metanol	Etano/H <sub>2</sub> O
Marcadores	Catequina e Epicatequina	Epicatequina	Epicatequina
Coluna	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub>	Sílica de fenilhexil
Fase móvel	ACN:H <sub>2</sub> O:A cOH	ACN:H <sub>2</sub> O:A cOH	ACN:H <sub>2</sub> O:A cOH
Comprimento de onda	280 nm (UV)	210 nm (UV)	210 nm (UV)
Fluxo	1,5 ml / min	0,8 mL / min	1,0 mL / min

Fonte: Do autor.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de controle de qualidade para a *M. ilicifolia* são bem diversificadas e apresentam boa confiabilidade. Os métodos gravimétricos para quantificação de taninos totais podem ser considerados técnicas viáveis, já que não utilizam aparelhos de custo muito alto, facilitando então o seu uso na rotina de laboratórios que não tenham acesso a técnicas mais sofisticadas para o controle de qualidade.

O desenvolvimento de um método espectroscópico alternativo para análise de marcadores da *M. ilicifolia* se mostra de grande importância, já que a metodologia possibilita o uso de outro marcador de importância da *M. ilicifolia*, que está diretamente ligado com a sua atividade farmacológica, tendo em vista que na Farmacopeia Brasileira apenas um marcador é utilizado para este controle de qualidade. Outro benefício que a técnica mostra é o uso de um padrão de menor custo, a rotina. Resultados bastante eficientes também são observados quando se compara esta técnica com a CLAE, apresentando um baixo custo, rapidez e uso de uma menor quantidade de reagente. Este conjunto de fatos destaca a importância do uso dessa técnica no controle de qualidade da droga vegetal.

O método mais utilizados entre os estudos selecionados, foi o de CLAE. Este que é preconizada pela Farmacopeia Brasileira e que apresenta uma alta confiabilidade na análise quantitativa dos marcadores epicatequina e catequina, utilizados no controle de qualidade da *M. ilicifolia*. Algumas modificações positivas podem ser observadas entre as técnicas utilizadas nos estudos selecionados, visando melhorias na análise e otimização do tempo. A técnica de CLAE demonstrou ser de grande importância quando se leva em consideração parâmetros como a precisão, exatidão e rapidez na análise, tendo como ponto negativo apenas o seu alto custo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, JR. **Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, p. 828-834, 1998.

ANVISA, Agência nacional de vigilância sanitária. Diário oficial da união, Brasília – DF, março, 2004.

AMORIM, W.P. **Redução de atributos utilizando análise discriminante de fisher com aplicações na detecção de defeitos de couro bovino**. Campo grande. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS.

ANDENBERG, A.A. **The families and genera of vascular plants, k. Kubitzki (ed.). Springer – verlag Compositae**. Pg. 61- 588. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey (eds.). Flowering plants eudicots asterales, vol. Viii., 2007.

BARROSO, G.M, et al. **Sistemática de angiospermas do brasil**. Viçosa, imprensa universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1984.

BRASIL, 2006 - Portaria N° 971, de 03 de maio de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

BRASIL, 2013 – RDC N° 48, DE 25 de outubro de 2013.

BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Lista de espécies flora do Brasil. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>

BRASIL. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. **Portal Brasil**, 2016. Disponível em < <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>> Acesso em: 10 ago. 2017.

BELTON, P. S., et al. **Food Chem.** 61, 207, 1998.

BELTRAME, F., et al. **A QUANTITATIVE VALIDATED METHOD USING LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CHEMOMETRIC ANALYSIS FOR EVALUATION OF RAW MATERIAL OF *Maytenus ilicifolia*(SCHRAD.) PLANCH., CELASTRACEAE.** Ponta Grossa, 2011.

BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD.** Curitiba, 2000. 58f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO-OKANO, R.M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* MOL. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico.** Campinas, 1992. 253f. Dissertação de Doutorado - Instituto de Biologia. UNICAMP.

CARLINI, EA; FROCHTENGARTEN, ML. **Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*).** Brasília Distrito Federal, p. 67-73, 1988.

COULAND-CUNHA S, Oliveira RS, WAISSMAN W. **Venda Livre de *Sorocea Bompladii* Bailon como Espinheira Santa no Município do Rio de Janeiro.** Congresso Ibero-Americano de Plantas Medicinais, Angra dos Reis, 2004.

COPEEDE, J.S., PINA, E.S., PAZ, T.A., FACHIN, A.L., MARINS, M.A., BERTONI, B.W., FRANC a, S.C., PEREIRA, A.M.S. **Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. Are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura.** Plant Cell Tissue Org. Cult. 118, 33–43. 2014.

CHABARIBERI, REGINA, et al. **Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV.** São Carlos, 2008.

DI, S.L. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar.** São Paulo: UNESP; 1996. EUROPEAN PHARMACOPEIA. 3. ed. Supplement Strasbourg: Council of Europe. 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5 eds. **Volume 2-Monografias**, ANVISA, 2012.

PHARMACOPÉE FRANÇAISE. Paris: Ministère de la Santé. 10. ed. Paris, 1992.

HOLNIK, P.R., et al. **Comparação do teor de taninos entre duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas no Horto Medicinal do Refúgio Biológico Bela Vista - RBBV da Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, PR – Brasil.** Foz do Iguaçu, 2015.

JORGE, R.M., J.P.V. LEITE, A.B. OLIVEIRA, C.A. TAGLIATI. **Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*.** J. Ethnopharmacol., pp. 93-100, 2004.

LIMA OG, COELHO JSB, WEIGERT E, D'ALBUQUERQUE IL, SOUZA MAM. **Substâncias antimicrobianas de plantas superiores.** Rev Inst Antibioticos 9: 17-25, 1969.

LIANG, Y. Z., et al. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 812, 53, 2004.

LOPES, G.C., et al. **Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae.** Maringá, 2010.

MATTEI, R; CARLINI, ELA. **Propriedades anti-oxidantes (lipoperoxidação) da *Pfaffia glomerata*, *Heteropteris aphrodisiaca*, *Maytenus ilicifolia*: estudo in vitro.** 15º XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Águas de Lindoia, 1998.

MENDES, BG; MACHADO, MJ; FALKENBERG, M. **Triagem de glicolipídios em plantas medicinais.** Rev Bras Farmacogn 16: 568-575, 2006.

NIERO et al. **A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* Genus.** Curr. Pharm. Des., pp. 1851-1871, 2011.

RADOMSKI, M.I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa – Paraná.** Curitiba, 1998. 98f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná

ROCHA, C.S. **Morfoanatomia de folhas de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae): uma espécie utilizada como medicinal no nordeste do Brasil.** Acta Farm.Bonaerense, v. 23, p. 472-476, 2004.

SPIVEY, A. C.; WESTON, M.; WOODHEAD, S. **Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis.** Chem. Soc. Rev., v. 31, p. 43-52, 2002.

SILVA, et al. **Análise farmacognóstica de amostras de espinheira santa - *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) comercializadas em farmácias e banca popular de Votuporanga – São Paulo.** São Paulo, 2012.

SIMÕES, C., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis; 2002.

SOUZA, ML; OLIVEIRA, MG; MONTEIRO, MG; SILVEIRA, NG; BRAZ, S; CARLINI, EA. **Antiulcerogenics effects of two Maytenus species in laboratory animals.** *J Ethnopharmacol.* 34: 21-27, 1991.

SOARES, L.A.L, et al. **Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of Maytenus ilicifolia.** Natal, 2004.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, *Fundamentos de Química Analítica*, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

TIBERTI, L.A., et al. **Identification of flavonols in leaves of Maytenus ilicifolia and M. aquifolium (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis.** *J Chromatogr.* 846: 378-384, 2007.

WHO. *Monographs on Selected Medicinal Plants.* Vol. 1, p. 295, 1999.