



Triagem de flavonoides em banco de germoplasma de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium*)

Sandra Aparecida Sahyun¹, Loana Aparecida Pereira da Silva Johansson², Luiz Vicente Miranda², Matheus Sampaio Goveia³, Mariana Bortholazzi Almeida³, Suzana Lucy Nixdorf³, Jose Roberto Pinto de Souza^{1*}

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445, km 380, 86057-970, Londrina, PR, Brasil.; ²KLABIN, 84279-000, Telêmaco Borba, PR, Brasil.; ³Laboratório DIA, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445, km 380 Campus Universitário, CEP 86.057-970, Londrina, PR. *Autor para correspondência: jose@uel.br

RESUMO: *Maytenus aquifolium* é uma espécie medicinal nativa em Telêmaco Borba, PR. Nesta região a espécie expressa variabilidade genética de média a alta. O objetivo desse estudo foi a investigação preliminar dos teores de rutina, quercetina e canferol em matrizes de *M. aquifolium* acervadas no banco de germoplasma nativo em Telêmaco Borba, PR pelo método CLAE. A triagem da variabilidade química em *M. aquifolium* (Celastraceae) determinada pelos teores de flavonoides, nesta espécie conhecida como “espinheira santa”, foi investigada em espécimes nativas no Brasil, em 2011. O teor do flavonoide rutina variou de $1,884 \pm 0,003$ a $287,958 \pm 1,244$ mg/g em folhas secas. O teor do flavonoide quercetina variou de $1,795 \pm 0,03$ a $3,788 \pm 0,07$ mg/g de folhas secas. O teor do flavonoide canferol variou de $0,157 \pm 0,003$ a $1,114 \pm 0,035$ mg/g em folhas secas. As informações referentes aos teores de rutina, quercetina e canferol obtidas em folhas de espinheira santa foram estatisticamente significativas e indicaram a necessidade de mais estudos sobre essa espécie no banco de germoplasma nativo em Telêmaco Borba-PR.

Palavras-chave: flavonoides, germoplasma, espinheira-santa, CLAE.

ABSTRACT: Screening of flavonoids on a germplasm bank of espinheira-santa (*Maytenus aquifolium*). *Maytenus aquifolium* is a native medicinal specie at Telêmaco Borba, PR, In this region the species shows genetic variability from medium to high. The objective of this study was the preliminary investigation of the levels of rutin, quercetin and kaempferol in *M. aquifolium* matrices stored in the native germplasm bank at Telêmaco Borba, PR by HPLC. The chemical variability of *M. aquifolium* (Celastraceae), a Brazilian medicinal plant known as “espinheira santa”, was investigated on specimens native at Telemaco Borba, PR, Brazil, at the 2011. The content of flavonoids rutin and kaempferol varied from 1.884 ± 0.003 to 287.958 ± 1.244 mg/g dried leaves. The content of flavonoids quercetin varied from 1.795 ± 0.03 to 3.778 ± 0.07 mg/g dried leaves. The content of flavonoids kaempferol varied from 0.157 ± 0.003 to 1.114 ± 0.035 mg/g dried leaves. The information on the levels of rutin, quercetin and kaempferol obtained from leaves of the species were statistically significant and indicated the need for further studies on this native species at Telêmaco Borba, PR.

Key words: Flavonoids, germoplasm, espinheira-santa, HPLC.

INTRODUÇÃO

Maytenus aquifolium Mart. é uma Celastraceae popularmente conhecida como “espinheira santa”. Medicinalmente apresenta princípios ativos antiulcerogênicos de ação comprovada por pesquisas coordenadas pela CEME (Central de Medicamentos) do Ministério da Saúde do Brasil. As atividades farmacológicas estudadas

nessa espécie medicinal estão associadas aos grupos de flavonoides entre outros (Di Stasi 2004). *M. aquifolium* é indicada para problemas gástricos (Calou et al. 2014). Testes em laboratório revelaram a ação antiulcerogênica e analgésica, destacando que os componentes antioxidantes como flavonoides podem ter ação contra lesões gástricas (Gonzalez et al. 2001) e que compostos bioativos em doses

Recebido para publicação em 24/08/2017

Aceito para publicação em 27/10/2021

Data de publicação em 09/11/2021

ISSN 1983-084X

© 2019 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

baixas também podem apresentar potente atividade antitumoral e antileucêmica (Lorenzi e Matos 2002).

M. aquifolium está protegida em unidades de conservação em Telêmaco Borba-PR, onde é nativa. Está incluída no banco de germoplasma (BAG) localizado no município de Telêmaco Borba, fazenda Monte Alegre, PR, os quais apresentam matrizes cujo coeficiente de dissimilaridade entre estas varia entre 3% a 100% (Sahyun et al. 2010; Souza et al. 2009).

A rutina, quercetina e canferol são flavonoides identificados em *M. aquifolium* (Yariwake et al. 2005; Chabariberi et al. 2009) e utilizados pela indústria farmacêutica em grande escala, tendo maior importância o princípio ativo rutina (Gomes e Gomes 2000). Esses autores relataram em 2000 que 60% apenas da demanda mundial de rutina era atendida, indicando a expansão do mercado e justificando a preocupação com a integridade e preservação das espécies produtoras desse princípio ativo, como é o caso de *M. aquifolium*.

A quantificação do grau de dissimilaridade de metabólitos secundários entre gêneros, espécies, subespécies, populações e genótipos utilizados é importante no estudo e análises de populações e no melhoramento de plantas (Reif et al. 2013). Em recursos genéticos, em que geralmente são caracterizados e conservados acessos de germoplasma, esta ferramenta também é bastante útil na identificação da variabilidade genética e química de banco de germoplasma, agrupar os acessos mais similares e otimizar os trabalhos nas coleções, segundo Carvalho et al. (2003). Neste contexto, na busca de estabelecer diretrizes com bases sustentáveis, o objetivo do presente trabalho que é um estudo exploratório e descritivo foi realizar a prospecção fitoquímica preliminar, assim como quantificar teores de flavonoides nas folhas de *M. aquifolium* coletadas em Telêmaco Borba, PR.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo quantitativo, exploratório e descritivo, sendo este trabalho uma parte do projeto intitulado *Maytenus aquifolium*. O critério foi quantificar rutina, quercetina e canferol em áreas de alta diversidade genética como Mortandade e de diversidade média como Trinita bem como em suas divisas e compará-las entre si e com a área de Lagoa que ainda não tem a identificação genética das matrizes. Para esse estudo preliminar selecionou-se ao acaso quatro matrizes de cada área nativa coletada. As coletas foram realizadas em quatro áreas nativas do banco de germoplasma na Fazenda Monte Alegre, da Empresa Klabin, localizada no município de Telêmaco Borba, PR.

Obtenção e identificação do material vegetal

Folhas de *M. aquifolium* bem expandidas, inteiras com perfeito estado fitossanitário foram coletadas da região mediana da copa das árvores, às nove horas da manhã em quatro áreas nativas georeferenciadas, sendo uma próxima a centro urbano Lagoa (L) (altitude de 1008 m, latitude de 24° 27' 21" S e longitude de 48° 30' 16" W), e outras três em região de floresta (Mortandade, Latitude-24°14'901"S, Longitude-50° 32'920"W, Altitude-827m; divisa Mortandade/Trinita (M/T) (altitude de 812 m, latitude de 24° 15' 023" S e longitude de 50° 31'920" W) e Trinita, Latitude - 24° 17'245" S, Longitude - 50.31' 058" W, Altitude-797 m) situada na fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, Brasil. A região apresenta temperatura média do mês mais frio de 15,6 °C e, do mês mais quente, de 22,2 °C. A precipitação média anual é de 1500 mm.

Um exemplar representante da espécie *M. aquifolium* foi depositado no Herbário da Klabin do Paraná, Produtos não Florestais, sob o número 2214 em 16 de abril de 2011.

As plantas de espinheira santa nas quais foram coletadas as folhas foram amostradas em 4 áreas. Essas plantas foram identificadas com placas brancas, metálicas numeradas, afixadas a 1,5 m e a 0,5 m de altura do nível do solo nos troncos das árvores adultas e jovens selecionadas, respectivamente para evitar atrair possíveis animais que pudessem estragar a identificação das matrizes.

Para as análises químicas, folhas saudáveis e bem expandidas foram coletadas de 4 Matrizes diferentes de cada área de coleta respeitando a distância mínima de 5 m² entre as plantas de espinheira santa matrizes.

As folhas coletadas foram colocadas em sacos de papel Kraft identificados com o número da amostra, data, período do dia da coleta e estágio de desenvolvimento da planta. Em seguida, as folhas foram encaminhadas ao laboratório para serem limpas com água destilada e foram encaminhadas posteriormente para a estufa de circulação de ar forçada a temperatura de 40 °C, para que atingissem de 10 a 12% de teor de água (5 h).

Após a secagem, estas amostras foram trituradas em moinho de facas e passadas por uma peneira de 16 mesh (malha de 1,0 mm). A cada operação de moagem, o moinho era desmontado e limpo. As amostras moídas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas na ausência de luz e a temperatura de 3 °C até a realização das análises cromatográficas.

Extração das amostras dos flavonoides

A extração das amostras dos flavonoides foi realizada com o emprego da metodologia adaptada

de Diagone et al. (2012). Uma amostra de 1,0 g de *M. aquifolium* triturada foi transferida para frasco de vidro transparente de 50 ml com tampa. Em seguida, adicionou-se 20 ml da solução Metanol PA (grau HPLC), marca F Maia indústria e comércio (Brasil), e água Mili Q na proporção 1:1 (v/v). A solução foi aquecida em banho-maria a 50 °C sob agitação magnética constante durante 30 min, e após o seu resfriamento, a solução foi novamente agitada e filtrada (filtro de papel plegado). Filtração com filtro acetato de celulose 0,2 µm Sartorius. O filtrado foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e deixados em repouso a temperatura de 4 °C durante 1 hora, passado esse tempo, as amostras foram injetadas no CLAE e realizaram-se as leituras cromatográficas.

Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Inicialmente, a análise do teor da substância marcadora dos extratos, foi desenvolvida três curvas analíticas de padrão de rutina, quercetina ou canferol dissolvida em Metanol PA (grau HPLC) (J.T. Baker), de forma a se obter as concentrações 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 µg/ml. As soluções foram filtradas com o uso de membrana de nylon, 0,22 µm, descartáveis (HATF 04700 – Millipore). Os equipamentos utilizados na análise cromatográfica foram: bomba LC-10AD (Varian), válvula injetora de alta pressão com controle eletrônico de 10 vias (loop de 10 µl) (VICI) pré-coluna de C-18 sílica (Hamilton), coluna de fase reversa Microsorb MV 100-5018 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Varian), Detector waters, 2998 PAD, sistema de dados série PENelson, com microcomputador Pentium 166 MHz, em ambiente Windows.

As definições das condições cromatográficas foram realizadas com testes com os padrões rutina, quercetina e canferol dissolvidos em metanol e água Milli-Q. A identificação dos flavonoides foi feita por comparação dos tempos de retenção com a passagem dos padrões de rutina, quercetina e canferol pela coluna do cromatógrafo.

As curvas de calibração foram construídas pela injeção em duplicata de soluções padrões com concentrações diferentes para cobrir uma faixa de concentração esperada das amostras. A fase móvel constituiu-se de um sistema de gradiente para simular as condições pós-hidrólise e melhorar a separação dos flavonoides.

Os limites de detecção e quantificação de rutina, quercetina e canferol foram determinados pela injeção de diluições sucessivas da mistura padrão de rutina, canferol e quercetina (todos padrões Merck).

O detector apresentou faixa de linearidade com coeficiente de correlação médio de 0,9951 para rutina, 0,99911 para quercetina e 0,99936 para

canferol e um fluxo de separação de 0,70 ml/min.

O teor de flavonoides foi calculado da área dos picos e da equação da curva de calibração obtida por regressão linear abaixo: O parâmetro de linearidade nesta investigação foi obtido por meio da curva analítica do padrão rotina, quercetina e canferol. A equação de correlação e os coeficientes de determinação obtidos para quantificar as amostras de *M. aquifolium* foram $y=2,81e+04x+2,38e+05$ com $R^2=0,9995$ (rutina), $y=4,76e+04x+7,69e+04$ com $R^2=0,9991$ (quercetina) e $y=3,64e+04x+4,00e+03$ com $R^2=0,9993$ (canferol).

Os extratos foram submetidos a análises de CLAE onde a substância marcadora para o controle de qualidade foram a rutina, a quercetina e o canferol e a fase móvel foi formada pela mistura de metanol e ácido fórmico P.A (Nuclear®) 0,16 M (53:47 v/v) num comprimento de onda de quercetina 375; canferol 363; rutina 356 nm, o fluxo 0,7ml/min, tempo de corrida, 60 min – para coluna Varian C-18 de 250X4,6 mm modelo Microsorb-MV 100-5 a temperatura da coluna – 30 °C. Como fase móvel, utilizou-se e Metanol (eluente A) e ácido fórmico 2% em água (v/v, eluente B); antes do início da análise, equilibrou-se o sistema com uma mistura de 90% A: 10% B. Programação do gradiente: linear, 10 - 80% B em 60 min à vazão de 0,70 ml/min. Nas fases móveis foram testados: (A) 2,0, 2,5 e 3,0% de ácido fórmico em água.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando Metanol solvente A e água 2% de ácido fórmico (v/v) (fase b) em sistema gradiente, com vazão de 0,7 ml/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 20% fase A e 80% fase B; 5 min: 20% fase A e 80% fase B; 10 min: 40% fase A e 60% fase B; 15 min: 40% fase A e 60% fase B; 20 min: 45% fase A e 55% fase B; 25 min: 50% fase A e 50% fase B; 35 min: 60% fase A e 40% fase B; 40 min: 70% fase A e 30% fase B; 45 min: 90% fase A 10% fase B; 50 min: 90% fase A e 10% fase B; 54 min: 20% fase A e 80% fase B; 60 min: 20% fase A e 80% fase B; o volume injetado foi de 10,0 µl. Os picos dos cromatogramas foram identificados e comparados com o tempo de retenção dos padrões rutina, quercetina e canferol.

Utilizou-se CLAE com detecção UV-Vis, arranjo de diodo, fluorescência e eletroquímica (PAD), cromatógrafo líquido Waters alliance e 2695 composto por duas bombas, um forno para coluna; Detector waters, 2998 PDA e sistema de processamento de dados, coluna Varian C-18 de 250 mm x 4,6 mm modelo Microsorb-MV 100-5 com fase estacionária protegida por colunas guarda ou pré-coluna. Forno para abrigar a coluna C 18 e injetor. Os picos dos cromatogramas foram identificados e comparados com o tempo de retenção dos padrões rutina, quercetina e canferol. Para análise da especificidade foi empregado cromatógrafo a líquido

Varian. Para o desenvolvimento dos cromatogramas as condições seguem como acima.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise conjunta, utilizando o programa estatístico R, com análise de variância separadamente para cada flavonoide pelo teste de Kruskal-Wallis, e após foram comparados conjuntamente. As médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon (5%).

Nos testes de hipóteses foram considerados os teores dos três flavonoides. Para verificar se há diferença significativa entre as 3 amostras de flavonoides com relação ao teor médio do metabólito, primeiramente calculou-se a diferença entre as duas medições dos teores de metabólito, isso para cada amostra. Logo após, tendo em vista que os dados estão dispostos em escalas diferentes, fez-se uma padronização dos dados para, em seguida, aplicar-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Wilcoxon.

Os valores foram comparados utilizando o Teste de Kruskal-Wallis, pois os dados não satisfaziam as condições para o uso de testes paramétricos. O Teste de Kruskal-Wallis é um teste não paramétrico utilizado para comparar grupos, análogo ao uso da ANOVA.

A seguir, utilizou-se o teste de Wilcoxon para verificar quais amostras diferem entre si, considerando se a comparação entre dois flavonoides de cada vez. Este teste é utilizado para comparar dois grupos quando estes não são independentes e não satisfazem as condições para uso de testes paramétricos. O Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon é análogo a o teste-T para amostras pareadas.

Para verificar se há diferença significativa no teor de metabólito entre as amostras rutina, quercetina e canferol, foi realizado o teste de Wilcoxon, considerando um nível de 5% de significância.

A dissimilaridade de Bray-Curtis é limitada entre 0 e 1, onde 0 significa que os dois indivíduos têm a mesma composição entre os teores de flavonoides (rutina, quercetina, canferol) e com o intuito de verificar as diferenças entre os pontos de amostragem, foi realizada análise de agrupamento pelo método UPGMA, com base no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis (Bray e Curtis 1957; Valentin 1995; Oksanen 2011). Essas análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Programa R (R development core team, 2012). A dissimilaridade não-métrica de Bray-Curtis (1957) fornece resultados de dissimilaridade robustos e confiáveis para uma ampla gama de aplicações. Utilizou-se o software Microcal Origin 5.0 (Microcal Software Inc.) para o cálculo das equações de regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No *screening* de classe química, realizado para as dezesseis amostras de folhas de espinheira santa, verificou-se doze picos de flavonoide devidamente caracterizados pelos espectros de varredura em uma faixa de comprimento de onda entre 240 e 450 nm, sendo identificados nesta investigação os flavonoides rutina, quercetina e canferol, os quais são de objetivo dessa pesquisa (Figura 1). Em 2012, Diagone et al. (2012) identificaram os picos de flavonoides por padrão espectral característico de UV/PDA com duas bandas, banda 300-380 nm e banda II 240 – 280 nm. Esses autores observaram derivados de quercetina em $\lambda_{\text{máx}}$ (354 nm) e derivados de canferol $\lambda_{\text{máx}}$ (344 nm). Portanto, segundo Diagone et al. (2012) a comparação do material obtido por hidrólise ácida com padrões autênticos tempo de retenção de agliconas e espectros de UV-Vis/PDA confirmaram a quercetina e canferol como agliconas de flavonoides de *M. aquifolium*.

As análises quantitativas, das amostras de folhas de espinheira santa avaliadas e realizadas por CLAE, permitiram a constatação da presença de rutina [Tempo Retenção (tR) = 19,180 min em 356 nm], quercetina [tR= 32,275 min em 375 nm] e canferol [tR= 37,161 min em 363 nm], através da comparação dos tempos de retenção (Figura1) e cálculo da área dos picos. Observou-se que os flavonoides rutina, quercetina e canferol apresentaram máximos de absorção no espectro no ultravioleta à $\lambda_{\text{máx}}$ rutina 356 nm, $\lambda_{\text{máx}}$ quercetina 375 nm, $\lambda_{\text{máx}}$ canferol 363 e nm.

As absorbâncias das soluções foram registradas a 356 nm, 375 nm e 363 nm, uma vez que são poucos os estudos sobre a composição flavonoidica das folhas de *M. aquifolium*. A quercetina é um flavonol comum entre os flavonoides encontrados nas plantas. Os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores a 425 nm (Marcucci et al. 2013). Assim, é interessante empregar padrões de flavonoides, como a rutina, com absorções máximas em diferente comprimento de onda, para melhor estimativa do teor dos flavonoides (Granato et al. 2013).

Os teores médios de flavonoides em *M. aquifolium* estão indicados na Tabela 1. Todas as 16 amostras de extratos de folhas de espinheira santa pesquisadas apresentaram rutina, quercetina e canferol (Tabela 1). Assim, os resultados apresentados na Tabela 1 são discutidos a seguir com a ajuda de testes estatísticos.

É possível verificar que houve diferença significativa na análise dos dados de teores de rutina, quercetina e canferol pelo teste de Wilcoxon, considerando um nível de 5% de significância. Ao final deste teste, obteve-se um

p-valor $\approx 0 < 0,05$ ao nível de 5% de significância (com 95% de confiança), o qual indica que o teor de rutina (1773 mg/g) é significativamente superior ao teor de quercetina (36,65 mg/g) e também é significativamente maior ao teor de canferol (8,74 mg/g). Pelo teste de Wilcoxon ainda obteve-se o p-valor $\approx 0 < 0,05$ ao nível de 5% de significância (com 95% de confiança), que permite verificar que os teores de quercetina superam significativamente os de teores de canferol em aproximadamente 5 vezes.

Os teores desses três flavonoides foram avaliados também com relação às áreas de coletas e não se verificou diferenças estatísticas na quantidade total desses. Como verificasse a seguir.

Os valores de teores de flavonoides avaliados em conjunto resultam em um valor p quando avaliando-se Lagoa e Mortandade (p-valor = 0,11 > 0,05), Lagoa e divisa Mortandade/Trinita (p-valor = 0,32 > 0,05), Lagoa e Trinita (p-valor = 0,55 > 0,05), Mortandade e Mortandade/Trinita (p-valor = 0,40 > 0,05), Mortandade e Trinita (p-valor = 0,73 > 0,05), Mortandade/Trinita e Trinita (p-valor = 0,75 > 0,05), indicando que não se verificou diferença estatística entre a expressão fenotípica de teores desses flavonoides nas áreas comparadas aos pares pelo teste de Wilcoxon.

Dentro dessa perspectiva portanto os valores de p citados indicam que não há diferença estatística significativa entre os teores de flavonoides expressados entre as regiões avaliadas. Contudo, considerando as que o coeficiente de Bray Curtis revelou graus de dissimilaridades que variam de 0,30% a 97,31% (Figura 2) indicando que essa variabilidade química diferencia os genótipos, fez-se a avaliação dos três flavonoides em conjunto,

conforme dados da matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e o dendrograma que demonstra o quanto as plantas avaliadas quanto ao teor de flavonoides são diferentes (Figura 2). Neste sentido, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis considerando-se não mais os flavonoides juntos, mas os teores de rutina, quercetina ou canferol separadamente, o que resultou em valores de p que indicam que há diferença estatística significativa, com relação aos teores de rutina, ou de quercetina ou de canferol, considerando um nível de 5% de significância (o mesmo que 95% de confiança) em pelo menos um par dentre as áreas consideradas e avaliadas.

No que concerne aos teores de Rutina, o p-valor de 0,0142 obtido pelo teste de Kruskal-Wallis revela que há diferença significativa dos teores desse flavonoide para os genótipos avaliados entre áreas, o que foi confirmado com a aplicação do teste de Wilcoxon, o qual determinou que essa diferença pode ser verificada entre as áreas de Lagoa e Mortandade pelo p-valor = 0,0052 e entre Lagoa Trinita pelo p-valor ≈ 0 . Portanto estaticamente a região de Lagoa apresenta teores mais elevados que as regiões de Mortandade superando essa em 86,83 mg/g e os genótipos da região de Lagoa apresentam teores avaliados que superam os encontrados na região de Trinita em 114,29 mg/g (Tabela 1).

As demais avaliações, revelaram segundo o teste de Wilcoxon que não houve diferenciação estatística quanto aos teores de Rutina, quanto as regiões analisadas. portanto para as regiões de Lagoa e divisa Mortandade/Trinita cujo é p-valor = 0,0803 e entre Mortandade e divisa Mortandade/Trinita cujo é p-valor = 0,5204 e Mortandade/Trinita e Trinita cujo p-valor = 0,3605 (Tabela 1),

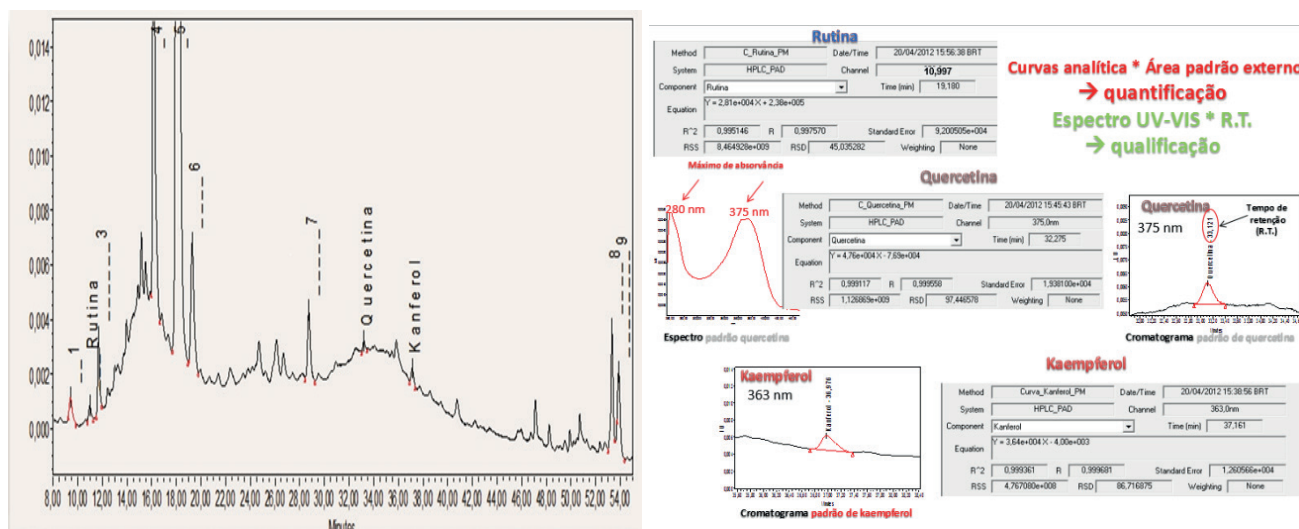


FIGURA 1. Cromatograma em CLAE em DAD-UV e UV-PAD de flavonoides de folhas de *Maytenus aquifolium*. Picos de rutina, de quercetina, de canferol e de 9 flavonoides detectados nos comprimentos de onda de 240 a 450 nm. Fase móvel: condições cromatográficas, ver parte experimental. Londrina. 2012.

os valores de p indicam que estatisticamente não ocorre diferença de teores de rutina nas regiões comparadas aos pares.

As análises dos dados de teores de quercetina utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis permitiu a obtenção de um p-valor = 0,0208 o qual indica que pelos menos um par de regiões diferem estatisticamente entre si considerando-se um nível de 5% de significância (o mesmo que 95% de confiança). Essas diferenças entre teores de quercetina, conforme o teste de Wilcoxon, verificam-se entre as regiões de Lagoa e a de Mortandade divisa com Trinita cujo é p-valor = 0,0103, indicando que na região da divisa entre Mortandade e Trinita 70,6% mais quercetina que na região de Lagoa. Entre as regiões de Lagoa e Trinita p-valor é 0,0103, indica que em Trinita há 84,1% de quercetina a mais que na região de Lagoa e por fim entre as regiões de Mortandade e Mortandade//Trinita o p-valor é 0,0074 indicando 78,1% de quercetina a mais na região de divisa entre Mortandade e Trinita.

A avaliação estatística por Wilcoxon p-valor = 0,8607 indica que não ocorre diferenças significativas entre os teores de quercetina para os genótipos coletados nas regiões de Lagoa e Mortandade. Da mesma forma que o p-valor = 0,0803, obtido na comparação de genótipos obtidos nas regiões de Mortandade e Trinita, indica que os teores de quercetina também não os diferem significativamente. O p-valor = 0,2869 permite verificar que os teores de quercetina não diferem estatisticamente para os genótipos encontrados nas regiões de divisa de Mortandade//Trinita e a região de Trinita, considerando um nível de 5% de significância (o mesmo que 95% de confiança).

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para os dados de teor de canferol obtendo se um p-valor = 0,0010. Assim, considerando se a um nível de 5% de significância (o mesmo que 95% de confiança), o valor de p indica que pelo menos um par dentre as áreas consideradas diferem estatisticamente entre si com relação ao teor de Canferol.

Comparando se as médias de canferol entre as regiões de Lagoa (0,6445 mg/g) e Mortandade (0,38575 mg/g), verifica-se pelo p-valor = 0,0015 que estes teores de canferol são significativamente superiores na região de Lagoa com um nível de 95% de confiança, conforme o teste de wilcoxon.

O p-valor = 0,0190 com grau de confiança de 95% indica que em Lagoa a média de teores de canferol é significativamente superior à média de teores encontradas na região de divisa Mortandade/Trinita (Tabela 1).

Ao confrontar-se as médias de teores de canferol entre as regiões de Mortandade e Trinita, verifica-se que a região de Trinita apresenta média de teores de canferol superiores às encontradas

nas avaliações de amostras obtidas na região de Mortandade, segundo o um p-valor = 0,0009 gerado pelo teste de Wilcoxon a um nível de 5% de significância (o mesmo que 95% de confiança) essa é significativamente superior.

A região de Trinita apresenta média de teores de canferol superiores aos da região de divisa de Mortandade//Trinita a um nível de 5% de significância (o mesmo que 95% de confiança). Entretanto a avaliação estatística indica também que estes teores de canferol quantificados em Lagoa e Trinita p-valor = 0,0525, não são diferentes significativamente assim como a média dos teores de canferol comparados entre as áreas de Mortandade e divisa entre Mortandade//Trinita cujo p-valor = 0,3605, a um nível de 5% de significância (o mesmo que 95% de confiança).

Observa-se pelo dendrograma que os teores de flavonoides avaliados revelam variabilidade fenotípica expressa nas amostras de folhas coletadas de matrizes de espinheira santa. Os teores dos três flavonoides avaliados em conjunto para os 16 genótipos de *M. aquifolium* indicam pelo coeficiente de dissimilaridade de Bray-Curtis uma variação química que diferencia estes aos pares como observa se na matriz de dissimilaridade (Figura 2), na qual os genótipos mais semelhantes são os das planta 2 e planta 3 presentes na região de Lagoa cujo coeficiente de Bray-Curtis é 0,30% e os genótipos mais distintos são a planta 1 e planta 9 diferenciando-se em 97,31%, localizados na região de divisa entre Mortandade e Trinita (Figura 2).

No que se refere a Rutina o coeficiente de Bray-Curtis revelou para esse flavonoide indivíduos com grau de dissimilaridade de 0,44% a 98,70%% apontando grande variabilidade química. As plantas 2 e planta 3 são as mais semelhantes quanto a avaliação dos teores médios de Rutina e as plantas que mais se diferem quanto aos teores de Rutina são a planta 1 e planta 9 (Figura 3).

Nas análises dos dados de teores de quercetina, o confidente de Bray - Curtis revela para esse flavonoide grau de dissimilaridade que varia de 0,31% a 35,59%. Indicando que a planta 13 e planta 14 localizadas em Trinita apresentam teores médios de quercetina muito semelhantes, e que as plantas 6 ($1,795 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$) e planta 10 ($3,778 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$) são as matrizes mais distintas quanto aos teores médios de quercetina (Figura 4).

Quanto ao teor médio de canferol as matrizes de espinheira santa, planta 4 e planta 8, de espinheira santa mais semelhantes divergem em 0,33% e os mais distintos, planta 9 e planta 13, em 75,36% (Figura 5).

No período de 2005 a 2007, as matrizes coletadas nas áreas de Mortandade e Trinita bem como em suas divisas foram avaliadas

TABELA 1. Teores médios de rutina, quercetina e canferol em folhas de *Maytenus aquifolium*, de Lagoa (L), Mortandade (M), Divisa Mortandade//Trinita (M/T) e Trinita (T) da Fazenda Monte Alegre, Telêmaco Borba, PR, inverno de 2011, determinado por CLAE-UV. Resultados expressos em mg flavonoide/g folhas secas*

Local	Amostra	Planta	Teor de		
			Rutina (mg/g)	Quercetina (mg/g)	Canferol (mg/g)
L	L_1(planta 1)	Adulta	287,958±1,244*	1,916±0,03*	0,442±0,004*
	L_2(planta 2)	Jovem	106,247±2,927*	2,154±0,07*	0,760±0,021*
	L_3(planta 3)	Jovem	106,675±4,251*	1,980±0,02*	0,702±0,002*
	L_4(planta 4)	Adulta	218,989±5,507*	1,860±0,02*	0,674±0,001*
	Média/área		179,9673	1,9775	0,6445
M	M_1(planta 5)	Adulta	94,108±0,116*	1,842±0,02*	0,276±0,001*
	M_2(planta 6)	Adulta	164,343±5,606*	1,795±0,03*	0,183±0,007*
	M_3(planta 7)	Adulta	83,437±0,090*	1,903±0,03*	0,415±0,014*
	M_4(planta 8)	Adulta	30,687±1,748*	3,211±0,03*	0,669±0,006*
	Média /área		93,14375	2,18775	0,38575
M/T	MT_1(planta 9)	Adulta	1,884±0,003*	1,935±0,01*	0,157±0,003*
	MT_2(planta 10)	Adulta	111,555±5,059*	3,778±0,07*	0,357±0,013*
	MT_3(planta 11)	Jovem	63,947±1,419*	3,224±0,05*	0,229±0,008*
	MT_4(planta 12)	Adulta	238,188±0,614*	2,272±0,05*	0,727±0,001*
	Média /área		103,8935	2,80225	0,3675
T	T_1(planta 13)	Jovem	9,196±0,026*	2,318±0,01*	1,114±0,035*
	T_2(planta 14)	Jovem	88,402±4,172*	2,333±0,01*	0,847±0,001*
	T_3(planta 15)	Jovem	82,590±2,304*	2,477±0,02*	0,805±0,006*
	T_4(planta 16)	Jovem	82,535±3,884*	1,925±0,07*	0,433±0,003*
	Média /área		65,68	2,26	0,79
	Média total		110,67	2,31	0,55

*Desvio padrão

geneticamente. As análises genéticas prévias com marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) neste pool de genótipos de *M. aquifolium* revelaram que as plantas de espinheira santa localizadas nas áreas de Mortandade, Trinita e Divisa Mortandade//Trinita apresentaram índices de variabilidade genética de moderado a alto para estes genótipos, que são 100% diferentes geneticamente (Sahyun et al. 2010). A variação de teores de rutina, quercetina e canferol é a expressão fenotípica desses flavonoides. É importante observar que as diferenças obtidas

nestes estudos podem estar relacionadas ao fato de que a maior parte da variação genética nesta espécie ocorre dentro das populações e não entre elas (Perecin et al. 2004; Sahyun et al. 2010).

Os metabólitos secundários das plantas oscilam de forma sazonal e diária, inter e intra planta conforme o controle genético, expressão que pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (Hartmann 1996). Cada um desses processos por sua vez, é governado por genes e, portanto, será influenciado por três fatores

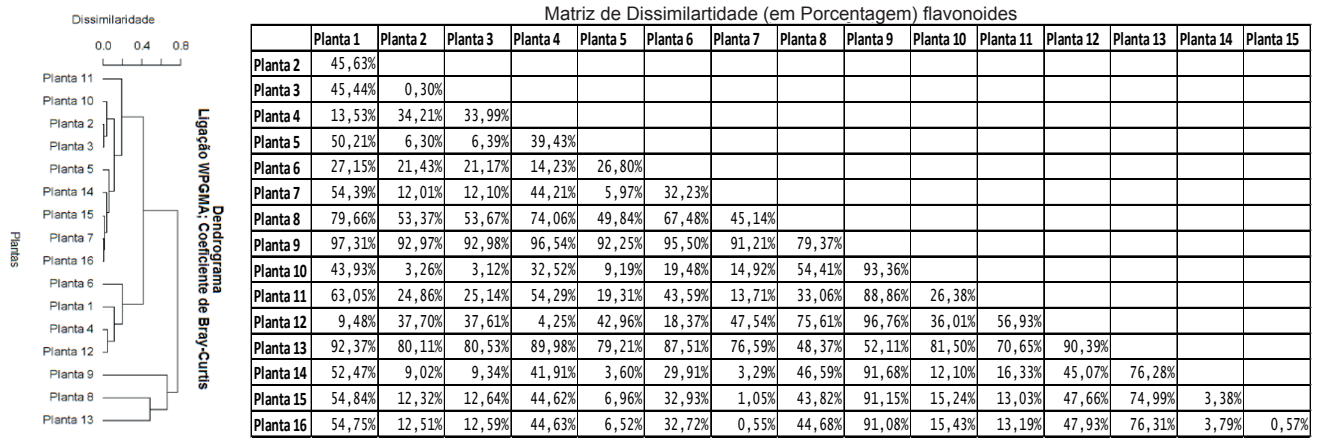


FIGURA 2. Coeficiente de dissimilaridade total de Bray- Curtis observado para teores de flavonoides entre pares de matrizes em áreas de floresta nativa banco de germoplasma de *Maytenus aquifolium*, centro oeste, brasileiro. Telêmaco Borba-PR, 2011.

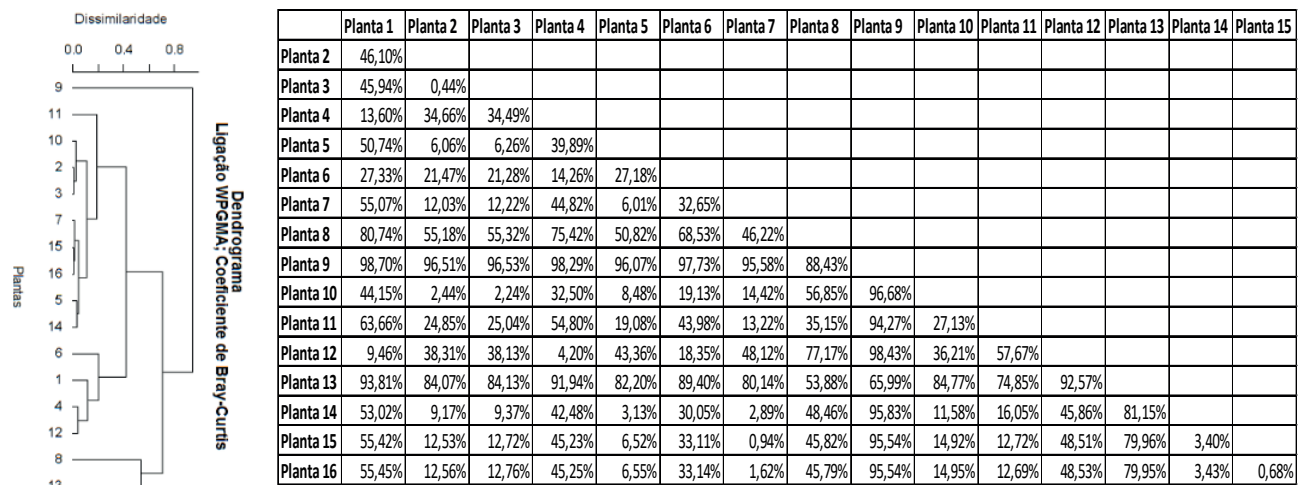


FIGURA 3. Coeficiente de dissimilaridade de Bray- Curtis observado para teores de Rutina entre pares de matrizes em áreas de floresta nativa banco de germoplasma de *Maytenus aquifolium*, centro oeste, brasileiro. Telêmaco Borba- PR, 2011.

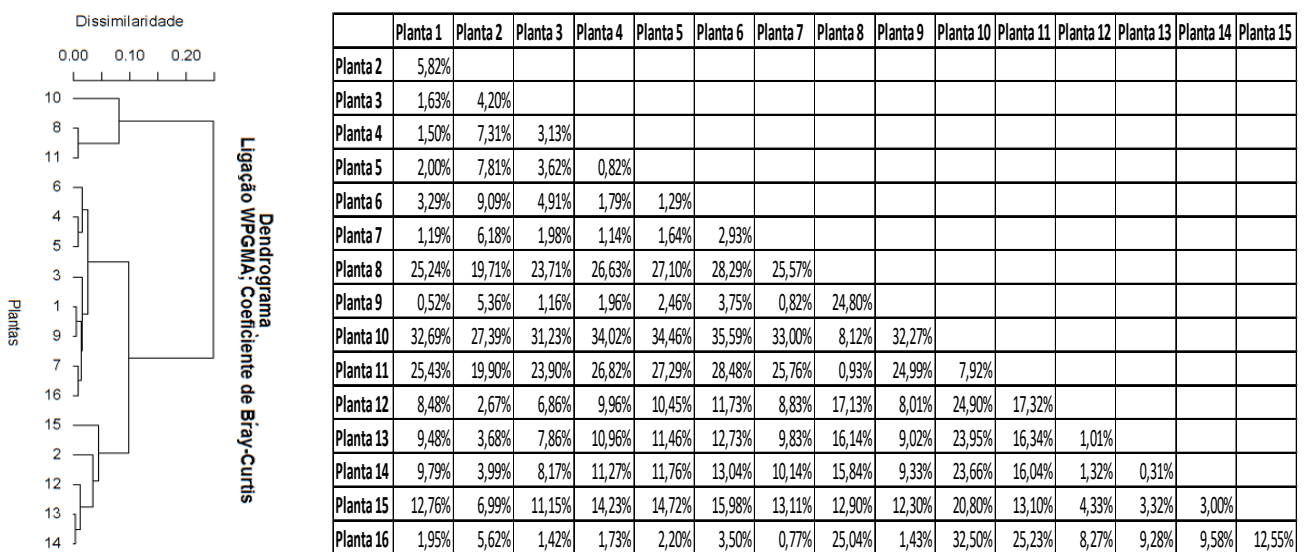


FIGURA 4. Coeficiente de dissimilaridade de Bray- Curtis observado para teores de Quercetina entre pares de matrizes em áreas de floresta nativa banco de germoplasma de *Maytenus aquifolium*, centro oeste, brasileiro. Telêmaco Borba- PR, 2011.

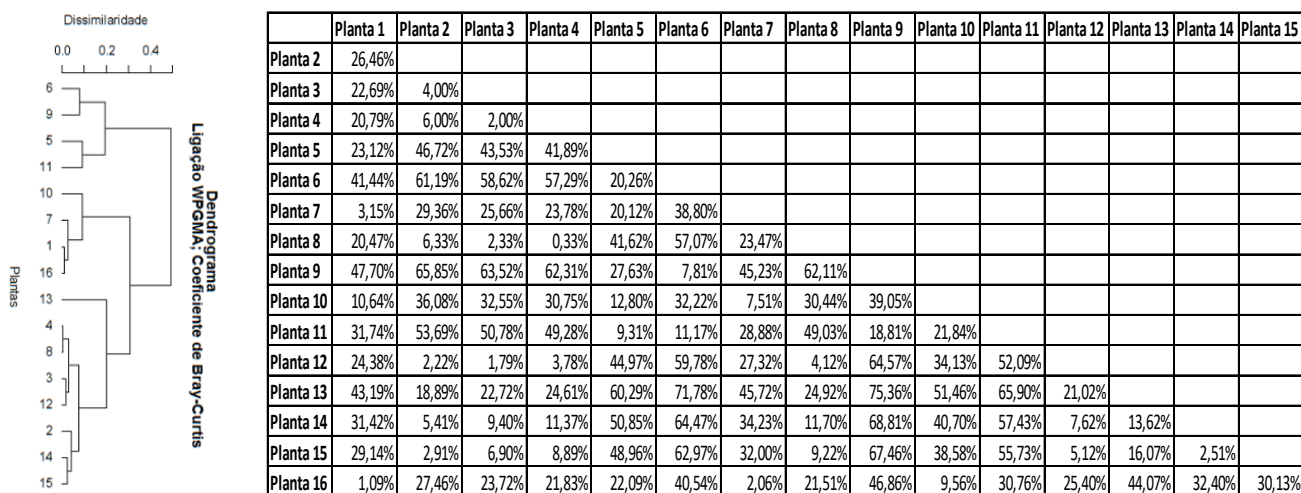


FIGURA 5. Coeficiente de dissimilaridade de Bray- Curtis observado para teores de Canferol entre pares de matrizes em áreas de floresta nativa banco de germoplasma de *Maytenus aquifolium*, centro oeste, brasileiro. Telêmaco Borba- Pr, 2011.

principais: hereditariedade, ontogenia (estágio de desenvolvimento) e ambiente (Roberts et al. 1996 citado por Simões et al. 2004). A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação.

Os estudos de Yariwake et al. (2005) utilizando *M. aquifolium*, compararam os teores de flavonoides, polifenóis totais e triterpenos em diferentes coletas e verificaram diferença estatística significativa entre as mesmas. A variabilidade química sazonal em *M. aquifolium* (Celastraceae) foi observada por esses autores em exemplares cultivados em Ribeirão Preto, SP, através da análise das substâncias presentes nas folhas, ao longo das quatro estações em dois anos. O teor de fenóis totais avaliado variou de 21,96 a 45,92 mg/g (expresso em mg ácido tânico/g folhas secas), de 55,88 a 93,20 mg tri terpenos totais / g folhas secas, e de 1,349 a 3,859 mg flavonoides/g folhas secas. Também a amostra Primavera 92 apresentou o maior teor de flavonoides e fenóis totais, e a amostra Inverno 94 apresentou o maior teor de triterpenos. Yariwake et al. (2005) constataram variações sazonais significativas na composição química das folhas de *M. aquifolium* e indicaram a utilização de *M. aquifolium* como matéria-prima de medicamentos fitoterápicos e a necessidade da padronização do teor de flavonoides. Esses resultados vem corroborar para que mais investigações sejam realizadas nessa espécie nativa em florestas ombrófilas mistas em Telêmaco Borba.

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, a sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (Kutchan 2001). A idade e o desenvolvimento das

plantas são considerados de grande importância no estudo fitoquímico, podendo influenciar não apenas a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas de seus componentes. Tecidos mais jovens geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos como flavonoides revelando uma diminuição na produção de metabólitos secundários (principalmente os derivados fenólicos) durante os períodos de crescimento tecidual (Buta et al. 1997; Gobbo-Neto e Lopes 2007). Quanto aos teores de flavonoides das amostras de folhas de *M. aquifolium* avaliadas (Tabela 1) como nos estudos de Gobbo-Neto e Lopes 2007; Kutchan 2001, a idade dos indivíduos não está relacionada com a produção de teores de flavonoides, verificando-se altos teores e baixos teores de flavonoides em plantas adultas e jovens. Estes resultados têm aplicação prática, pois permitem selecionar os caracteres mais importantes para caracterização das matrizes, o que facilita os trabalhos no banco de germoplasma. Além disso, com relação ao uso, o conhecimento prévio dos caracteres avaliados nos acessos contribui para a escolha de genótipos para programas de melhoramento da espécie.

M. aquifolium é uma espécie adequada definição de parâmetros de qualidade dos medicamentos fitoterápicos conforme a legislação brasileira (Petrovick et al. 1999). Nesta avaliação preliminar constatou-se variações significativas na composição química das folhas de *Maytenus aquifolium*.

Existe variabilidade para caracteres químicos em matrizes de espinheira-santa para teores de rutina, quercetina e canferol. Por esses dados é possível selecionar matrizes para melhoramento ou com objetivos de reflorestamento.

Estes resultados indicam que a utilização de *M. aquifolium* como matéria-prima de medicamentos fitoterápicos requer a padronização do teor de flavonoides.

O cultivo de espinheira santa com a padronização dos flavonoides pode ser uma alternativa de produção agrícola, principalmente para pequenas propriedades. Além de atender a demanda da indústria farmacêutica, o que geraria renda para o produtor rural, esta atividade contribuiria para conservação in situ das espécies, pela redução do extrativismo. A inserção da espinheira-santa na matriz agrícola reduziria, portanto, a erosão genética e o risco de extinção de *M. aquifolium*.

Pelas avaliações estatísticas os teores de rutina, quercetina e canferol apresentam resultados significativos que diferenciam essas matrizes de espinheira santa indicando que existe a necessidade de continuar as pesquisas para essa espécie no banco de germoplasma nativo de Telêmaco Borba, PR, pois a importância dos estudos analíticos é reconhecida pela legislação brasileira.

Assim, os processos de preparo e métodos de extração da planta espinheira santa, juntamente com os testes estatísticos realizados foram de grande importância na diferenciação fitoquímica do vegetal e incentivo a que essa pesquisa seja mais detalhada em estudos futuros.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária; Klabin, KPPF Não Madeireiros – Fitoterapia; Universidade Estadual de Londrina.

REFERÊNCIAS

- Bray RJ, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* 27:325-349
- Buta JG, Spaulding DW (1997) Endogenous levels of phenolics in tomato fruit during growth and maturation. *J Plant Growth Regul* 16(1):43 – 46. <https://doi.org/10.1007/PL00006973>
- Calou IBF, Lima LAR, Ferreira JAN, Cerqueira GS (2014) A atividade gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*. *Rev Saude Cienc* 3(2):33-42.
- Chabariberi RDA, Pozzi A, Zeraik ML, Yariwake JH (2009) Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. *Rev Bras Farmacogn* 19(4):860-864.
- Carvalho LP, Lanza MA, Fallieri J, Santos, JW (2003) Análise da diversidade genética entre acessos de banco ativo de germoplasma de algodão. *Pesq Agropec Bras*. 38(10): 1149-1155. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003001000003>
- Diagone CA, Colombo R, Lanças FM, Yariwake JH (2012) CZE/PAD and HPLC-UV/PAD profile of flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* “espinheira santa” leaves extracts. *Chromatogr Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2012/691509>.
- Di Stasi LC (2004) Aspectos químicos e farmacológicos da espinheira-santa: uma análise da utilidade dos dados. In: Reis MS, Silva SR Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa. 1.ed. Brasília: Ibama. 67-92.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007) Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30(2):374 – 381.
- Gomes LJ, Gomes MAO (2000) Extrativismo e biodiversidade: o caso da fava-d'anta. *Ciência Hoje*. 27(161):66-69.
- Gonzalez FG, Portela TY, Stipp EJ, Di Stasi LC (2001) Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *J Ethnopharmacol*. 77(1):41-7. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00268-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00268-9).
- Granato EM, Granato MM, Gerenutti M, Silva MG, Ferraz HO, Vila MMDC (2013) Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schränk) Kuntze. *Rev Bras Farm* 94(2):130-135.
- Hartmann T (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomol Experimentalis et Applicata* 80(1):177-188. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1996.tb00914.x>
- Kutchan TM (2001) Ecological arsenal and development dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol* 125(1):58-60. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.58>.
- Lorenzi H, Matos, FJA (2002) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. 1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 544p.
- Marcucci MC, Woisky RG, Salatino A (2013) Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis 46:3-8. Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>. Acesso em: 21 out 2021.
- Oksanen FJ (2012) vegan: Community ecology package. R package version 2.0-3. Disponível em: < <https://cran.r-project.org/src/contrib/Archive/vegan/>>. Acesso em: 21 oct 2021.
- Perecin MB, Steenbock W, Reis MS (2004) Genética de populações de espinheira-santa. In: Reis MS, Silva SR Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa. 1.ed. Brasília: Ibama. p.115-141.
- Petrovick PR, Marques LC, De Paula IC (1999) New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. *J Ethnopharmacol* 66:51-55. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00149-4)
- Reif JC, Melchinger AE, Frisch, M (2013) Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Sci* 45(1):1-7
- Sahyun SA, Ruas EA, Ruas CF, Medri C, Souza JRP, Johansson LAPS, Miranda LV, Ruas PM (2010) Genetic variability of three natural populations of *Maytenus aquifolium* (Celesterales) from Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 53(5):1037-1042. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000500005>

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann GM, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2004) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 475p.

Souza JRP, Sahyun SA, Nixdorf SL, Johansson LAPS, Miranda LV (2009) Conservação de recurso genético pode ser uma fonte de renda extra para a pequena propriedade. IN: VI Congresso Brasileiro de Agroecologia e II Congresso Latinoamericano de Agroecologia. *Rev Bras Agroecologia* 4(2):4449-4452. Disponível em: <<http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/9789/6612>>. Acesso em: 21 out 2021.

Yariwake JH, Lanças FM, Cappelaro EA, Vasconcelos EC, Tiberti LA, Pereira MAS, Franca SC (2005) Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). *Rev Bras Farmacogn* 15(2):162-168. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200016>