

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Marcella Emília Petra Schmidt

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS  
POR HPLC-UV EM ESPÉCIES DE *Cecropia* E *Bauhinia***

Santa Maria, RS  
2016

**Marcella Emília Petra Schmidt**

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS POR HPLC-UV  
EM ESPÉCIES DE *Cecropia* E *Bauhinia***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

Santa Maria, RS  
2016

SCHMIDT, MARCELLA EMÍLIA PETRA

ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS POR  
HPLC-UV EM ESPÉCIES DE Cecropia E Bauhinia / MARCELLA  
EMÍLIA PETRA SCHMIDT.- 2016.

69 p.; 30 cm

Orientador: MARCELO BARCELLOS DA ROSA

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2016


1. Método de Separação 2. HPLC-UV 3. Triterpenos 4.  
Plantas Medicinais 5. Amazônia I. BARCELLOS DA ROSA,  
MARCELO II. Título.

**Marcella Emília Petra Schmidt**

**ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS POR HPLC-UV  
EM ESPÉCIES DE *Cecropia* E *Bauhinia***

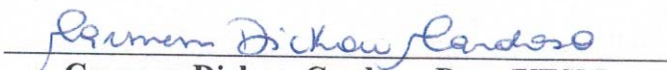
Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

**Aprovada em 27 de julho de 2016:**




---

**Marcelo Barcellos da Rosa, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Carmem Dickow Cardoso, Dra. (UFSM)**



---

**Sandra Cadore Peixoto, Dra. (UNIFRA)**

Santa Maria, RS  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, amores, amigos, companheiros, enfim, a minha base nesses tantos anos, Denise Schmidt, Alex Schmidt, Júlia Schmidt e Lucas Bressan.

Ao Henrique Faccin por esses sete anos de sincera amizade, companheirismo e por todas as ajudas cromatográficas, muito obrigada.

À Família Bressan e à Mari, que me acolheram nesses sete anos e sempre me apoiaram durante o mestrado.

Ao prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Barcellos da Rosa pela orientação e ensinamentos ao longo desses dois anos.

A todos os Lachenianos por esses seis anos de convivência e amizade, com carinho especial à Larissa, Roberta, Géssica, Luis Ferraz, Luciana, Carolina, Fernanda, Ana Paula e Márcia.

À banca de defesa e de qualificação Prof<sup>a</sup> Dra. Carmem Dickow Cardoso, Prof<sup>a</sup> Dra. Sandra Cadore Peixoto e Prof<sup>o</sup> Dr. Leandro Machado de Carvalho pela disponibilidade e contribuições a este trabalho.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos.

A todos que não foram citados aqui e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“Primeiro vem as risadas, depois as mentiras e por último o tiroteio”*

*Stephen King*

## RESUMO

### ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS POR HPLC-UV EM ESPÉCIES DE *Cecropia* E *Bauhinia*

AUTOR: Marcella Emília Petra Schmidt  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

O uso de plantas com finalidade terapêutica é uma das mais antigas formas da prática medicinal na humanidade. O uso de fitoterápicos no Brasil é bastante difundido devido a grande biodiversidade vegetal existente e aos conhecimentos populares referentes a esta flora. As ações medicinais desempenhadas pelos vegetais são decorrentes da presença de metabólitos secundários em sua composição. Nos últimos anos, pesquisas destinadas a identificação de fitocompostos tem ganhado espaço, como no caso dos compostos triterpênicos, em razão de suas inúmeras propriedades farmacológicas, anti-inflamatória, antirreumática, gastroprotetora e hepatoprotetora. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar os compostos triterpênicos presentes nas espécies medicinais de *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa*, *Bauhinia variegata* var. *variegata* e *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, oriundas da Amazônia brasileira. Além de determinar o perfil fitoquímico por cromatografia a líquido de alta eficiência dos compostos triterpênicos extraídos com clorofórmio e acetato de etila nas espécies mencionadas, avaliando a sazonalidade dos compostos, em três diferentes anos de coleta e a possível existência de marcadores químicos. Destaca-se a presença de estigmasterol, lupeol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirina e  $\alpha$ -amirina em todas as espécies estudadas. As espécies de *Cecropia obtusa* e *Bauhinia variegata* var. *variegata* apresentaram maior diversidade dos compostos em estudo. Avaliando os solventes estudados, o acetato de etila apresenta melhor desempenho como solvente extrator dos triterpenos em estudo quando comparado com clorofórmio. A metodologia proposta é simples, precisa e possui um bom desempenho na determinação dos onze triterpenos em amostras. Além de poder ser utilizada no controle de qualidade de plantas medicinais e marcadores químicos.

**Palavras-chave:** HPLC-UV; triterpenos; Bauhinia, Cecropia, plantas medicinais

## ABSTRACT

### STUDY OF THE DISTRIBUTION OF TRITERPENIC COMPOUNDS IN SPECIES OF *Cecropia* AND *Bauhinia* BY HPLC-UV

AUTHOR: Marcella Emília Petra Schmidt  
ADVISOR: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

The use of plants with therapeutical properties is one of the oldest forms of the medical care practice in humanity. The use of phytotherapies in Brazil is widespread due the vast vegetal biodiversity and to the popular knowledge regarding this flora. The medicinal properties performed by the vegetables originate from the presence of secondary metabolites in its composition. In the last years, research aimed the identification of phytocompounds has gained space, which is the case for triterpenic compounds, due to their countless pharmacological properties, anti-inflammatory, anti-rheumatic, gastroprotector and hepatoprotector. Therefore, this work aims to study the triterpenic compounds present in medicinal species of *Cecropia palmata*, *Cecropia obtusa*, *Bauhinia variegata* var. *variegata* and *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, originated from Brazilian Amazon. Besides determining the phytochemical profile using high performance liquid chromatography of the triterpenic compounds extracted with chloroform and ethyl acetate in the aforementioned species, this work aims to evaluate the seasonality of these compounds in three different collect years and the possible existence of chemical markers. The presence of stigmasterol, lupeol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirin e  $\alpha$ -amirin in all the studied species is highlighted. The species of *Cecropia obtusa* and *Bauhinia variegata* var. *variegata* presented the greater biodiversity of the studied compounds. Overall, ethyl acetate presented better performance as the extraction solvent when compared to chloroform. The proposed methodology is simple, precise and shows a good performance in the determination of eleven triterpenes in samples. Besides, the developed methodology can be utilized in quality control of medicinal plants or in the discovery of possible chemical markers.

**Keywords:** HPLC-UV; triterpenes; *Bauhinia*, *Cecropia*, medicinal plants



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Visão simplificada das principais vias dos metabólitos secundários e suas inter-relações com metabolismo primário.....	19
Figura 2 – Síntese do compostos derivados do isopreno a partir do ácido mevalônico e metileritrodiol fosfato .....	20
Figura 3 - Estruturas básicas dos triterpenos derivadas do esqualeno.....	21
Figura 4 – Biossíntese de triterpenos por meio de ciclizações oxidativas e não-oxidativas.....	22
Figura 5 - Fotos das flores e folhas das espécies de Cecropia estudadas (a) Flor de <i>Cecropia obtusa</i> (b) Folha de <i>Cecropia obtusa</i> (c) Flor de <i>Cecropia palmata</i> (d) Folha de <i>Cecropia palmata</i> .....	28
Figura 6 - Fotos das flores e folhas das espécies de Bauhinia estudadas (a) Flor de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>alboflava</i> (b) Flor de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> (c) Folha de <i>Bauhinia variegata</i> e <i>alboflava</i> .....	29

### ARTIGO

Figure 1 - Chromatographic separation of 11 triterpenes standard by HPLC-UV (1) arjunic acid, (2) maslinic acid, (3) betulinic acid, (4) oleanolic acid, (5) erythrodiol, (6) Uvaol, (7) lupeol, (8) $\beta$ - amirin, (9) $\alpha$ - amirin, (10) stigmasterol and (11) $\beta$ - sitosterol (analytical solutions concentration of 10 mg L <sup>-1</sup> ) . Column: Kinetex C18 250 mm $\times$ 4.6 mm, (5.0 $\mu$ m). Mobile phase: 90:10 (v/v) ACN/THF 0.5 mL min <sup>-1</sup> at 21 $\pm$ 2 °C. ....	40
Figure 2 - Triterpenic compounds found in the Bauhinia species via HPLC-UV (a) <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> and (b) <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>alboflava</i> .....	43
Figure 3 - Triterpenic compounds found in the Bauhinia species via HPLC-UV (a) <i>Cecropia obtusa</i> and (b) <i>Cecropia palmata</i> .....	44
Figure S 1 – Molar absorptivity coefficient of triterpenes studied in this work .....	55
Figure S 2 - Chromatogram of a <i>Cecropia obtusa</i> sample with standard addiction. Conditions as described under Materials and Methods. ....	56
Figure S 3 - Chromatogram of a <i>Cecropia palmata</i> sample with standard addiction. Conditions as described under Materials and Methods. ....	57
Figure S 4 - Chromatogram of a <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> sample with standard addiction. Conditions as described under Materials and Methods. ....	58
Figure S 5 - Chromatogram of a <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>alboflava</i> sample with standard addiction. Conditions as described under Materials and Methods. ....	59

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Table 1 - Optimization of the chromatographic conditions for separation of triterpenic compounds.....	39
Table 2 - Variation of triterpenoids concentration considering all the years of sampling and the two solvents.....	45

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1 – Compostos triterpênicos estudados .....	23
Quadro 2 - Atividade farmacológica dos triterpenos estudados .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
APPI	Fotoionização a pressão atmosférica
<i>Bauhinia alboflava</i>	<i>Bauhinia variegata</i> var. <i>alboflava</i>
<i>Bauhinia variegata</i>	<i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>
<i>C. obtusa</i>	<i>Cecropia obtusa</i>
<i>C. palmata</i>	<i>Cecropia palmata</i>
CE	Eletroforese capilar
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
ESI	Ionização por eletrospray
EtOAc	Acetato de etila
GC	Cromatografia gasosa (do inglês, <i>Gas chromatography</i> )
GC -MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (do inglês, <i>Gas chromatography – mass spectrometry</i> )
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês, <i>High performace liquid chromatography</i> )
IPP	Isopentenilo
LC-MS/MS	Cromatografia a líquido acoplada ao espectrômetro de massas (do inglês <i>Liquid chromatography – mass spectrometry</i> )
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
OMS	Organização Mundial da Saúde
ProNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i> )
THF	Tetrahydrofurano
TLC	Cromatografia preparativa em camada delgada
UHPLC	Cromatografia a líquido de ultra alta eficiência (do inglês, <i>Ultra high performace liquid chromatography</i> )
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 OBJETIVOS .....	17
1.1.1 <b>Geral</b> .....	17
1.1.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	17
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1 METABOLISMO BÁSICO E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	18
2.2 PLANTAS MEDICINAIS .....	26
2.2.1 Cecropia.....	27
2.2.2 Bauhinia.....	28
2.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO .....	29
<b>3 ARTIGO</b> .....	31
ABSTRACT .....	32
1. INTRODUCTION .....	33
2. MATERIALS AND METHODS .....	35
2.1 CHEMICAL AND STANDARD SOLUTIONS.....	35
2.2 HPLC-UV ANALYSIS .....	36
2.3 PLANT MATERIAL AND SAMPLE PREPARATION .....	36
2.4 VALIDATION PROCEDURE .....	37
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	38
3.1 HPLC-UV ANALYSIS .....	38
3.2 METHOD VALIDATION .....	40
3.3 APPLICATION METHOD TO PLANT EXTRACTS .....	42
4. CONCLUSIONS .....	46
ACKNOWLEDGEMENTS .....	46
REFERENCES.....	46
SUPPLEMENTARY DATA .....	55
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	60

5 REFERÊNCIAS .....	61
APÊNDICE .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento faz uso da medicina tradicional para sanar as necessidades de assistência médica primária (CORRÊA, 2006). Assim como nos países em desenvolvimento, o consumo de plantas medicinais é bem difundido nos países desenvolvidos. A Alemanha, por exemplo, é responsável por metade do consumo de extratos vegetais comercializados em toda a Europa (JUNIOR et al., 2005). Com mais de 50.000 espécies de plantas, o Brasil possui um os maiores níveis de biodiversidade no planeta, com uma das mais ricas floras do mundo, apresentando um grande potencial medicinal (GIULIETTI et al., 2005; COELHO-FERREIRA, 2009). Mesmo com diversidade e o uso generalizado de fitoterápicos no Brasil, o conhecimento científico sobre as propriedades dessa flora é limitado (DE FIGUEREDO et al., 2014).

Em 2006, com o objetivo de melhorar a saúde, o uso sustentável da biodiversidade e da investigação nesta área, o Ministério da Saúde estabeleceu uma política que regula a utilização de plantas medicinais e recursos fitoterápicos (PNPMP - Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos) (CORRÊA, 2006; COELHO-FERREIRA, 2009). Além disso, em 2009, o Ministério da Saúde publicou a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse para o Sistema Brasileiro de Saúde Pública (Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde - RENISUS). Uma das 71 espécies de plantas incluídas na RENISUS e estudada neste trabalho é *Bauhinia variegata* popularmente conhecida no Brasil como "Pata-de-vaca" ou "Unha-de-boi". A medicina popular relata os usos desta planta como hipoglicemiante, antiolesterol, antibacteriano, antitumoral, antifúngico e diurético (DA SILVA e FILHO, 2002; PIZZOLATTI et al., 2003; PAREKH et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Outras espécies estudadas neste trabalho são a *Cecropia palmata* e *Cecropia obtusa* popularmente conhecidas no Brasil como "Embaúba Vermelha" e "Embaúba Branca", usadas tradicionalmente como antirreumática (SILVA et al., 2007), anti-inflamatória e antioxidantes (DEL PILAR NICASIO-TORRES et al., 2012). Essa diversidade de propriedades farmacológicas atribuídas a *Cecropia* e *Bauhinia* está relacionada aos seus metabólitos secundários, que são os constituintes de plantas bioativas, como o caso dos flavonóides,

ácidos fenólicos, carotenóides, tocoferóis, alcalóides, lignanas, taninos, salicilatos, glucosinolatos, triterpenos, entre outros (SZAKIEL et al., 2012).

Segundo LOPES & NETO, as variações ambientais de temperatura, pressão, condições do solo, irrigação entre outros fatores, podem influenciar na produção de metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007) . Levando em consideração as características ambientais da região Amazônica, observamos um clima quente e úmido, onde o gradientes de temperatura são muitos pequenos, muita nebulosidade e bastante precipitação convectiva. O conceito de estações do ano para esta região compreende um “período seco” de julho a outubro e um “período chuvoso” de dezembro a maio (ANANIAS et al., 2010)

Os triterpenos estão presentes em óleos vegetais, cereais, frutas e cascas de árvores e são comuns na dieta humana. São uma das maiores classes de metabólitos secundários com mais de 30.000 moléculas identificadas. Seus derivados pentacíclicos apresentam propriedades farmacológicas promissoras como hepatoprotetora (KUMARI e KAKKAR, 2012), anti-inflamatória, antitumoral (MARTELANC et al., 2009), antiviral (SÁNCHEZ-ÁVILA et al., 2009) , anti-HIV(CHENG et al., 2011), antimicrobiana (MORE et al., 2012), antifúngica, antidiabética, gastroprotetora (SALEEM, 2009) , neuroprotetora, antioxidante (GHOSH e SIL, 2013), redutora do colesterol (CHAUHAN et al., 2013) , cardioprotetora, tripanocida (XU, X.-H. et al., 2012), entre outras.

Diversos trabalhos descrevem a detecção e a separação de triterpenos em plantas medicinais. Alguns métodos incluem cromatografia em camada delgada (TLC) (MARTELANC et al., 2007, 2009), cromatografia gasosa (GC) (ZHANG et al., 2012) com a etapa de derivação, eletroforese capilar (CE) (CHEUNG e ZHANG, 2008; LI, G.-L. et al., 2011), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MARTELANC et al., 2009; LI, G.-L. et al., 2011; LESELLIER et al., 2012; ZHANG et al., 2012) com um detector de UV e detector de espectrometria de massas (SÁNCHEZ-ÁVILA et al., 2009). A determinação simultânea de triterpenos torna-se uma tarefa difícil, considerando as suas estruturas semelhantes, a falta de grupamentos cromóforos, sua baixa absorção na região UV e polaridade semelhante. A literatura tem mostrado métodos envolvendo HPLC-UV com a separação de até seis triterpenos simultaneamente (BEDNER et al., 2008; SÁNCHEZ-ÁVILA et al., 2009; LI, G.-L. et al., 2011; SLAVIN e YU, 2012; LI, J. R. et al., 2013).

A presente dissertação está organizada na forma de artigo científico. Inicialmente é apresentada uma introdução, seguido dos objetivos e revisão da literatura. Na sequência, é apresentado o artigo científico referente aos resultados experimentais desse trabalho, finalizando com uma conclusão da pesquisa realizada.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

Desenvolver e validar um método cromatográfico por HPLC-UV para determinação de compostos triterpênicos extraídos de plantas medicinais.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Separar por HPLC os seguintes analitos,  $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, lupeol, uvaol, eritrodiol, ácido oleanólico, ácido betulínico, o ácido arjúnico e ácido maslínico.
- Validar a metodologia desenvolvida segundo as normas da ANVISA RE nº 899/03.
- Estabelecer o efeito do solvente extrator que melhor se adequa a cada planta testando clorofórmio ou acetato de etila.
- Determinar o perfil sazonal dos triterpenos encontrados nos gêneros *Cecropia* e *Bauhinia*.
- Identificar possíveis marcadores químicos presentes nas espécies estudadas *Cecropia obtusa*, *Cecropia palmata*, *Bauhinia variegata* var. *variegata* e *Bauhinia variegata* var. *alboflava*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

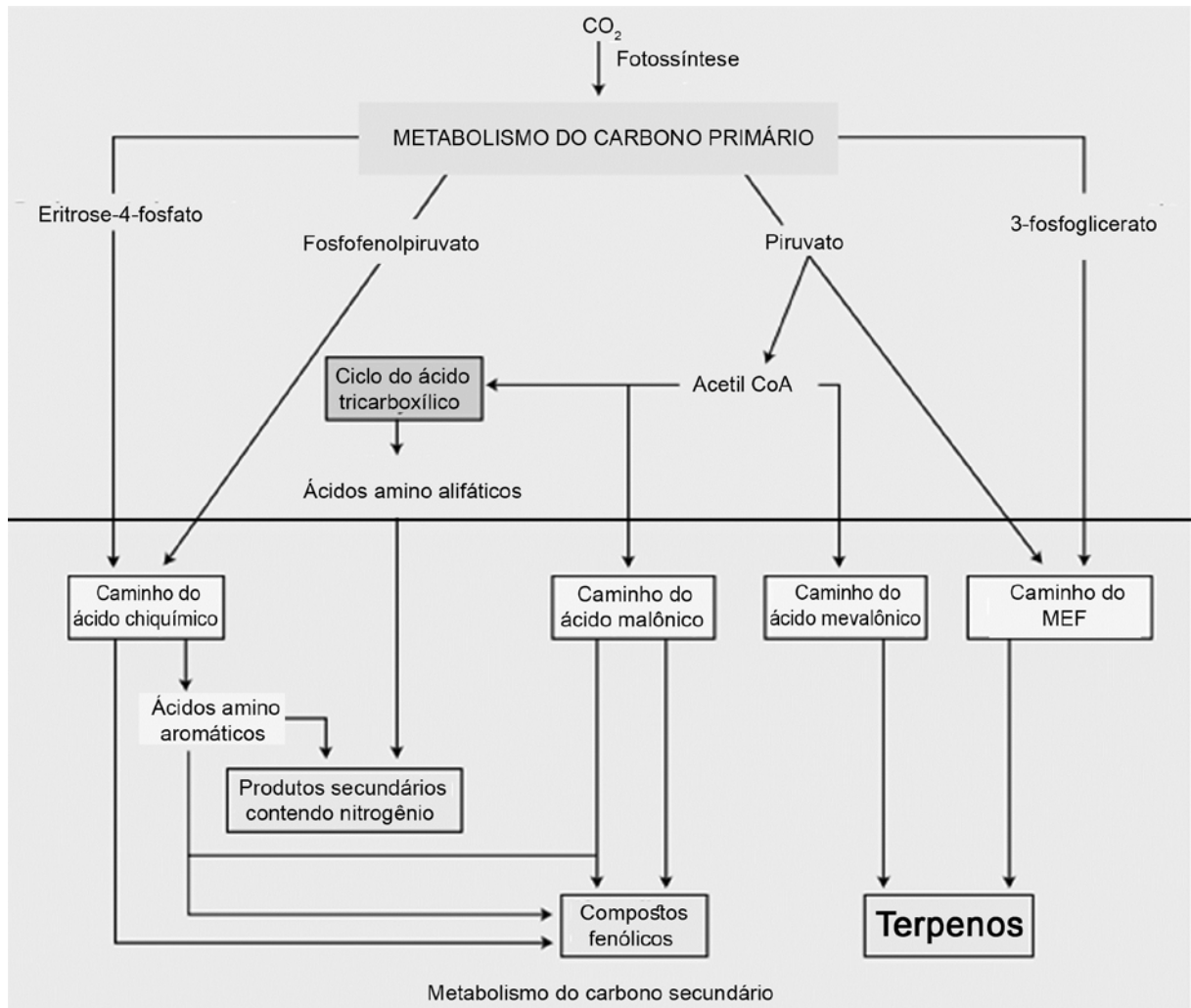
### 2.1 METABOLISMO BÁSICO E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Denomina-se metabolismo o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. Estas são catalisadas por enzimas específicas estabelecendo rotas metabólicas como do ácido chiquímico, ácido malônico, ácido mevalônico e do metileritrodiol fosfato (SIMOES, 2001; TAIZ et al., 2010). O metabolismo vegetal compreende dois tipos de metabólitos, os ditos primários, essenciais à vida, comuns aos seres vivos e responsáveis pela produção de celulose, lignina, proteína, lipídeos e açúcares. Os secundários responsáveis por garantir a sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema, podem ser divididos em três grandes grupos, terpenos, fenólicos e compostos nitrogenados (SIMOES, 2001; TAIZ et al., 2010; PEREIRA e DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012), a partir do metabolismo da glicose como ilustra a Figura 1.

A partir do final do século XIX e início do século XX, o estudo dos metabólitos secundários despertou interesse científico devido aos promissores usos como medicamentos, venenos, flavorizantes e materiais industriais (TAIZ et al., 2010). O estudo e uso desses metabólitos continuam bastante presente em decorrência das inúmeras atividades biológicas e do interesse farmacológico (PEREIRA e DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012).

O ciclo do ácido chiquímico tem como metabólitos, flavonóides, ligninas, estilbenos, polifenóis, comarinas, antocianinas e alcalóides. Pode-se também ter a formação de compostos fenólicos pelo ciclo do ácido malônico. A formação de terpenos se dá por dois ciclos, o do ácido mevalônico e do metileritrodiol fosfato.

Figura 1 – Visão simplificada das principais vias dos metabólitos secundários e suas interações com metabolismo primário

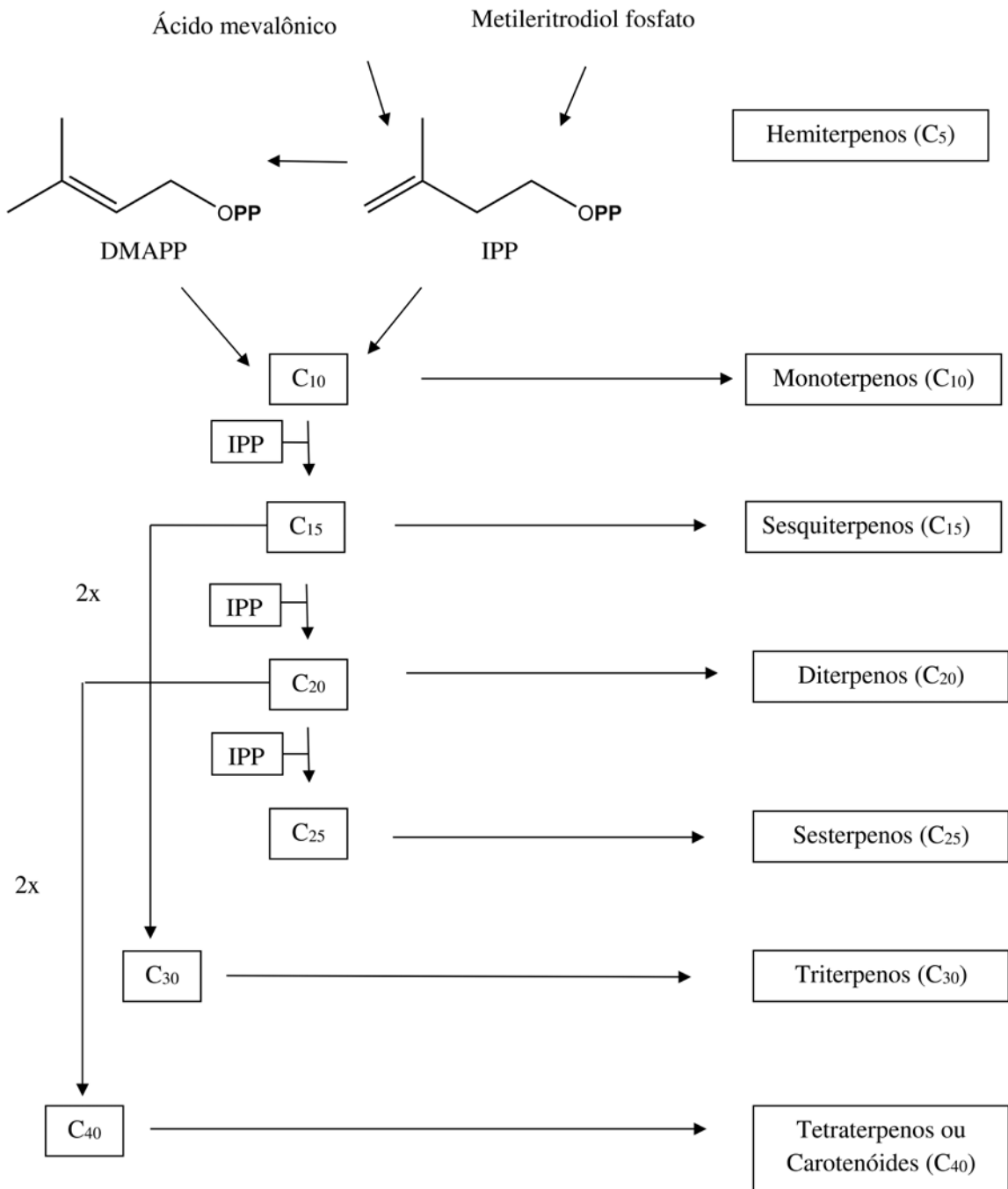


**Fonte:** (TAIZ et al., 2010)

Terpenos (Fig. 2) são todos tradicionalmente, compostos derivados de unidades de isopreno ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub>, uma família de compostos orgênicos, com estruturas diversas subdivididos de acordo com o número de carbonos presentes nas estruturas, hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) onde as estruturas podem ser acíclicas, ou conter um, dois, três, quatro ou cinco ciclos, respectivamente (DEWICK, 2002; MUFFLER et al., 2011). Triterpenos ou triterpenóides são termos utilizados para descrever compostos  $C_{30}$ , porém há uma diferenciação entre as duas expressões, o termo triterpeno é usado como coletivo para descrever terpenos de ocorrência natural, já o termo triterpenóide abrange todos os produtos

de degradação natural e sintética, tais como alcoóis de terpeno, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, epóxidos, e os produtos de hidrogenação (EGGERSDOFER, 2005; MUFFLER et al., 2011).

Figura 2 – Síntese do compostos derivados do isopreno a partir do ácido mevalônico e metileritrodiol fosfato



Fonte: (DEWICK, 2002)

Triterpenos pentacíclicos ( $C_{30}$ ) são formados pela ciclização da molécula de esqualeno em estruturas básicas (oleano, ursano, lupano, damarano e eufano) da Figura 3, são amplamente encontrados em plantas, frutas, grãos e materiais de resina natural (MARTELANC et al., 2009; ROMERO et al., 2010; LESELLIER et al., 2012). Constituído de duas unidades de pirofosfato de farnesilo (FPP), condensadas segundo o mecanismo “cabeça-cabeça”, diferente do mecanismo dos terpenos mais simples, “cabeça-cauda”, a sua ciclização ocorre de forma principal pela oxidação seletiva de um epóxido na posição 2, originando 2,3-óxido de esqualeno, como podemos observar na Figura 4 (XU, R. et al., 2004; NUNES, 2013)

Figura 3 - Estruturas básicas dos triterpenos derivadas do esqualeno

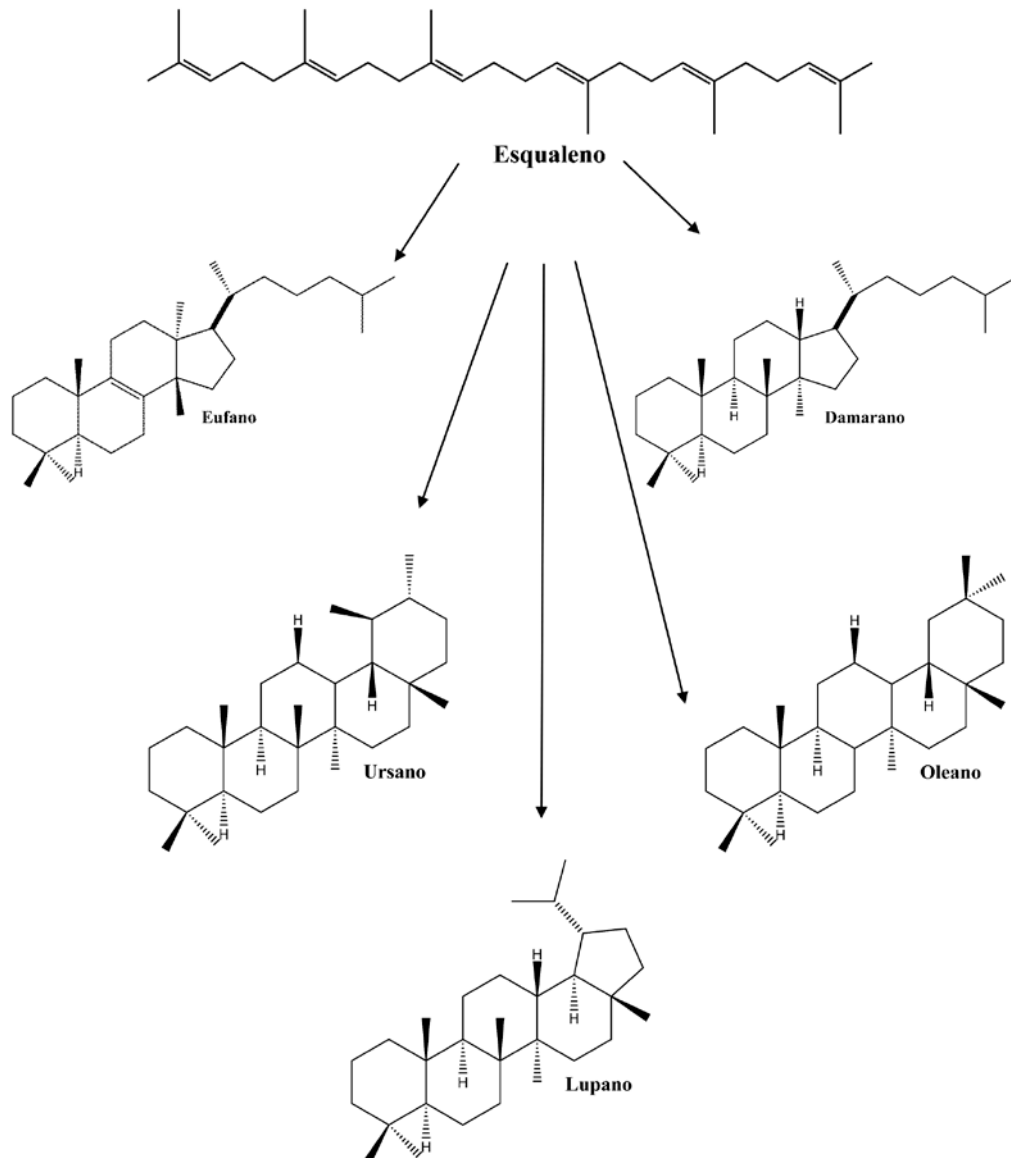
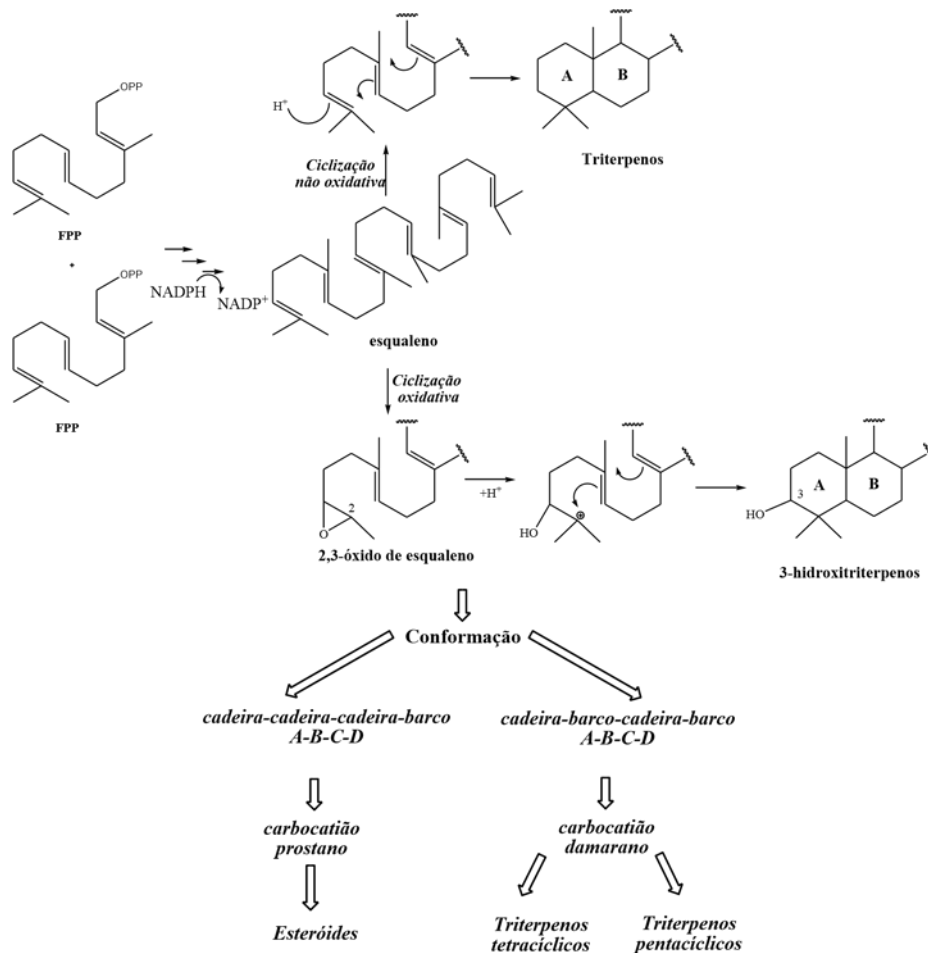


Figura 4 – Biossíntese de triterpenos por meio de ciclizações oxidativas e não-oxidativas

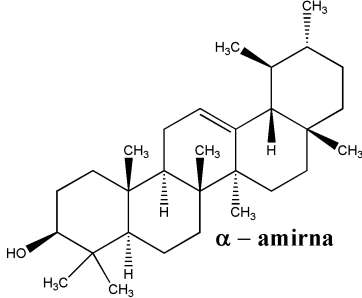
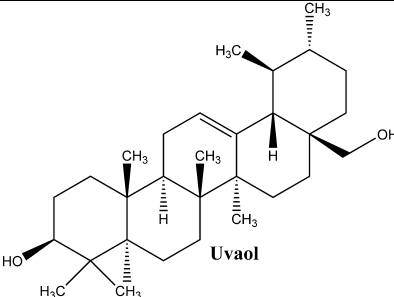
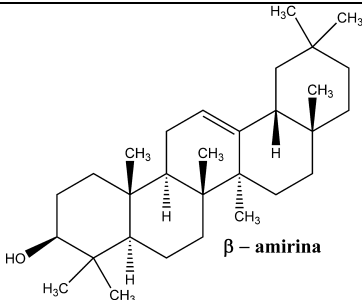
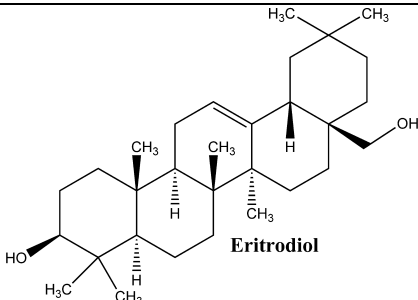
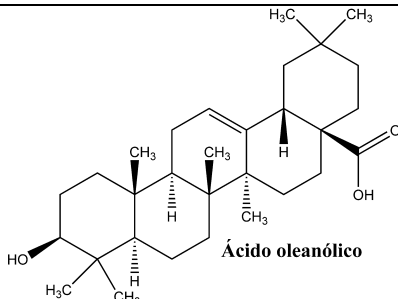


Fonte: (XU, 2004)

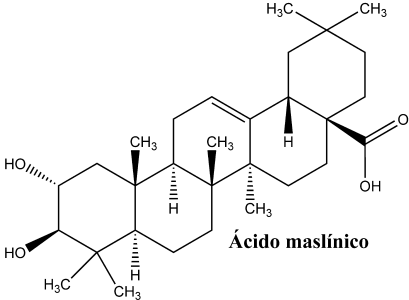
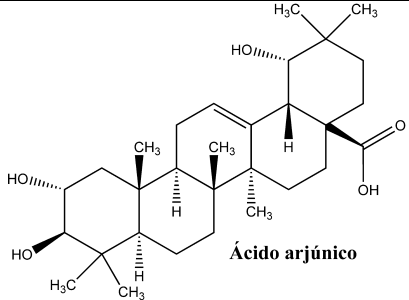
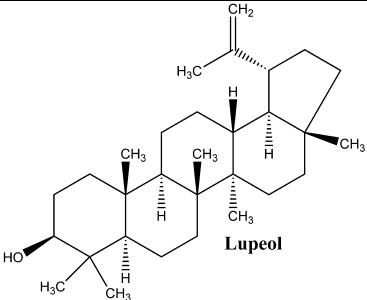
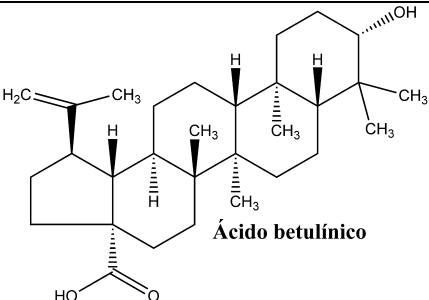
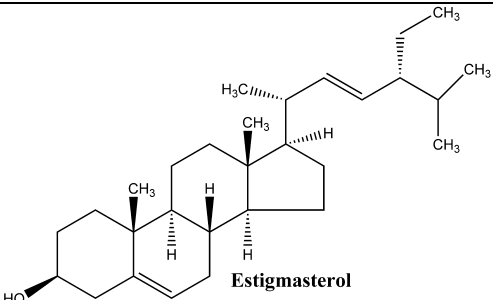
Estima-se que mais de 30.000 triterpenos já foram identificados até o presente momento (MUFFLER et al., 2011). Em decorrência desta diversidade estrutural e da abundância desses compostos nas plantas, tem-se uma das maiores classe de metabólitos secundários com atividades farmacológicas. Alguns exemplos de atividades farmacológicas dos triterpenos bem estabelecidas são gastroprotetora, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antiviral, antitumorais, antimicrobianos, antioxidante e cardioprotetora (MARTELANC et al., 2009; SALEEM, 2009; SÁNCHEZ-ÁVILA et al., 2009; DONFACK et al., 2010; ANGHEL et al., 2013). Baseado nas estruturas básicas apresentadas da Figura 3, bem como em suas principais atividades farmacológicas registradas na literatura, optou-se por estudar os 11 triterpenos que são apresentados no Quadro 1 com algumas de suas principais propriedades químicas.

Quadro 1 – Compostos triterpênicos estudados

(continua)

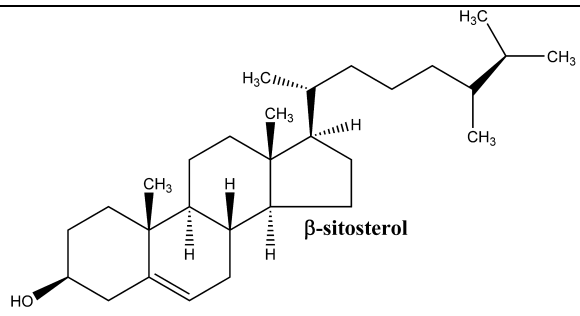
CLASSE	COMPOSTO	FÓRMULA ESTRUTURAL	pKs
Ursano	$\alpha$ - amirina	 <p><math>\alpha</math> - amirina</p>	$15,18 \pm 0,70$
	Uvaol	 <p>Uvaol</p>	$15,09 \pm 0,10$
Oleano	$\beta$ - amirina	 <p><math>\beta</math> - amirina</p>	$15,18 \pm 0,70$
	Eritrodiol	 <p>Eritrodiol</p>	$15,09 \pm 0,10$
	Ácido oleanóico	 <p>Ácido oleanóico</p>	$4,64 \pm 0,70$

(continua)

CLASSE	COMPOSTO	FÓRMULA ESTRUTURAL	pKs
Oleano	Ácido maslínico	 <p>Ácido maslínico</p>	$4,63 \pm 0,70$
	Ácido arjúnico	 <p>Ácido arjúnico</p>	$4,43 \pm 0,70$
Lupano	Lupeol	 <p>Lupeol</p>	$15,19 \pm 0,70$
	Ácido betulínico	 <p>Ácido betulínico</p>	$4,61 \pm 0,70$
Damarano	Estigmasterol	 <p>Estigmasterol</p>	$15,03 \pm 0,70$



(conclusão)

CLASSE	COMPOSTO	FÓRMULA ESTRUTURAL	pKs
Damarano	$\beta$ -sitosterol	 <p style="text-align: center;"><math>\beta</math>-sitosterol</p>	$15,03 \pm 0,70$

**Fonte:** Quadro compilado segundo valores calculados utilizando Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2014 ACD/Labs) para 278 K

No Quadro 2 são apresentadas as principais atividades farmacológicas dos compostos em estudo.

Quadro 2 - Atividade farmacológica dos triterpenos estudados

(continua)

Nome	Propriedades biológicas
Ácido oleanólico	Anti-inflamatório, hepatoprotetor, antitumor, antimicrobiano (MARTELANC et al., 2009), antiviral, antifúngico, antidiabético, gastroprotetor, reduz níveis de lipídeos no sangue (SÁNCHEZ-ÁVILA et al., 2009), potencial agente antiproliferativo (MARTÍN et al., 2007), antiartrítico (CLAUDE et al., 2004), antioxidante (DONFACK et al., 2010) e age contra protozoários (XU, X.-H. et al., 2012)
Ácido betulínico	Antiviral, age contra o crescimento de parasitas, antibacteriano, anti-inflamatório e inibe o crescimento de células cancerosas (PAI et al., 2011), antimicrobiano, antioxidante (MORE et al., 2012) e hepatoprotetor (DONFACK et al., 2010)
Ácido maslínico	Anti-HIV(CHENG et al., 2011), inibe crescimento de insetos (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2013), antifúngico, antidiabético, gastroprotetor, reduz níveis de lipídeos no sangue (SÁNCHEZ-ÁVILA et al., 2009) e potencial agente antiproliferativo (MARTÍN et al., 2007)

(conclusão)

Nome	Propriedades biológicas
Ácido arjúnico	Antioxidante, antimicrobiano, antibacteriano, neuroprotetor, antidiabético, cicatrizante, anticolinesterase, inibe o crescimento de insetos, anti-inflamatório, antiasmático, cardioprotetor, antifúngico, antiplaquetar, antitumor (GHOSH e SIL, 2013)
β-amirina	Gastroprotetor, antipruriginoso, hepatoprotetor (MARTELANC et al., 2007), anti-inflamatório e analgésico (DIAS et al., 2011), reduz a sensibilidade a estímulos de dor (BACKHOUSE et al., 2008)
α-amirina	Gastroprotetor, antipruriginoso, hepatoprotetor, anti-inflamatório (MARTELANC et al., 2007), antiartrítico (DIAS et al., 2011) reduz sensibilidade a estímulos de dor (BACKHOUSE et al., 2008) e antimicrobiano (MORE et al., 2012)
Lupeol	Protetor a danos na membrana (MARTELANC et al., 2007), age contra o crescimento de protozoários, anti-inflamatório, antitumor, cardioprotetor, antimicrobial, hepatoprotetor (KUMARI e KAKKAR, 2012), antiartrítico, antimutagênico, antioxidante e age contra malária (SALEEM et al., 2008), inibição de cristais de oxalato de cálcio (YAMASHITA et al., 2002), antidiabético, protetor da pele, nefroprotetor (SIDDIQUE e SALEEM, 2011)
Uvaol	Ação cardiovascular, antidisrítimica, antileucêmico (SOMOVA et al., 2004)
Sitosterol	Antitumor (LEE et al., 2012), redutor de colesterol (CHAUHAN et al., 2013) e gastroprotetor (QUÍLEZ et al., 2010)

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas ou medicamentos à base de ervas com fins medicinais é uma das formas mais antigas no tratamento, cura e prevenção de enfermidades (MACIEL et al., 2002; JUNIOR et al., 2005; FRANÇA et al., 2008). Para algumas comunidades e grupos étnicos

este é o único recurso disponível (SANTOS, 2000; DE OLIVEIRA et al., 2011). No Brasil ainda é comum a comercialização de plantas medicinais em feiras e mercados populares ou o cultivo em quintais.

A Amazônia, com mais de 56.000 espécies de plantas, é uma das regiões ricas em biodiversidade do planeta. O interesse nesta região visando explorar esta flora remonta do início do século XVII quando os primeiros botânicos europeus visitaram o Brasil. Porém, apenas em 1970 a botânica taxonômica se estabeleceu no Brasil (GIULIETTI et al., 2005). No ano de 2006, o Ministério da Saúde estabeleceu uma política para a regularização do uso de plantas medicinais a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” (CORRÊA, 2006) que juntamente com o “Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - ProNPMF” de 2009 (DO NASCIMENTO JÚNIOR, 2009) tem como objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”. Ratificando essa importância, o Ministério da Saúde elaborou no ano de 2009 uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Brasileiro de Saúde Pública (RENISUS). Nesta relação encontram-se 71 espécies de plantas de interesse do SUS, dentre elas a *Bauhinia variegata* (pata-de-vaca) estudada neste trabalho. Apesar de não fazer parte do RENISUS, o gênero *Cecropia* apresenta atividades farmacológicas promissoras e amplo uso na medicina popular.

### **2.2.1 Cecropia**

O gênero *Cecropia* pertence à família Moraceae/Cecropiaceae, com cerca de 75 espécies distribuídas no Brasil. Essas são popularmente conhecidas como Embaúba, Imbaúba, Imbaúva, Umbaúva, Ambaúba, Embaíba, Imbaíba e Torém (Figura 4). Seus usos na medicina popular decorrem de suas propriedades antidiabética, cicatrizante, tratamento de doenças respiratórias, antimicrobiano e anti-inflamatória (DE FREITAS e FERNANDES; SIMOES, 2001; AREND, 2010). Segundo a literatura, flavonóides, catequinas, triterpenos, taninos, esteróides e saponinas já foram encontrados nessas espécies (LAMEIRA et al., 2010).

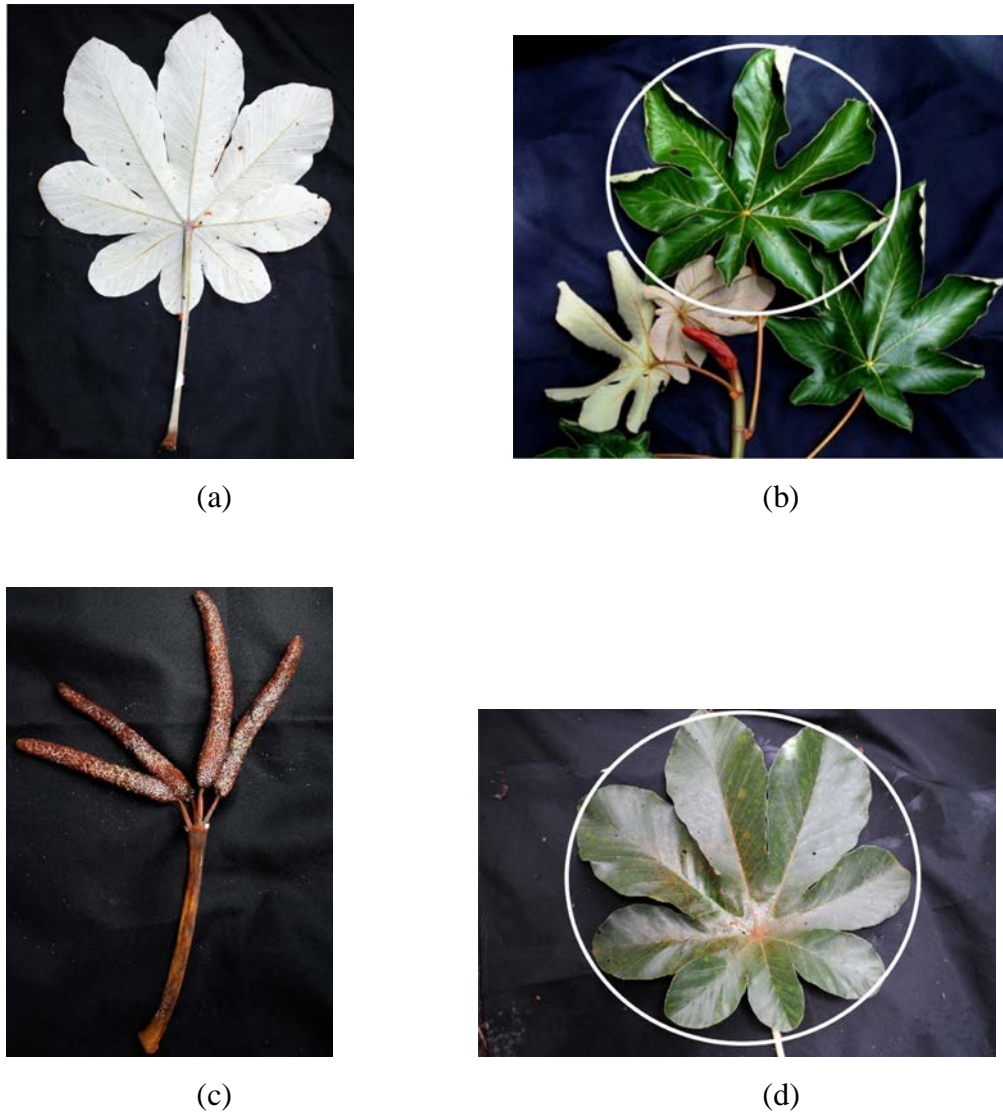


Figura 5 - Fotos das flores e folhas das espécies de Cecropia estudadas (a) Flor de *Cecropia obtusa* (b) Folha de *Cecropia obtusa* (c) Flor de *Cecropia palmata* (d) Folha de *Cecropia palmata*

### 2.2.2 Bauhinia

As espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia* compõem a família Leguminosae com aproximadamente 300 espécies (DA SILVA e FILHO, 2002; BIANCO e SANTOS, 2003) dentre elas *Bauhinia variegata* var. *alboflava* e *Bauhinia variegata* var. *variegata* (Figura 5 (a) e (b)) popularmente conhecidas como pata-de-vaca branca e pata-de-vaca rosa . Essas espécies são utilizadas na medicina popular como antifúngico (REDDY et al., 2003), antioxidante (MURILLO et al., 2007), antidiabético (PIZZOLATTI et al., 2003),

antibacteriano (PAREKH et al., 2006). É utilizada também em casos de bronquite, leptospirose, tumores e úlceras (RAJKAPOOR et al., 2003).

Segundo a literatura, plantas do mesmo gênero apresentam metabólitos secundários como flavonóides, triterpenos, glicosídeos esteróidicos e lactonas (DA SILVA e FILHO, 2002).



(a)



(b)



(c)

Figura 6 - Fotos das flores e folhas das espécies de Bauhinia estudadas (a) Flor de *Bauhinia variegata* var. *alboflava* (b) Flor de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (c) Folha de *Bauhinia variegata* e *alboflava*

### 2.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

A extração tem por objetivo a separação, isolamento e recuperação de substâncias a partir de diversas matrizes, sólidas ou líquidas, através de processos químicos, físicos ou mecânicos (VINATORU, 2001; STALIKAS, 2007). O meio de extração deve ser exaustivo, reprodutível, rápido, simples e barato (WÓJCIAK-KOSIOR et al., 2013). Dentre os métodos de extração mais utilizados têm-se hidrodestilação, soxhlet, maceração, ultrassom, fluido supercrítico, extração acelerada por solvente, entre outros (PAI et al., 2011).

Nos últimos anos, com objetivo de simplificar o processo de extração houve um crescimento no interesse por métodos não convencionais, como a extração assistida por ultrassom (EAU). Este processo tem como vantagem a simplicidade de operação, tempo reduzido do processo e menor quantidade de solvente utilizado (DA PORTO et al., 2013).

O processo de extração assistido por ultrassom ocorre baseado no fenômeno de cavitação acústica no meio líquido, o qual se refere à formação, crescimento e implosão de bolhas de gás (LUQUE-GARCIA e DE CASTRO, 2003; DE CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2007). O principal efeito do ultrassom na extração de matrizes vegetais é o aumento do estresse mecânico das células, decorrente do colapso das bolhas de cavitação próximas à parede celular. Este processo facilita a penetração do solvente e intensifica a transferência de massa (BENELLI, 2010; AJILA et al., 2011) da planta para o solvente. Além disso, as bolhas formadas no processo de cavitação aumentam o caráter hidrofóbico do meio extrator, possibilitando a extração de componentes polares em solução aquosa reduzindo assim a necessidade de meios hidrofóbicos ou fortemente polares (VILKHU et al., 2008). Segundo estudos desenvolvidos por Dal Prá e Wójciak-Kosior (WÓJCIAK-KOSIOR et al., 2013; DAL PRÁ et al., 2015) a extração assistida por ultrassom apresenta rendimentos maiores que o de maceração, soxhlet e extração com refluxo aquecido para os ácidos oleanólico e ursólico com solventes de diferentes polaridades (WÓJCIAK-KOSIOR et al., 2013). Os rendimentos para a EAU encontrados no referido trabalho se comparam aos encontrados nas extrações com micro-ondas e extração acelerada por solvente.

**3 ARTIGO****Distribution of triterpenic compounds in species of *Cecropia* and *Bauhinia*  
in different sampling years**

Marcella Emilia Petra Schmidt,<sup>a</sup> Lucas Paines Bressan,<sup>a</sup> Leandro M. de Carvalho,<sup>a,b</sup> Carine Viana,<sup>b</sup> Osmar Lameira<sup>c</sup> and Marcelo B. da Rosa<sup>\*a,b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria,  
Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de  
Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>c</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 66095-100, Brazil

---

\*Corresponding author. Tel.: +55-5532208870

E-mail address: [marcelobdarosa@gmail.com](mailto:marcelobdarosa@gmail.com)

## ABSTRACT

The aim of this paper is to provide an overview on the chemical composition of triterpenes in widespread used folk medicine species, through the development and validation of a separation method of 11 triterpenes compounds ( $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol, uvaol, erythodiol, oleanolic acid, betulinic acid, arjunic acid and maslinic acid) using high performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV). The compounds were separated using isocratic elution, on a RP-column (Kinetex C18, 250 mm  $\times$  4.6 mm, I.D., 5  $\mu$ m) with mobile phase consisted of acetonitrile: tetrahydrofuran (90:10, v/v), flow-rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup> and detection in 210 nm. Diverse validation parameters, such as linearity, LOD and LOQ, accuracy, precision, repeatability, and stability, were successfully evaluated. The samples of *Bauhinia variegata* var. *variegata*, *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, *Cecropia palmata* and *Cecropia obtusa* collected in 2012, 2013 and 2014 from Amazon were treated with two different solvents (ethyl acetate and chloroform) and analyzed by the proposed HPLC method, using the standards addition approach. Stigmasterol, lupeol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirin and  $\alpha$ -amirin were found in all the studied plants. Besides the presence of marker compounds as  $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol, oleanolic acid and maslinic acid in the plants extracts, highlight the presence of oleanolic acid and maslinic acid in *Cecropia obtusa* and *Cecropia palmata* extracts (more than 100 mg kg<sup>-1</sup>), erythodiol only in *Cecropia palmata*, stigmasterol in *Bauhinia variegata* var. *variegata* (more than 350 mg kg<sup>-1</sup>) and  $\alpha$ -amirin in *Bauhinia variegata* var. *alboflava*. Overall, ethyl acetate showed better performance as the extractor solvent than chloroform. The proposed methodology was simple, accurate and performed well in to the determination of eleven triterpenes in samples. Moreover, it could be used for the quality control of medicinal plants and to assess potential marker compounds.

Keywords: HPLC-UV; triterpenes; *Bauhinia*, *Cecropia*, Medicinal plants



## 1. INTRODUCTION

Triterpenes, presents in vegetable oils, cereals, fruits and bark of trees are widespread in the human diet (Rhourri-Frih et al., 2009; Saleem, 2009; Siddique and Saleem, 2011; Szakiel et al., 2012) and one of the largest classes of secondary metabolites, with more than 30.000 different triterpenes reported (Muffler et al., 2011; Thimmappa et al., 2014).

This large number of compounds is related to the versatility of their structure, consisted of acycles, bi-, tri-, tetra- and pentacycles (Dias et al., 2011; Muffler et al., 2011). Among those, pentacyclic triterpenes presented promising pharmacological properties (Ghosh and Sil, 2013; Shanmugam et al., 2013; Szakiel et al., 2012) such as, anti-inflammatory (Martelanc et al., 2009; Saleem et al., 2008) hepatoprotector (Kumari and Kakkar, 2012; Pollier and Goossens, 2012), anti-tumor (Saleem, 2009; Shanmugam et al., 2013), anti-viral (Kong et al., 2013; Sánchez-Ávila et al., 2009), anti-HIV (Cheng et al., 2011; Wójciak-Kosior et al., 2013), anti-microbial (Pai et al., 2011), anti-fungal (Rocha et al., 2004), anti-diabetic (Manna et al., 2010), gastroprotective (Quílez et al., 2010; Sánchez et al., 2006), anti-hyperlipidemic (Claude et al., 2004) , neuroprotector (da Silva et al., 2011), antiarthritic (Siddique and Saleem, 2011), antioxidant (2010), cholesterol-reducing properties (CHAUHAN et al., 2013), cardioprotective (Somova et al., 2003) and trypanocidal activity (da Silva Ferreira et al., 2010).

Medicinal plants have been used for centuries in folk medicine associated with health promotion, prevention and cure of human diseases (Laszczyk, 2009; Romero et al., 2010). With more than 50,000 plant species, Brazil has the greatest levels of biodiversity in the planet (GIULIETTI et al., 2005) and Amazonia is a region with one of the richest flora in the world with a large potential discovery and research of new drugs (Coelho-Ferreira, 2009; GIULIETTI et al., 2005). Despite the diversity and the widespread use of phytotherapies in Brazil the scientific knowledge about these flora properties is limited (de Figueredo et al., 2014).

In 2006, aiming to improve healthcare, the sustainable use of biodiversity and the research in this area, Brazilian Ministry of Health established a policy regulating the use of medicinal plants and phytotherapeutic resources (Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos) (Coelho-Ferreira, 2009). In addition to this policy, in 2009, Brazilian Ministry

of Health published the National List of Medicinal Plants of Interest to the Brazilian Public Health System (*Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde* – RENISUS). One of the 71 plant species included in RENISUS is *Bauhinia variegata*, popular known in Brazil as “Pata-de-vaca” or “Unha-de-boi”. Member of the Fabaceae family, it has been used in popular medicine as a result of their hypoglycemic (da Silva and Filho, 2002; Murillo et al., 2007; Parekh et al., 2006; Silva et al., 2007), anti-cholesterol, anti-elephantiasis (Silva et al., 2007), antibacterial (da Silva and Filho, 2002; Parekh et al., 2006), anti-tumour (Raj Kapoor et al., 2003), antifungal (da Silva and Filho, 2002; Raj Kapoor et al., 2003), diuretic, tonic, depurative (Pizzolatti et al., 2003) activities, while also being useful against skin diseases and ulcers (Reddy et al., 2003), in bronchitis, leprosy (Raj Kapoor et al., 2003) and in the management of inflammatory diseases (da Silva and Filho, 2002; Rao et al., 2008).

Another medicinal plants included in this study is *Cecropia palmata* and *Cecropia obtusa* popularly known in Brazil as “Embaúba Vermelha” and “Embaúba Branca” from the Moraceae family, traditional used as anti-rheumatic (Silva et al., 2007), anti-inflammatory (Costa et al., 2011; da Graça Rocha et al., 2007; del Pilar Nicasio-Torres et al., 2012; Pelaez et al., 2013), anti-oxidant activities (del Pilar Nicasio-Torres et al., 2012), anti-tumor (da Graça Rocha et al., 2007) act in central nervous system, including anxiolytic and antidepressant-like activities (Costa et al., 2011; Silva et al., 2007), against asthma, high blood pressure (Costa et al., 2011), as well used in the treatment of type 2 diabetes (da Graça Rocha et al., 2007; del Pilar Nicasio-Torres et al., 2012; Pelaez et al., 2013).

This wide diversity of pharmacological properties reported in *Cecropia* and *Bauhinia* is related to secondary metabolites, as flavonoids, phenolic acids, carotenoids, tocopherols, alkaloids, lignans, tannins, salicylates, glucosinolates and triterpenes (Szakiel et al., 2012).

Several papers described the detection and separation of triterpenes in medicinal plants. Some methods include preparative thin-layer chromatography (TLC) (Martelanc et al., 2007, 2009), gas chromatography (GC) with derivatization step (Zhang et al., 2012), capillary electrophoresis (CE) (Cheung and Zhang, 2008; Li et al., 2011), evaporative light-scattering detectors (Lesellier et al., 2012), high-performance liquid chromatography (HPLC) (Lesellier et al., 2012; Li et al., 2011; Martelanc et al., 2009; Zhang et al., 2012) with UV detector or mass spectrometric detectors using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) atmospheric pressure photoionization (APPI) and electrospray ionization (ESI) (Sánchez-Ávila et al., 2009). The simultaneous determination of triterpenes render a difficult task considering, their similar structure, lack of chromophores, very low UV absorption and

similar polarity. According to the literature, there is only one published report that separates more than six triterpenes in a single HPLC run (Bedner et al., 2008; Li et al., 2011; Li et al., 2013; Martelanc et al., 2009; Sánchez-Ávila et al., 2009; Slavin and Yu, 2012).

In this study the development of a method for simultaneous determination of 11 triterpenes ( $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol, uvaol, erythrodiol, oleanolic acid, betulinic acid, arjunic acid and maslinic acid) with isocratic elution and UV detection was proposed. The developed method was applied to the analysis of four different medicinal plants from the Amazon region (*Cecropia obtusa*, *Cecropia palmata*, *Bauhinia variegata* var. *variegata* and *Bauhinia variegata* var. *alboflava*) by HPLC with UV detection. The confirmation of the species was carried out by performing an ultra-high-performance liquid chromatography- atmospheric pressure photoionization source mass spectrometry (UHPLC-APPI-MS/MS) analysis.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 CHEMICAL AND STANDARD SOLUTIONS

All the chemical standards used,  $\alpha$ -amirin (98%),  $\beta$ -amirin (98,5%),  $\beta$ -sitosterol (85%), stigmasterol (95%), lupeol (90%), uvaol (95%), erythrodiol (97%), oleanolic acid (97%), betulinic acid (97%), arjunic acid (88%) and maslinic acid (95%) used were of analytical grade from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The solvents acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and tetrahydrofuran (THF) were of HPLC grade from Tedia (Fairfield, OH, EUA). Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) and ethyl acetate (EtOAc) were of analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions of  $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin, uvaol, erythrodiol, oleanolic acid, arjunic acid and maslinic acid 1000 mg L<sup>-1</sup>, stigmasterol 481 mg L<sup>-1</sup>, lupeol 365 mg L<sup>-1</sup>, betulinic acid 196 mg L<sup>-1</sup> and  $\beta$ -sitosterol 873 mg L<sup>-1</sup> were prepared in methanol. The working analytical solutions for analytical curve were obtained by diluting the analytical solutions in acetonitrile with the following concentrations 0.7; 6.5; 12.2; 18.0; 23.6; 29.3 and 35.0 mg L<sup>-1</sup>. All the solutions were stored at -20°C until analysis.

## 2.2 HPLC-UV ANALYSIS

Chromatographic measurements were performed on a Dionex<sup>®</sup> model P680 (Sunnyvale, CA, USA) liquid chromatography equipped with a UV-vis detector model UVD170U, Rheodyne<sup>®</sup> injection valve model 8125 (Cotati, CA, USA) with loop of 100  $\mu$ l. The analyses were carried out with a Kinetex reversed-phase C<sub>18</sub> column (250 mm  $\times$  4.6 mm, I.D., 5  $\mu$ m particle size; Phenomenex, Torrance, CA, USA) which was preceded by a Security Guard C<sub>18</sub>.pre-column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of acetonitrile: tetrahydrofuran (90:10, v/v) and the flow-rate was set at 0.5 mL/min. Spectrophotometry detection of analytes was performed at 210 and 254 nm wavelengths. Evaluation and quantification were made on a Chromeleon 6.7 Workstation. A structural confirmation of the species detected using HPLC-UV observed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem atmospheric pressure photoionization mass spectrometry (UHPLC-APPI-MS/MS) and described in details by Gobo (Gobo et al., 2016).

## 2.3 PLANT MATERIAL AND SAMPLE PREPARATION

The medicinal plant species *Bauhinia variegata* var. *variegata* (deposit n<sup>o</sup> IAN 185932), *Bauhinia variegata* var. *alboflava* (deposit n<sup>o</sup> IAN 185831), *Cecropia obtusa* Trécul (deposit n<sup>o</sup> IAN 185555) and *Cecropia palmata* Willd (deposit n<sup>o</sup> IAN 185556) were obtained from the herbal collection of the Brazilian Agricultural Research Corporation, *Embrapa Amazônia Oriental*, Belém, PA, Brazil. The geographical location of the collection site is 1°27'21'' S latitude and 48°30'14'' W longitude. The fresh plant species were cleaned, dried at 40 °C for 12 h, ground into a fine powder in a laboratory mill and used as a dry powdered material. All plants were received as a fine powdered dried leaf material. Dried samples were stored in desiccators under vacuum at room temperature until sample treatment.

The Amazon region has a hot and humid characteristic climate with small temperature gradients. There are two well establish seasons in that region, a dry-period (July - October) and rainy season (December - May); the months of June and November are considered

transition periods (Ananias et al., 2010). According Gobbo-Neto (Gobbo-Neto and Lopes, 2007) there is a positive influence of rainfall on the concentration of secondary metabolites (cyanogenic glycosides, glucosinolates, terpenes, anthocyanins and alkaloids) therefore, the samples studied were collected during the rainy season in three different years (2012, 2013 and 2014).

Ultrasound-assisted extraction was performed in a reactor thermostatic water bath (temperature accuracy of  $\pm 1.0$  °C). The experimental setup consists of an ultrasonic bath USC 1800A (Unique Inc., Brazil, BR) equipped with a transducer with longitudinal vibrations. The ultrasonic unit has an operating frequency of 40 kHz and a maximum-rated ultrasound power output of 132 W. The ultrasonic transducer (surface area of 282.2 cm<sup>2</sup>) is fitted at the bottom of the bath horizontally along the length of the bath (Dal Prá et al., 2015). Samples were weighed 0.5g and placed into a conical flask, into which 10 mL of ethyl acetate or chloroform was added and sonicated for 30 min at 37 °C. Extraction was carried out three times with fresh portions of solvent in the above conditions (Pai et al., 2011; Wójciak-Kosior et al., 2013). The extract remained was dried with N<sub>2</sub> and dissolved in 10 mL of mobile phase. All the samples were diluted to a 2% (m/v) and filtered through Chromafil Xtra PEFT-20/25 filters from Macherey–Nagel (Düren, Germany) before injection. For construction of the calibration curves, seven different mixed solutions were injected in three replicates.

## 2.4 VALIDATION PROCEDURE

The analytical method was validated for linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy and precision following the RE n° 899/2003 (ANVISA, 2003) and the International Conference on Harmonization (ICH) guide (GUIDELINE, 2005). The calibration curves were prepared using seven concentrations (0.7; 6.5; 12.2; 18.0; 23.6; 29.3 and 35.0 mg L<sup>-1</sup>) of the 11 stock standard solutions in the range 0.21–40 mg L<sup>-1</sup> which were injected in triplicate. The mean peak areas were taken for the construction the calibration curve. The data were analyzed by linear regression least square model. The limit of detection (LOD) was defined as the compound concentration that produced a signal-to-noise ratio of 3 (S/N = 3). The limit of quantification (LOQ) was evaluated as the concentration equal to 10 times the signal-to-noise ratio (S/N = 10). The precision was determined by intra and inter-

day variation and the recovery were evaluated by standard addition method, the variations were expressed by RSD % as the following formula:  $RSD (\%) = (\text{detected amount} - \text{original amount}) / \text{amount spiked} \times 100$ . The inter and intraday precisions were estimated by analyzing three and five replicates containing the spiked samples at three different concentrations (2.5, 10 and 16 mg mL<sup>-1</sup>). All solutions were kept at -20°C before analysis.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1 HPLC-UV ANALYSIS**

Based in methods reported in the literature (Li et al., 2013; Martelanc et al., 2007, 2009; Sánchez-Ávila et al., 2009; Yang et al., 2009), chromatographic conditions were optimized in order to obtain the best separation of the analytes in the shortest time. The main variables evaluated in the chromatographic separation were ratio of the mobile phase, flow-rate of mobile phase, temperature of the operational room and detection wavelength. Table 1 shows these variables, the ranges studied and their optimum values as well as the solvents used in the optimization of the mobile phase composition.

Table 1 - Optimization of the chromatographic conditions for separation of triterpenic compounds

Variable	Tasted value	Optimum value
Flow rate (mL . min <sup>-1</sup> )	0.5; 0.8 and 1.0	0.5
Room temperature °C	21.0 and 23.0	21.0
Composition mobile phase		
MeOH:H <sub>2</sub> O	90:10 (v/v) (pH 3.0)	ACN:THF (90:10; v/v)
	80:20 (v/v) (pH 3.0)	
ACN: H <sub>2</sub> O	90:10 (v/v) (pH 3.0)	
THF:ACN:H <sub>2</sub> O	30:60:10 (v/v)	
ACN: THF	90:10 (v/v)	
Wavelength (nm)	200; 205; 210; 220 and 225	210

Acetonitrile – ACN; Methanol – MeOH; Tetrahydrofuran – THF; Water – H<sub>2</sub>O

The best mobile phase was ACN/THF (90:10; v/v). The optimum flow rate and room temperature were 0.5 mL min<sup>-1</sup> and 21 °C, respectively. The detection wavelength was chosen at 210 nm accordingly to experimental data (Table 2) and the literature (Holen, 1985; Romero et al., 2010; Schneider et al., 2009; Slavin and Yu, 2012; Xu et al., 2012; Zhang et al., 2012) due to better absorption at the selected wavelength. The representative chromatogram for standard solutions under the proposed conditions is shown in Figure 1. It is noteworthy to mention that the complete separation of the eleven triterpenes could be achieved in 45 min, compared to other separation methods, it can be said that the new methodology developed separates more compounds than the others reported in literature on isocratic mode (Ávila et al., 2007; Cheung and Zhang, 2008; Liu et al., 2003; Razboršek et al., 2007).

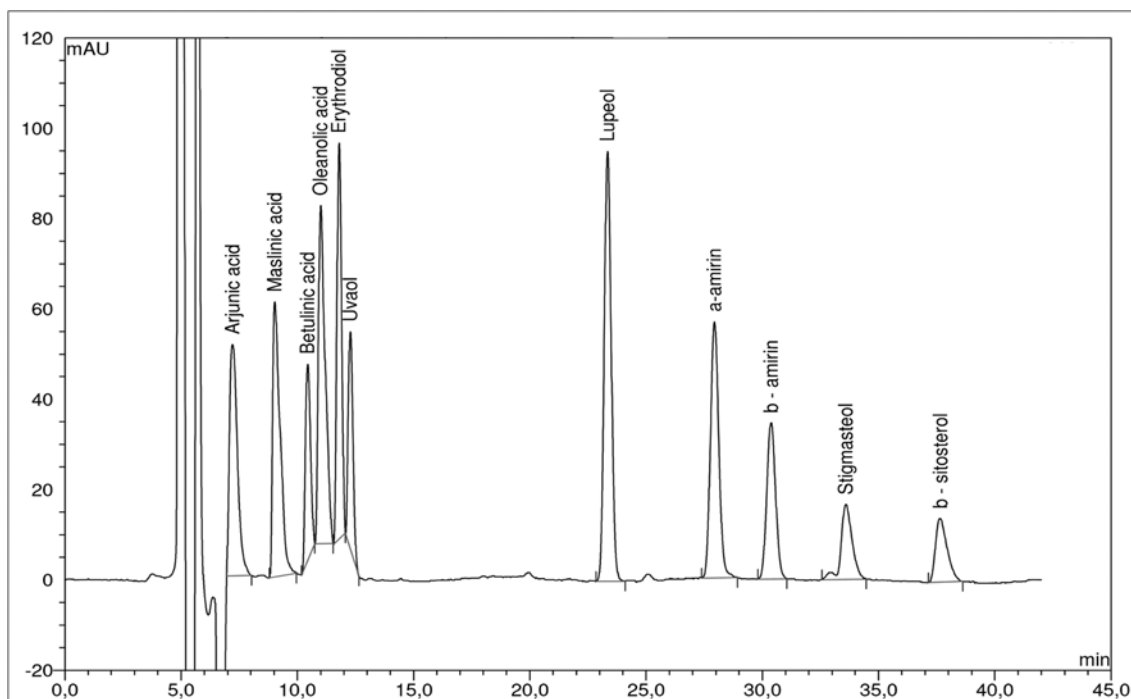


Figure 1 - Chromatographic separation of 11 triterpenes standard by HPLC-UV (1) arjunic acid, (2) maslinic acid, (3) betulinic acid, (4) oleanolic acid, (5) erythrodiol, (6) Uvaol, (7) lupeol, (8)  $\beta$  - amirin, (9)  $\alpha$  - amirin, (10) stigmasterol and (11)  $\beta$  - sitosterol (analytical solutions concentration of  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Column: Kinetex C18  $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ , ( $5.0 \mu\text{m}$ ). Mobile phase: 90:10 (v/v) ACN/THF  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  at  $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2 METHOD VALIDATION

The calibration curves showed good linearity and the correlation coefficients were found in the range of 0.990–0.996 for all of the tested compounds. The recoveries of the 11 analytes were in the range of 85 – 110 %. The relative standard deviation (RSD) between sample measurements was used as precision, varying from 2.01 to 9.37 % for intraday precision and from 1.84 to 4.04 % to interday for precision. Overall, these results demonstrate that the developed method has enough accuracy, precision, and sensitivity for the simultaneously quantitative analysis of the 11 compounds. The recovery results for evaluating the accuracy of the method were satisfactory according to the ANVISA, which allows a range of 80-120 %, likewise the RSD, accepted up to 20%. The obtained validation parameters such as correlation coefficient, linear range, recovery, LOD and LOQ are summarized in Table 3.



Table 3- Analytical parameters for the validated method by HPLC-UV

<b>Compound</b>	<b>LOD (mg .kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (mg .kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Linear range (mg .kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Correlation coefficient (r<sup>2</sup>)</b>	<b>Intra-day precision (RSD %)</b>	<b>Inter-day precision (RSD %)</b>	<b>Accuracy (%)</b>
$\alpha$ -amirin	0.104	0.312	0.74 – 40.0	0.996	3.602	3.210	95-110
$\beta$ -amirin	0.104	0.312	0.74– 40.0	0.996	2.727	2.155	100-105
Oleanolic acid	0.104	0.312	0.74 – 35.0	0.990	8.916	3.647	98-102
Betulinic acid	0.104	0.312	0.74 – 35.0	0.996	9.379	3.402	93-97
$\beta$ -sitosterol	0.212	0.636	0.74 – 40.0	0.992	3.952	3.186	97-110
Stigmasterol	0.104	0.312	0.74 – 40.0	0.991	2.014	2.123	85-96
Lupeol	0.104	0.312	0.74 – 40.0	0.996	2.434	2.539	92-102
Uvaol	0.104	0.312	0.74 – 35.0	0.991	2.377	2.290	95-108
Arjunic acid	0.104	0.312	0.74 – 35.0	0.990	4.011	3.749	97-103
Maslinic acid	0.104	0.312	0.74 – 40.0	0.996	4.386	4.404	96-99
Erythrodiol	0.104	0.312	0.74 – 35.0	0.994	2.165	1.846	90-96

LOD, limit of detection; LOQ limit of quantification; RSD, relative standard deviation

### 3.3 APPLICATION METHOD TO PLANT EXTRACTS

Previous studies in phytochemical analysis reported the presence of glycosides, triterpenes, flavonoids, lactones, steroids, alkaloids, coumarins and saponins in *Bauhinia* species (da Silva and Filho, 2002; Pizzolatti et al., 2003; Raj Kapoor et al., 2003; Rao et al., 2008). Sample analysis (Figure 2) indicated the presence of six (maslinic acid, stigmasterol, lupeol,  $\beta$  – sitosterol,  $\beta$ -amirin and  $\alpha$  – amirin) out of the eleven compounds in the *Bauhinia* species agreeing with the UHPLC-APPI-MS/MS analysis in the same samples (Gobo et al., 2016). *Bauhinia variegata* var. *variegata* shows greater amounts of triterpenes in comparison with *Bauhinia variegata* var. *alboflava*. The use of ethyl acetate enabled to extract higher concentrations of stigmasterol (+85%), lupeol (+35%) and  $\beta$ -sitosterol (+13%) in comparison with the chloroform.

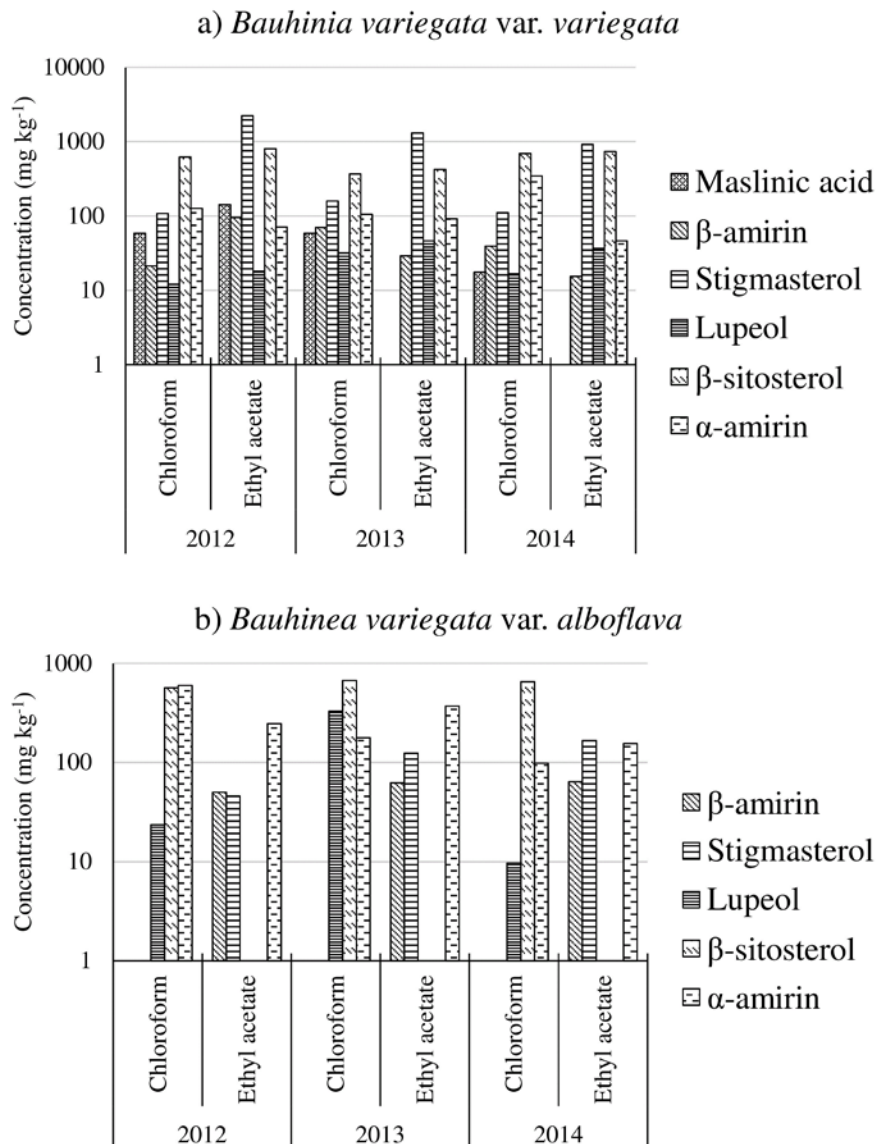


Figure 2 - Triterpenic compounds found in the *Bauhinia* species via HPLC-UV (a) *Bauhinia variegata* var. *variegata* and (b) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*

Regarding the studied compounds, *Cecropia obtusa* (Figure 3) exhibited a greater diversity when compared to the other species of the same genus analyzed *Cecropia palmata*. Among the eleven triterpenes separated in this method oleanolic acid, maslinic acid,  $\beta$ -amirin, stigmasterol, lupeol and  $\beta$ -sitosterol were found in these samples. Noteworthy is the presence of  $\beta$ -sitosterol (+55%),  $\alpha$ -amirin (+60%),  $\beta$ -amirin (+60%) and oleanolic acid (+20%), increasing concentrations along the years, and the ethyl acetate was 20% better extract solvent than chloroform for these compounds. This observation can be a result of some environmental factors such as ultraviolet radiation, rainfall, temperature (Gobbo-Neto and Lopes, 2007).

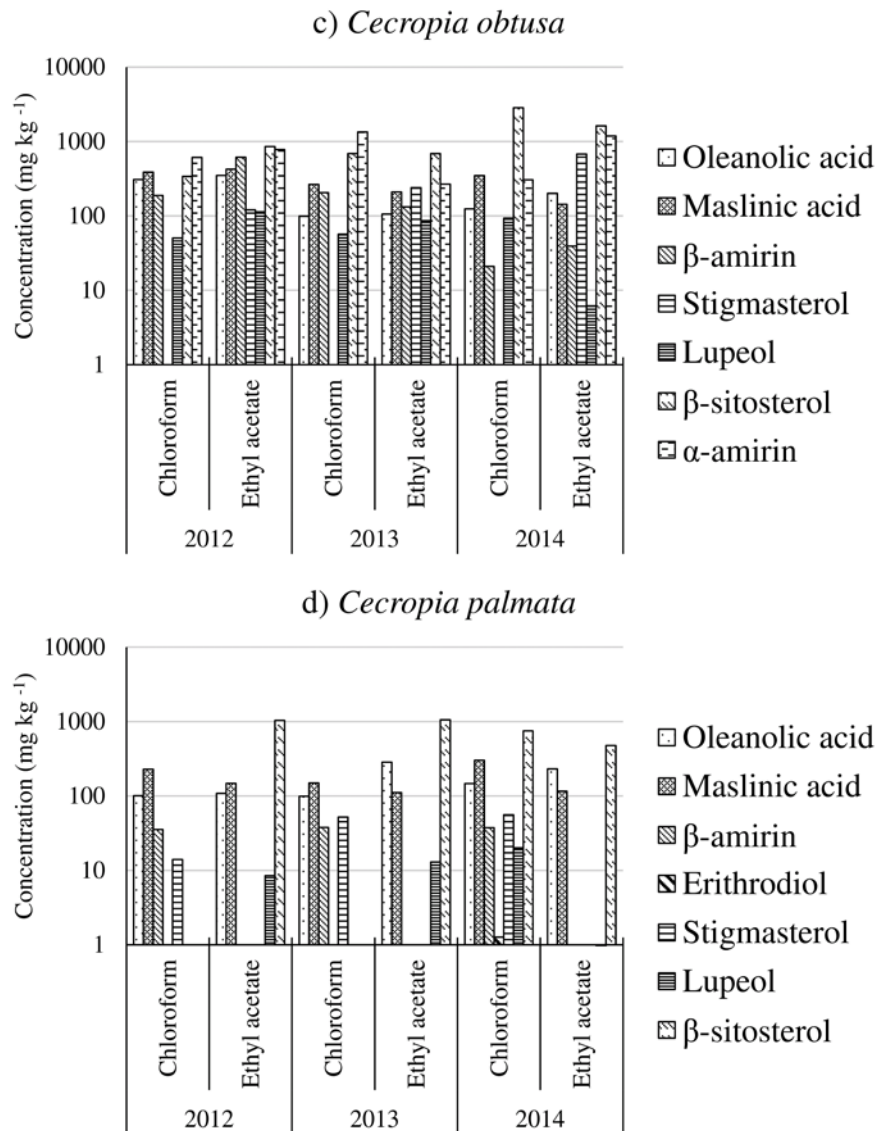


Figure 3 - Triterpenic compounds found in the *Bauhinia* species via HPLC-UV (a) *Cecropia obtusa* and (b) *Cecropia palmata*

The concentration of triterpenes in the extracts is summarized in Table 2, the range values from 6.19 to 2.248 mg kg<sup>-1</sup>. The founded compounds ( $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin, oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol and maslinic acid) can be considered chemical markers for the studied species, being the oleanolic acid and maslinic acid only for *Cecropia* species.

Table 2 - Variation of triterpenoids concentration considering all the years of sampling and the two solvents

<b>Compound</b>	<b><i>Bauhinia variegata</i></b> <b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b><i>Bauhinia alboflava</i></b> <b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b><i>Cecropia palmata</i></b> <b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b><i>Cecropia obtusa</i></b> <b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>
<b><math>\alpha</math>-amirin</b>	46.05 – 346.50	98.62 – 598.80	–	267.59 – 1344.55
<b><math>\beta</math>-amirin</b>	15.38 – 95.29	63.88	37.84	20.96 – 613.25
<b>Oleanolic acid</b>	–	–	99.07 – 284.95	99.13 – 350.21
<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>	367.92 – 800.68	671.04	1055.05	339.74 – 2848.77
<b>Stigmasterol</b>	108.42 – 2221.87	166.65	56.01	678.64
<b>Lupeol</b>	12.07 – 46.23	328.96	20.03	6.19 – 113.07
<b>Maslinic acid</b>	142.46	–	111.39 – 301.19	143.52 – 426.22

#### 4. CONCLUSIONS

A new analytical method has been developed for the simultaneous identification and quantification of triterpenes compounds using HPLC–UV and isocratic elution, to analyze these compounds in *Cecropia* and *Bauhinia* species. The HPLC-UV method is effective to separate and quantify the medicinal plants extracts with good validation parameters, such as linearity, LOD, LOQ, recovery, accuracy, precision and repeatability. Although triterpenoids contribute significantly to the bioactivity and pharmacology of *Bauhinia* and *Cecropia*, no study was reported so far for the quantitative determination of these compounds in these folk medicine plants. Based on the results, the species with the highest variety of compounds and concentration were *Bauhinia variegata* var. *variegata* and *Cecropia obtusa*. Triterpenes compounds such as  $\alpha$ -amirin,  $\beta$ -amirin, oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, lupeol and maslinic acid were found as major compounds in chloroform and ethyl acetate extracts as chemical markers. Furthermore, the presence of these triterpenic compounds in the extracts reinforces the pharmacological action, and the medical use of such plants in folk medicine. The present method developed can be used in research of chemical markers in medicinal plants as well as in the quality control of herbal medicines widely used in Brazil and in folk medicine.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian Nacional Research Council *CNPq* (processes 487028/2012-0 and 440132/2014-2). The authors thank to the Research Program for the SUS (PPSUS) with the support of FAPERGS and SES/RS. The authors also thank *Embrapa Amazônia Oriental* (Belém/PA) for supplying the medicinal plants studied.

#### REFERENCES

Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J.J., Uceda, M., Mesa, M.D., 2010. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2885-2890.

Ananias, D., Souza, E., Souza, P., Souza, A., Vitorino, M., Teixeira, G., FERREIRA, D., 2010. Climatologia da estrutura vertical da atmosfera em novembro para Belém-PA. *Revista Brasileira de Meteorologia* 25, 218-226.

ANVISA, A.N.d.V.S., 2003. n 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília.

Ávila, N.S., Capote, F.P., de Castro, M.L., 2007. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *Journal of Chromatography A* 1165, 158-165.

Bedner, M., Schantz, M.M., Sander, L.C., Sharpless, K.E., 2008. Development of liquid chromatographic methods for the determination of phytosterols in Standard Reference Materials containing saw palmetto. *Journal of Chromatography A* 1192, 74-80.

CHAUHAN, R., Ruby, K., DWIVEDI, J., 2013. Secondary metabolites found in *Bergenia* species: a compendious review. *reactions* 15, 17.

Cheng, X.R., Jin, H.Z., Qin, J.J., Fu, J.J., Zhang, W.D., 2011. Chemical constituents of plants from the genus *Geum*. *Chemistry & biodiversity* 8, 203-222.

Cheung, H.-Y., Zhang, Q.-F., 2008. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. *Journal of chromatography A* 1213, 231-238.

Claude, B., Morin, P., Lafosse, M., Andre, P., 2004. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1049, 37-42.

Coelho-Ferreira, M., 2009. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology* 126, 159-175.

Costa, G.M., Ortmann, C.F., Schenkel, E.P., Reginatto, F.H., 2011. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22, 1096-1102.

da Graça Rocha, G., Simoes, M., Lúcio, K.A., Oliveira, R.R., Kaplan, M.A.C., Gattass, C.R., 2007. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry* 15, 7355-7360.

da Silva Ferreira, D., Esperandim, V.R., Toldo, M.P.A., Saraiva, J., Cunha, W.R., De Albuquerque, S., 2010. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. *Parasitology research* 106, 985-989.

da Silva, K.A.S., Paszcuk, A.F., Passos, G.F., Silva, E.S., Bento, A.F., Meotti, F.C.,

Calixto, J.B., 2011. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *PAIN®* 152, 1872-1887.

da Silva, K.L., Filho, V., 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química nova* 25, 449-454.

Dal Prá, V., Dolwitsch, C.B., Lima, F.O., de Carvalho, C.A., Viana, C., do Nascimento, P.C., da Rosa, M.B., 2015. Ultrasound-Assisted Extraction and Biological Activities of Extracts of *Brassica oleracea* var. *capitata*. *Food Technology and Biotechnology* 53, 102.

de Figueredo, C.A., Gurgel, I.G.D., Gurgel Junior, G.D., 2014. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. *Physis: Revista de Saúde Coletiva* 24.



del Pilar Nicasio-Torres, M., Meckes-Fischer, M., Aguilar-Santamaría, L., Garduño-Ramírez, M.L., Chávez-Ávila, V.M., Cruz-Sosa, F., 2012. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta physiologiae plantarum* 34, 307-316.

Dias, M.O., Hamerski, L., Pinto, A.C., 2011. Semi-preparative separation of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin by high performance liquid chromatographic. *Química Nova* 34, 704-706.

Ghosh, J., Sil, P.C., 2013. Arjunolic acid: A new multifunctional therapeutic promise of alternative medicine. *Biochimie* 95, 1098-1109.

GIULIETTI, A.M., DE QUEIROZ, L.P., WANDERLEY, M.D.G.L., VAN DEN BERG, C., 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30, 374.

Gobo, L.A., Viana, C., Lameira, O.A., de Carvalho, L.M., 2016. A liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric (LC-APPI-MS/MS) method for the determination of triterpenoids in medicinal plant extracts. *Journal of Mass Spectrometry* 51, 558-565.

Holen, B., 1985. Rapid separation of free sterols by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62, 1344-1346.

Kong, L., Li, S., Liao, Q., Zhang, Y., Sun, R., Zhu, X., Zhang, Q., Wang, J., Wu, X., Fang, X., 2013. Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. *Antiviral research* 98, 44-53.

Kumari, A., Kakkar, P., 2012. Lupeol protects against acetaminophen-induced oxidative stress and cell death in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1781-1789.

Laszczyk, M.N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta medica* 75, 1549-1560.

Lesellier, E., Destandau, E., Grigoras, C., Fougère, L., Elfakir, C., 2012. Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector. *Journal of Chromatography A* 1268, 157-165.

Li, G.-L., You, J.-M., Song, C.-H., Xia, L., Zheng, J., Suo, Y.-R., 2011. Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 2972-2979.

Li, J.R., Li, M., Xia, B., Ding, L.S., Xu, H.X., Zhou, Y., 2013. Efficient optimization of ultra-high-performance supercritical fluid chromatographic separation of *Rosa sericea* by response surface methodology. *Journal of separation science* 36, 2114-2120.

Liu, H., Shi, Y., Wang, D., Yang, G., Yu, A., Zhang, H., 2003. MECC determination of oleanolic acid and ursolic acid isomers in *Ligustrum lucidum* Ait. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 32, 479-485.

Manna, P., Das, J., Ghosh, J., Sil, P.C., 2010. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 1465-1484.

Martelanc, M., Vovk, I., Simonovska, B., 2007. Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1164, 145-152.

Martelanc, M., Vovk, I., Simonovska, B., 2009. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216, 6662-6670.

Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M.-C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H.E., Mirata, M.A., Schrader, J., Ulber, R., 2011. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 46, 1-15.

Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., Méndez, J.J., 2007. Potencial antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Informacion tecnologica* 18, 65-74.

Pai, S.R., Nimbalkar, M.S., Pawar, N.V., Dixit, G.B., 2011. Optimization of extraction techniques and quantification of Betulinic Acid (BA) by RP-HPLC method from *Ancistrocladus heyneanus* Wall. *Ex Grah. Industrial Crops and Products* 34, 1458-1464.

Parekh, J., Karathia, N., Chanda, S., 2006. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. *African Journal of Biomedical Research* 9.

Pelaez, G.L.M., Sierra, J.A., Alzate, F., Holzgrabe, U., Ramirez-Pineda, J.R., 2013. Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 754-761.

Pizzolatti, M.G., Cunha Jr, A., Szpoganicz, B., Sousa, E.d., Braz-Filho, R., Schripsema, J., 2003. Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova* 26, 466-469.

Pollier, J., Goossens, A., 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 77, 10-15.

Quílez, A., Berenguer, B., Gilardoni, G., Souccar, C., De Mendonça, S., Oliveira, L., Martín-Calero, M., Vidari, G., 2010. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpubunya* Ruiz & Pav. *Journal of ethnopharmacology* 128, 583-589.

Raj Kapoor, B., Jayakar, B., Muruges, N., 2003. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 107-109.

Rao, Y.K., Fang, S.-H., Tzeng, Y.-M., 2008. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytotherapy research* 22, 957-962.

Razboršek, M.I., Vončina, D.B., Doleček, V., Vončina, E., 2007. Determination of Major Phenolic Acids, Phenolic Diterpenes and Triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Acta Chimica Slovenica* 54.

Reddy, M.V., Reddy, M.K., Gunasekar, D., Caux, C., Bodo, B., 2003. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry* 64, 879-882.

Rhourri-Frih, B., Chaimbault, P., Claude, B., Lamy, C., André, P., Lafosse, M., 2009. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. *Journal of mass spectrometry* 44, 71-80.

Rocha, A.D., de Oliveira, A.B., de Souza Filho, J.D., Lombardi, J.A., Braga, F.C., 2004. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research* 18, 463-467.

Romero, C., García, A., Medina, E., Ruíz-Méndez, M.V., de Castro, A., Brenes, M., 2010. Triterpenic acids in table olives. *Food chemistry* 118, 670-674.

Saleem, M., 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters* 285, 109-115.

Saleem, M., Maddodi, N., Zaid, M.A., Khan, N., bin Hafeez, B., Asim, M., Suh, Y., Yun, J.-M., Setaluri, V., Mukhtar, H., 2008. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. *Clinical Cancer Research* 14, 2119-2127.

Sánchez-Ávila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., de Castro, M.L., 2009. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta* 78, 40-48.

Sánchez, M., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Yáñez, T., Rodríguez, J.A., 2006. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro–in vivo relationships. *Life sciences* 79, 1349-1356.

Schneider, P., Hosseiny, S., Szczotka, M., Jordan, V., Schlitter, K., 2009. Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents. *Phytochemistry Letters* 2, 85-87.

Shanmugam, M.K., Dai, X., Kumar, A.P., Tan, B.K., Sethi, G., Bishayee, A., 2013. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. *Biochemical pharmacology* 85, 1579-1587.

Siddique, H.R., Saleem, M., 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life sciences* 88, 285-293.

Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J.-F., Larondelle, Y., 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 101, 1012-1018.

Slavin, M., Yu, L.L., 2012. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. *Food chemistry* 135, 2789-2795.

Somova, L., Nadar, A., Rammanan, P., Shode, F., 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine* 10, 115-121.

Szakiel, A., Pączkowski, C., Pensec, F., Bertsch, C., 2012. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochemistry Reviews* 11, 263-284.

Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A., 2014. Triterpene biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology* 65, 225-257.

Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Kocjan, R., Nowak, R., 2013. Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamii albi flos*. *Industrial Crops and Products* 44, 373-377.

Xu, X.-H., Su, Q., Zang, Z.-H., 2012. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2, 238-240.

Yang, G., Fen, W., Xiao, W., Sun, H., 2009. Study on determination of pentacyclic triterpenoids in *Chaenomeles* by HPLC-ELSD. *Journal of chromatographic science* 47, 718-722.

Zhang, Y.-Y., Zhang, C., Ren, R., Liu, R., 2012. Simultaneous determination of seven major triterpenoids in *Pyrola decorata* H. Andres by LC-MS method. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 67, 822-826.

## Supplementary data

### Distribution of triterpenic compounds in species of *Cecropia* and *Bauhinia* in different samples years

Marcella Emilia Petra Schmidt,<sup>a</sup> Lucas Paines Bressan,<sup>a</sup> Leandro M. de Carvalho,<sup>a,b</sup> Carine Viana,<sup>b</sup> Osmar Lameira<sup>c</sup> and Marcelo B. da Rosa<sup>\*a,b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>c</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 66095-100, Brazil

Figure S 1 – Molar absorptivity coefficient of triterpenes studied in this work

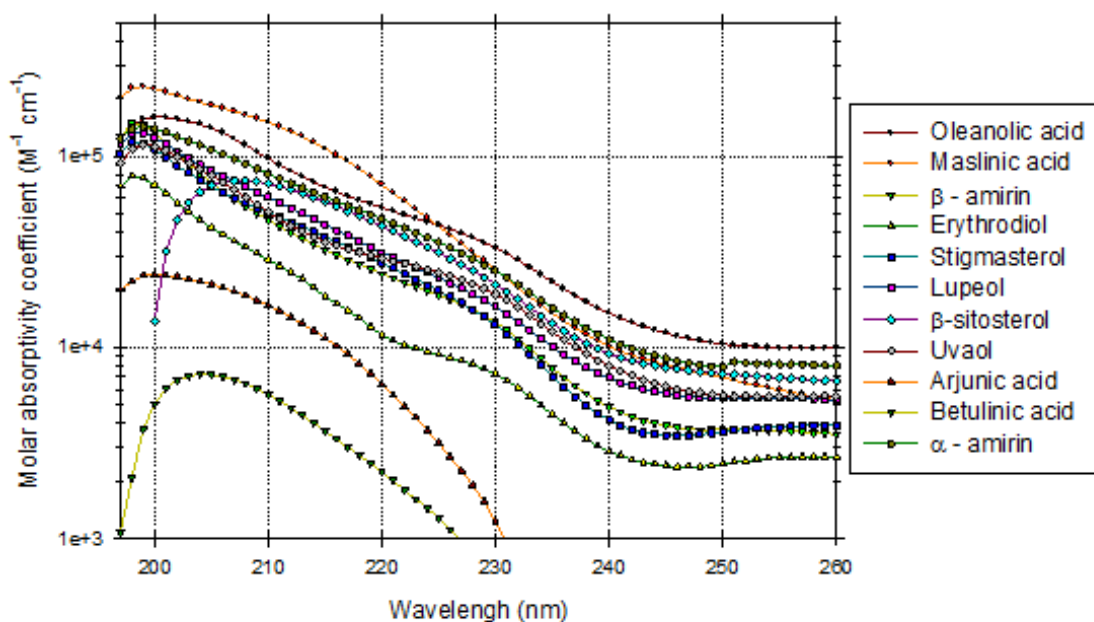


Figure S 2 - Chromatogram of a *Cecropia obtusa* sample with standard addition. Conditions as described under Materials and Methods.

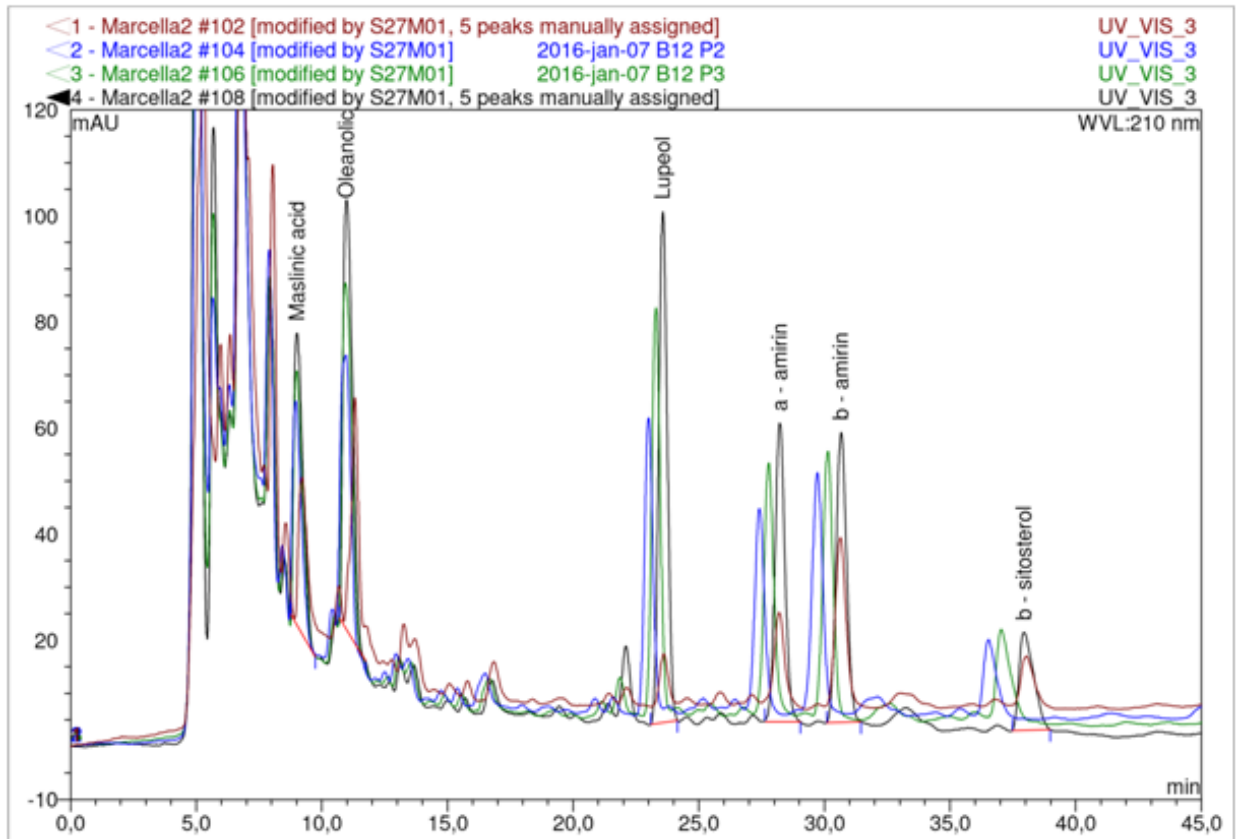




Figure S 3 - Chromatogram of a *Cecropia palmata* sample with standard addition. Conditions as described under Materials and Methods.

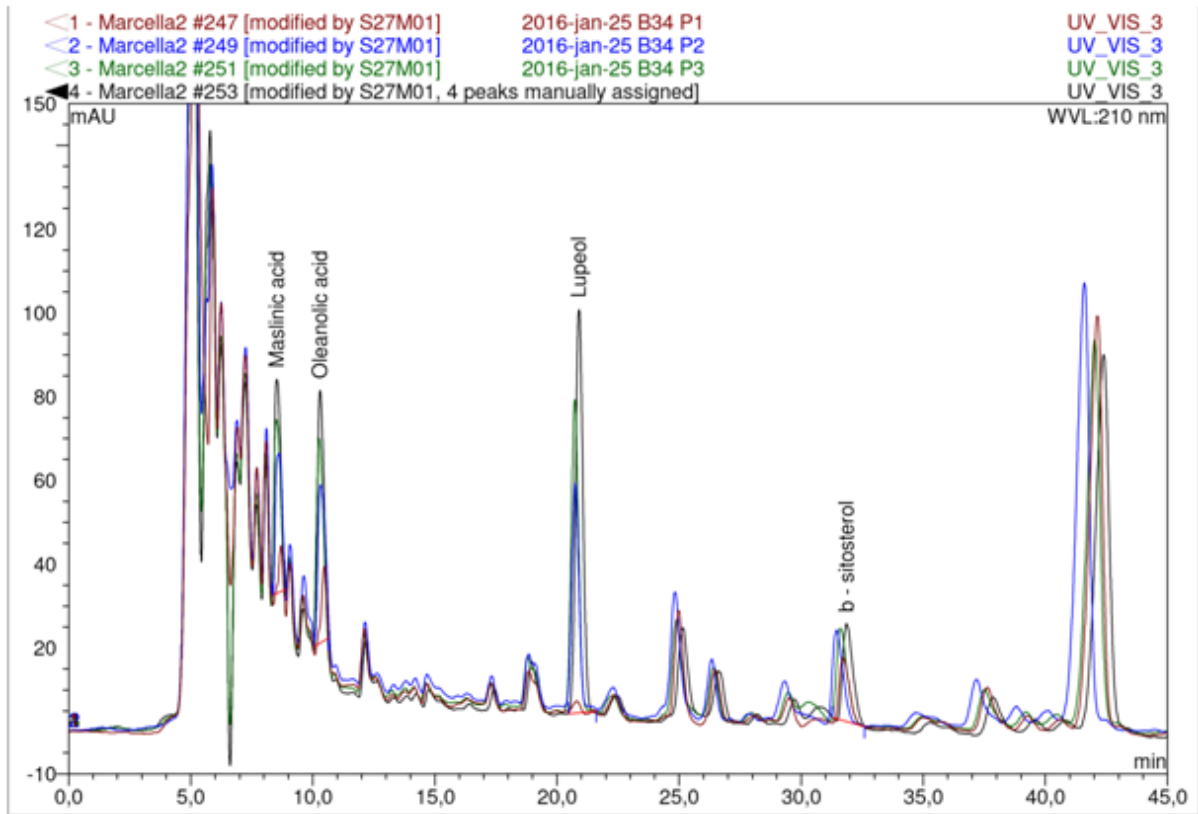


Figure S 4 - Chromatogram of a *Bauhinia variegata* var. *variegata* sample with standard addition. Conditions as described under Materials and Methods.

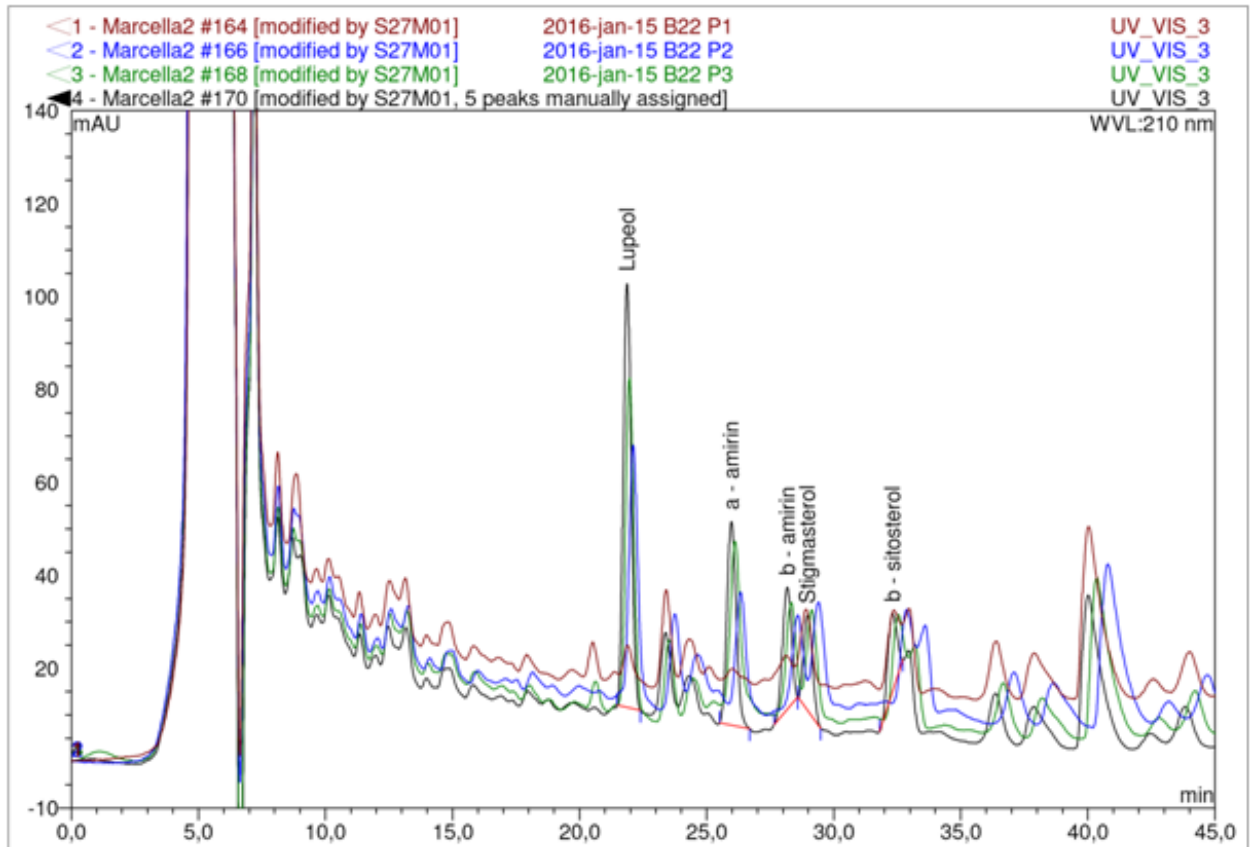
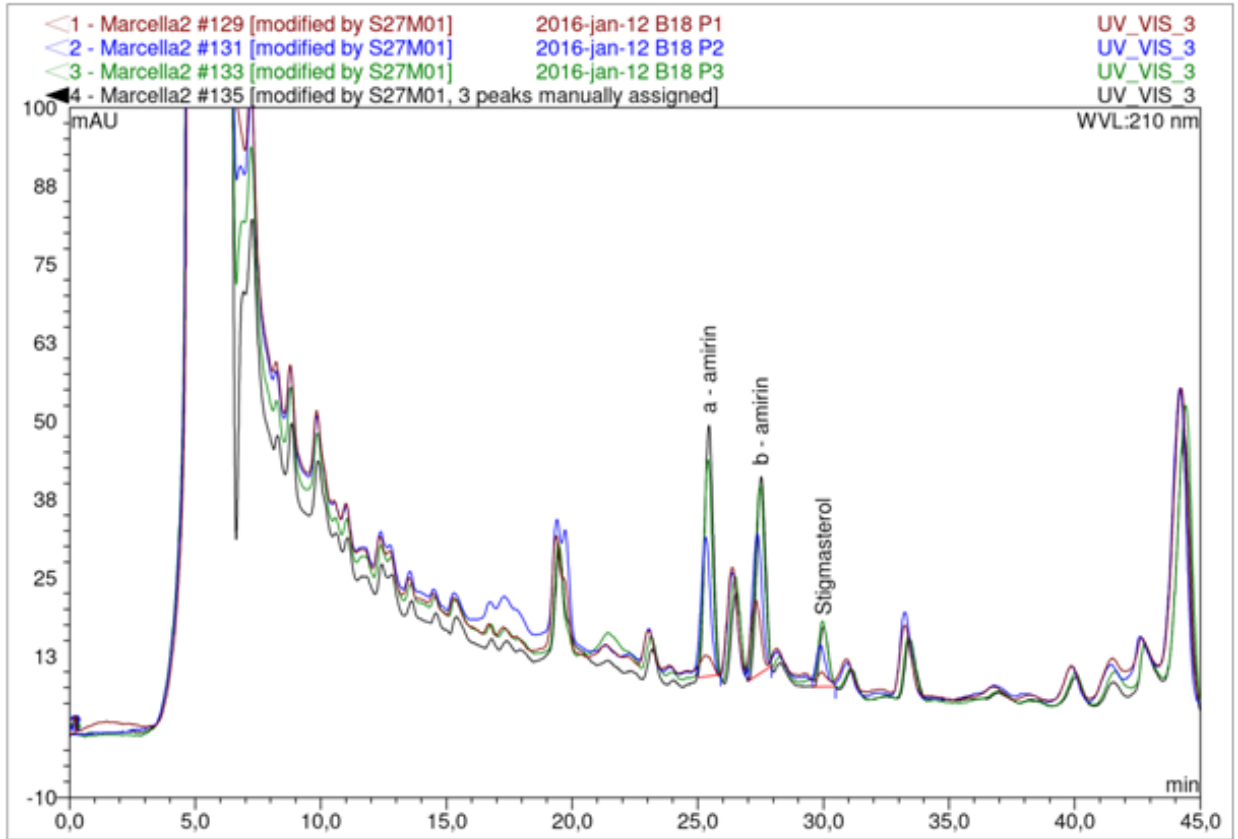


Figure S 5 - Chromatogram of a *Bauhinia variegata* var. *alboflava* sample with standard addition. Conditions as described under Materials and Methods.



## 4 CONCLUSÃO

- Este trabalho propõe uma metodologia analítica para determinação de 11 triterpenos por HPLC-UV com eluição isocrática e injeção manual;
- O método cromatográfico foi validado obtendo valores de seletividade, linearidade, LOD, LOQ, curva de calibração, exatidão e precisão dentro dos intervalos aceitos pela ANVISA RE nº 899/03
- Destaca-se o acetato de etila como melhor solvente extrator para ácido oleanólico, lupeol,  $\beta$  – amirina e  $\alpha$ –amirina nas amostras de *Bauhinia* estudadas.
- A distribuição dos triterpenos foi avaliada comparando-se *Cecropia obtusa*, *Cecropia palmata*, *Bauhinia variegata* var. *variegata* e *Bauhinia variegata* var. *alboflava*;
- As espécies *C.obtusa* e *Bauhinia variegata* apresentaram as maiores concentrações e variedade de compostos;
- Estigmasterol, ác. maslínico,  $\beta$ - sitosterol,  $\beta$ - amirina maior influência dos anos
- Identificação de marcadores químicos presentes nas espécies estudadas *Cecropia obtusa*, *Cecropia palmata*, *Bauhinia variegata* var. *variegata* e *Bauhinia variegata* var. *alboflava*.  $\alpha$  – amirina,  $\beta$  – amirina, ácido oleanólico (para *Cecropia*),  $\beta$  – sitosterol, estigmasterol e lupeol
- O método proposto pode ser utilizado, tanto na pesquisa de marcadores químicos de interesse farmacológico nas plantas medicinais, quanto no seu controle de qualidade.

## 5 REFERÊNCIAS

- AJILA, C. et al. Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 227-249, 2011.
- ANANIAS, D. et al. Climatologia da estrutura vertical da atmosfera em novembro para Belém-PA. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 25, n. 2, p. 218-226, 2010.
- ANGHEL, M. et al. Comparative study on the thermal behavior of two similar triterpenes from birch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 3, p. 1379-1385, 2013.
- AREND, D. P. Desenvolvimento de sistema microestruturado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Sneth (Embaúba). 2010.
- BACKHOUSE, N. et al. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 263-269, 2008.
- BEDNER, M. et al. Development of liquid chromatographic methods for the determination of phytosterols in Standard Reference Materials containing saw palmetto. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 1, p. 74-80, 2008.
- BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. 2010.
- BIANCO, E.; SANTOS, C. Substances isolated from *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. Caesalpinaceae) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 93-99, 2003.
- CHAUHAN, R.; RUBY, K. M.; DWIVEDI, J. Secondary metabolites found in *Bergenia* species: a compendious review. **Reactions**, v. 15, p. 17, 2013.
- CHENG, X. R. et al. Chemical constituents of plants from the genus *Geum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 2, p. 203-222, 2011.
- CHEUNG, H.-Y.; ZHANG, Q.-F. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, n. 2, p. 231-238, 2008.
- CLAUDE, B. et al. Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1, p. 37-42, 2004.
- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159-175, 2009.
- CORRÊA, A. **Política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. Ministério da Saúde, 2006.

DA PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076-1080, 2013.

DA SILVA, K. L.; FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

DAL PRÁ, V. et al. Ultrasound-Assisted Extraction and Biological Activities of Extracts of *Brassica oleracea* var. capitata. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 102, 2015.

DE CASTRO, M. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 321-334, 2007.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, 2014.

DE FREITAS, J. C.; FERNANDES, M. E. B. Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, P Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Plantas Mediciniais como recurso terapêutico em comunidade do entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil—metabólitos secundários e aspectos farmacológicos. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 17, 2011.

DEL PILAR NICASIO-TORRES, M. et al. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 1, p. 307-316, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Semi-preparative separation of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin by high performance liquid chromatographic. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

DO NASCIMENTO JÚNIOR, J. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, 2009.

DONFACK, J. H. et al. In vitro hepatoprotective and antioxidant activities of the crude extract and isolated compounds from *Irvingia gabonensis*. **Asian J Trad Med**, v. 5, n. 3, p. 79-88, 2010.

EGGERSDOFER, M. **Terpenes; Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, electronic release**: Weinheim: Wiley-VCH 2005.

FRANÇA, I. S. X. D. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

GHOSH, J.; SIL, P. C. Arjunolic acid: A new multifunctional therapeutic promise of alternative medicine. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1098-1109, 2013.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. 2005.

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

GUIDELINE, I. H. T. Validation of analytical procedures: text and methodology. **Q2 (R1)**, v. 1, 2005.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KUMARI, A.; KAKKAR, P. Lupeol protects against acetaminophen-induced oxidative stress and cell death in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1781-1789, 2012.

LAMEIRA, O.; OLIVEIRA, E.; BORGES, F. FENOLOGIA E ANÁLISE FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA EUPHORBIACEAE DO HORTO DE PLANTAS MEDICINAIS DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE), 2010, In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 9., 2009, São Paulo. Anais... São Paulo: Instituto de Botânica, 2009.

LEE, S. R. et al. Determination of phytosterols in *Oryza sativa* L. cultivars by liquid chromatography atmospheric chemical ionization time-of-flight mass spectrometer (LC-APCI-TOF-MS) coupled with a modified QuEChERS method. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 1, n. 01, p. 15, 2012.

LESELLIER, E. et al. Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, p. 157-165, 2012.

LI, G.-L. et al. Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2972-2979, 2011.

LI, J. R. et al. Efficient optimization of ultra-high-performance supercritical fluid chromatographic separation of *Rosa sericea* by response surface methodology. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 13, p. 2114-2120, 2013.

LUQUE-GARCIA, J.; DE CASTRO, M. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTELANC, M.; VOVK, I.; SIMONOVSKA, B. Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance

liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1, p. 145-152, 2007.

\_\_\_\_\_. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 38, p. 6662-6670, 2009.

MARTÍN, R. et al. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3741-3751, 2007.

MORE, G. et al. Antimicrobial constituents of *Artemisia afra* Jacq. ex Willd. against periodontal pathogens. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

MUFFLER, K. et al. Biotransformation of triterpenes. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 1-15, 2011.

MURILLO, E. et al. Potencial antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). **Informacion Tecnologica**, v. 18, n. 6, p. 65-74, 2007.

NUNES, F. I. A. **Caraterização estrutural de novos triterpenóides pentacíclicos**. 2013. Universidade de Coimbra 2013.

PAI, S. R. et al. Optimization of extraction techniques and quantification of Betulinic Acid (BA) by RP-HPLC method from *Ancistrocladus heyneanus* Wall. Ex Grah. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1458-1464, 2011.

PAREKH, J.; KARATHIA, N.; CHANDA, S. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 1, 2006.

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

QUÍLEZ, A. et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 583-589, 2010.

RAJKAPOOR, B.; JAYAKAR, B.; MURUGESH, N. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 107-109, 2003.

REDDY, M. V. et al. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 4, p. 879-882, 2003.



ROMERO, C. et al. Triterpenic acids in table olives. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 670-674, 2010.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109-115, 2009.

SALEEM, M. et al. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 7, p. 2119-2127, 2008.

SÁNCHEZ-ÁVILA, N. et al. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 40-48, 2009.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Liquid chromatography–mass spectrometry determination in plasma of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4375-4381, 2013.

SANTOS, F. S. D. D. Folk traditions in the use of medicinal plants in the Amazon. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 6, p. 919-939, 2000.

SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. **Life sciences**, v. 88, n. 7, p. 285-293, 2011.

SILVA, E. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SLAVIN, M.; YU, L. L. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2789-2795, 2012.

SOMOVA, L.; SHODE, F.; MIPANDO, M. Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2, p. 121-129, 2004.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

SZAKIEL, A. et al. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2-3, p. 263-284, 2012.

TAIZ, L. et al. **Plant physiology and development**. Sinauer Associates, Incorporated, 2010.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303-313, 2001.

WÓJCIAK-KOSIOR, M. et al. Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamii albi* flos. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 373-377, 2013.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 261-291, 2004.

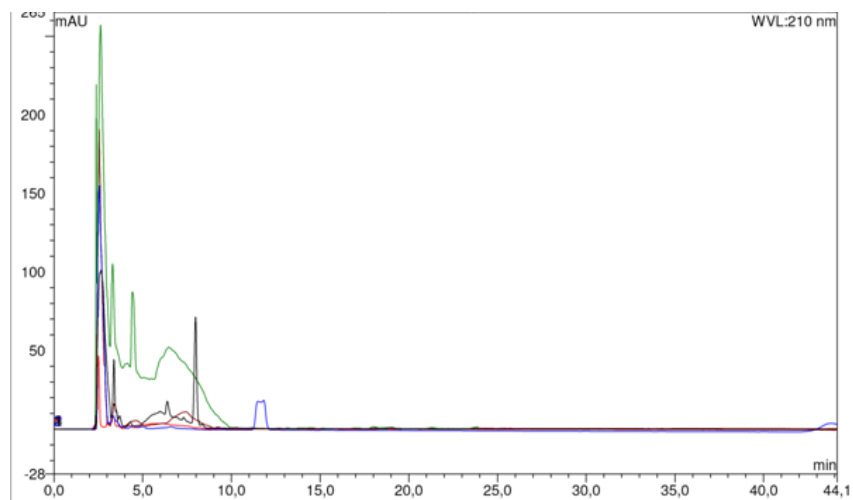
XU, X.-H.; SU, Q.; ZANG, Z.-H. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 238-240, 2012.

YAMASHITA, K. et al. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. **Clinica Chimica Acta**, v. 325, n. 1, p. 91-96, 2002.

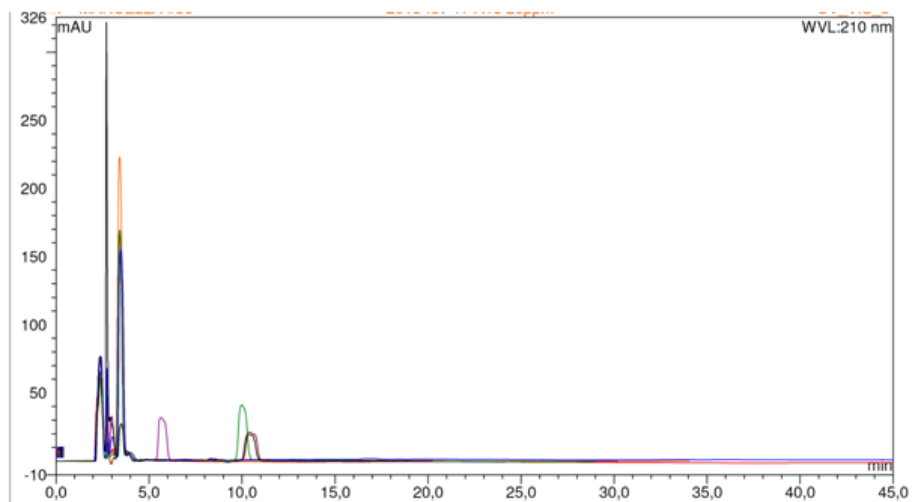
ZHANG, Y.-Y. et al. Simultaneous determination of seven major triterpenoids in *Pyrola decorata* H. Andres by LC-MS method. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 10, p. 822-826, 2012.

## APÊNDICE

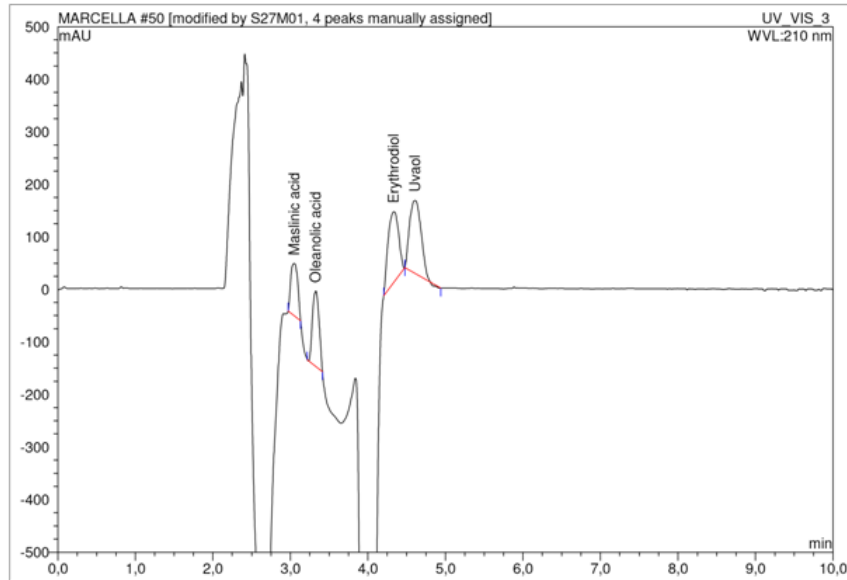
Apêndice 1 - Cromatograma da separação dos padrões de ácido maslínico, ácido oleanólico, eritrodíol,  $\beta$ -amirina e estigmasterol por HPLC-UV (10 mg L<sup>-1</sup>) em 210 nm. Fase móvel 80:20 MeOH/H<sub>2</sub>O 1.0 mL min<sup>-1</sup>.



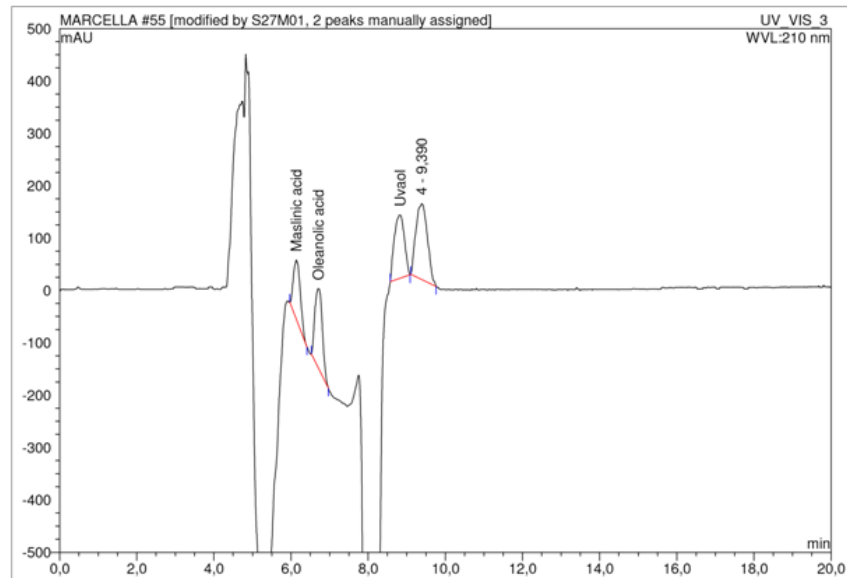
Apêndice 2 - Cromatograma da separação dos padrões de ácido arjúnico, ácido oleanólico, eritrodíol, uvaol,  $\beta$ -amirina e estigmasterol por HPLC-UV (10 mg L<sup>-1</sup>) em 210 nm. Fase móvel 90:10 MeOH/H<sub>2</sub>O 1.0 mL min<sup>-1</sup>.



Apêndice 3 – Cromatograma da separação dos padrões de ácido maslínico, ácido oleanólico, eritrodiol e uvaol por HPLC-UV (10 mg L<sup>-1</sup>) em 210 nm. Fase móvel 30:60:10 THF/ACN/H<sub>2</sub>O 1.0 mL min<sup>-1</sup>.



Apêndice 4 - Cromatograma da separação dos padrões de ácido maslínico, ácido oleanólico, eritrodiol e uvaol por HPLC-UV (10 mg L<sup>-1</sup>) em 210 nm. Fase móvel 30:60:10 THF/ACN/H<sub>2</sub>O 0.5 mL min<sup>-1</sup>



Apêndice 5 – Absortividade molar ( $\epsilon$  ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )) dos triterpenos em diferentes comprimentos de onda

Compounds	$\epsilon_{200\text{nm}}$	$\epsilon_{210\text{nm}}$	$\epsilon_{220\text{nm}}$
Oleanolic acid	$1.60 \cdot 10^5$	$9.72 \cdot 10^4$	$5.38 \cdot 10^4$
Maslinic acid	$2.25 \cdot 10^5$	$1.50 \cdot 10^5$	$7.08 \cdot 10^4$
$\beta$ – amirin	$1.34 \cdot 10^5$	$4.63 \cdot 10^4$	$2.42 \cdot 10^4$
Erythrodiol	$7.08 \cdot 10^4$	$2.87 \cdot 10^4$	$1.16 \cdot 10^4$
Stigmasterol	$1.09 \cdot 10^5$	$5.04 \cdot 10^4$	$2.76 \cdot 10^4$
Lupeol	$1.25 \cdot 10^5$	$6.08 \cdot 10^4$	$3.14 \cdot 10^4$
$\beta$ – sitosterol	$1.36 \cdot 10^4$	$7.18 \cdot 10^4$	$4.30 \cdot 10^4$
Uvaol	$1.13 \cdot 10^5$	$5.08 \cdot 10^4$	$2.93 \cdot 10^4$
Arjunic acid	$2.40 \cdot 10^4$	$1.65 \cdot 10^4$	$6.41 \cdot 10^3$
Betulinic acid	$5.05 \cdot 10^3$	$5.67 \cdot 10^3$	$2.23 \cdot 10^3$
$\alpha$ - amirin	$1.40 \cdot 10^5$	$8.09 \cdot 10^4$	$4.70 \cdot 10^4$