



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**ESTUDO BIOGUIADO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Maytenus*
ilicifolia FRENTE *Helicobacter pylori***

MARIANA NASCIMENTO DE PAULA

Maringá
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**ESTUDO BIOGUIADO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Maytenus*
ilicifolia FRENTE *Helicobacter pylori***

MARIANA NASCIMENTO DE PAULA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos) da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Paula, Mariana Nascimento de

P324e Estudo bioquímico de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* frente *Helicobacter pylori* / Mariana Nascimento de Paula. -- Maringá, 2018.

83 f. il., color, figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. *Maytenus ilicifolia*. 2. Espinheira santa. 3. *Helicobacter pylori*. 4. Capacidade antioxidante. 5. Taninos condensados. 6. Flavonoides glicosilados. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 22. ED.615.32

Jane Lessa Monção CRB 1173/9

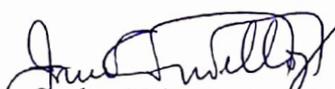
MARIANA NASCIMENTO DE PAULA

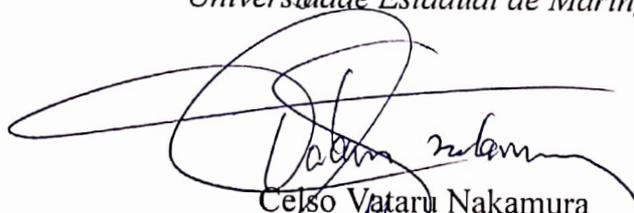
**ENSAIO BIOGUIADO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *MAYTENUS
ILICIFOLIA* FRENTE *HELICOBACTER PYLORI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 24 de janeiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA


João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá


Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves
Universidade Federal do Espírito Santos

A primeira etapa deste trabalho, caracterização e controle de qualidade do material vegetal, produção e partição dos extratos, foi realizada no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, bloco K80 sala 12, bloco T22. Os ensaios de avaliação anti-*H. pylori* foram realizados no Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais, Departamento de Farmácia, sala 7, na Universidade Federal do Espírito Santo (Profa. Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves). As análises da atividade antioxidante foram realizadas no laboratório Palafito, utilizando para leitura equipamentos do Laboratório Inovação Tecnológicas no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura). As análises de massas foram realizadas utilizando equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), da Universidade Estadual de Maringá.

Partes desse trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

Mariana Nascimento de Paula, Taisa Dalla Valle Rörig, Daniela Cristina de Medeiros, João Carlos Palazzo de Mello. Controle de qualidade farmacognóstico das folhas de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa). In: XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Belo Horizonte, MG – 21-24 de setembro de 2016.

Mariana Nascimento de Paula, Taisa Dalla Valle Rörig, Daniela Cristina de Medeiros, Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves, Rodrigo Rezende Kitagawa, João Carlos Palazzo de Mello. Atividade anti-*Helicobacter pylori* de extratos de *Maytenus ilicifolia*. In: XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia XVI Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica Curitiba, Brasil - 9-11 de agosto de 2017.

Mariana Nascimento de Paula, Taisa Dalla Valle Rörig, Daniela Cristina de Medeiros, João Carlos Palazzo de Mello. Antioxidant capacity evaluation of *Maytenus ilicifolia* extracts. In: VIII Seminário Anual do PCF. Maringá, PR – 22-24 de novembro de 2017.

Mariana Nascimento de Paula, Taisa Dalla Valle Rörig, Daniela Cristina de Medeiros, João Carlos Palazzo de Mello. Chemical characterization of semi-purified extracts of *Maytenus ilicifolia* by UHPLC-HRMS. In: VIII Seminário Anual do PCF. Maringá, PR – 22-24 de novembro de 2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais
e meus irmãos!*

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado a oportunidade e a capacidade de realizar esse sonho, e ter colocado na minha vida pessoas com quem dividir essa vitória.

Aos meus pais, por me incentivarem a crescer sempre, e estarem perto, mesmo longe, dando todo apoio e força que eu precisei.

A minha irmã Juliana, por me aguentar nos melhores e piores dias, pelas horas de conversas e até pelas brigas, obrigada por caminhar ao meu lado sempre.

Ao meu irmão Leonardo e minha cunhada Priscila por estarem sempre ao meu lado, nunca me deixando desanimar.

Aos meus avós e meu tio Eduardo, por simplesmente estarem ao meu lado nesses anos.

Ao meu orientador, que foi em vários momentos mais do que só o orientador, obrigada pelas conversas de ânimo, apoio e pela confiança em mim.

A Taísa Rörig, por ter sido minha companheira em todas as etapas desse trabalho, por ter dividido as tarefas, ter trabalhado junto, ter comemorado os acertos e rido dos erros, por ter ouvido minhas reclamações e pelo apoio constante, sem ela nada teria sido possível.

A Raquel Isolani, Fernanda Pilatti, Kariman Inácio e Larissa Valone, por me aguentarem todos esses anos, e por dividirem um pouco dos desesperos, do nervoso, das alegrias, principalmente nesse último ano, sem vocês tudo teria sido mais difícil.

A Daniela Medeiros que foi o suporte que precisei dentro e fora do laboratório em tantos momentos, obrigada por estar sempre aqui por mim.

A Luana Magri, que mesmo sempre reclamando fez os trabalhos no lab serem mais leves.

A todos os companheiros do Palafito, pela ajuda, conversas e parceria.

A Helena que além de secretária do programa se tornou uma amiga, obrigada pelos problemas resolvidos, pelas conversas cheias de risadas e por torcer sempre por mim.

Aos professores que contribuíram para realização desse trabalho: Profa. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves, Prof. Celso Vataru Nakamura, Me. Alexandre Avíncola.

“Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas, e fazendo coisas novas, porque somos curiosos e a curiosidade continua nos levando a novos caminhos.” Walt Disney



Mariana Nascimento de Paula nasceu em São Paulo, SP, em 16 de maio de 1991. Filha de Isaias de Paula e Sonia Nascimento de Paula. Se mudou com a família para o Paraná aos 4 anos de idade. Coursou o ensino fundamental e médio no Instituto Adventista Paranaense, onde se formou em 2008. Em 2011 ingressou no curso de Farmácia na Universidade Estadual de Maringá – UEM. Participou de projetos de iniciação científica: no Laboratório de Metabolismo Hepático, sob orientação do Dr. Adelar Bracht e no Laboratório de Fitoquímica e Tecnologia (LAFITEC), sob orientação da Dra. Izabel Cristina Piloto Ferreira. Participou de projetos de extensão na Farmácia de Dispensação e de Manipulação da UEM, sob orientação do Dr. Marco Antônio Costa e Profa. Danielle Rodrigues. Em 2013 fez estágio no laboratório de Biologia Farmacêutica Palafito sob a orientação do Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Em 2014 foi assessora de Qualidade da Teófilos Assessoria e Consultoria Farmacêutica. Foi estagiária de férias na Prati-Donaduzzi Medicamentos Genéricos nos anos de 2014 e 2015, atuando em 2015 no setor de Pesquisa e Desenvolvimento Analítico. Em 2015 fez o estágio vocacionado no laboratório Palafito, onde também desenvolveu seu trabalho de conclusão de curso.

RESUMO

DE PAULA, M.N. 2018. Estudo bioguiado de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* frente *Helicobacter pylori*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 83 p.

Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reissek, é membro da família Celastraceae, conhecida popularmente como espinheira santa, cancorosa, espinheira de deus, espinheira divina, quebrachilho, salva vidas, entre outros. No Brasil é muito utilizada para tratamento de úlceras gástricas, no entanto em comunidades indígenas e rurais é utilizada por apresentar propriedades analgésica, antitumoral, afrodisíaca, antiespasmódica, contraceptiva, antiulcerogênica, diurética e cicatrizante. Este trabalho teve como objetivo realizar a avaliação da qualidade da matéria prima vegetal, utilizando metodologias estabelecidas, com posterior preparo de extratos brutos e frações e avaliação de sua atividade frente *Helicobacter pylori* e antioxidante. Foram produzidos cinco extratos utilizando como líquido extrator em proporção v/v: água (EB 1); etanol: água 50:50 (EB 2); etanol: água 70:30 (EB 3); etanol: água 96:4 (EB 4) e acetona: água 7:3 (EB 5). Cada extrato foi particionado com acetato de etila e *n*-butanol, resultando em: cinco frações aquosas (FAQ 1-5); cinco frações acetato de etila (FAE 1-5) e cinco frações *n*-butanólica (FnB 1-5). Cada extrato e fração foi testado quanto sua capacidade antioxidante e sua atividade anti-*H. pylori*. O extrato que apresentou maior rendimento foi o EB 2 com 24,35% e concentração de epicatequina de 15,54 mg/g extrato. A melhor atividade anti-*H. pylori* foi observada no EB 5, FAE 2, FAE 5 e FnB 5, sendo que as CIM estavam entre 64-128 µg/mL. A maior taxa de inibição da enzima urease foi observada na FAE 2, FAE 5, FnB 2 e FnB 5 e esteve entre 37,27-47,08%. Para o ensaio de DPPH (IC₅₀) os resultados variaram entre 14,51-98,35 µg/mL, sendo que o melhor resultado foi da FAE 4. Para o ensaio de FRAP os resultados dados em TEAC foram semelhantes, variando de 0,77-5,40 mM de trolox/g de extrato, sendo o melhor resultado da FAE 2. Pela análise dos extratos por espectrometria de massas foi possível determinar a presença de compostos fenólicos como (epi)catequina, procianidinas B1 e B2 e flavonoides glicosilados. Assim foi possível a identificação de alguns compostos presentes nas folhas de *M. ilicifolia*, atestar a capacidade antioxidante de alguns extratos, bem como a atividade anti-*H. pylori*.

Palavras chave: *Maytenus ilicifolia*, espinheira santa, *Helicobacter pylori*, capacidade antioxidante, taninos condensados, flavonoides glicosilados.

ABSTRACT

DE PAULA, M.N. 2018. A bioguided study of leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* against *Helicobacter pylori*. Master's Dissertation, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringa. 83 p.

Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reissek, is a member of the Celastraceae family, popularly known as *espinheira santa*, *cancorosa*, *espinheira de deus*, *espinheira divina*, *quebrachilho*, *salva vidas*, among others. In Brazil it is widely used for the treatment of gastric ulcers, however in indigenous and rural communities it is used for its analgesic, antitumor, aphrodisiac, antispasmodic, contraceptive, antiulcerogenic, diuretic and healing properties. The objective of this work was to evaluate the quality of the vegetal raw material, using established methodologies, with subsequent preparation of crude extracts and fractions and evaluation of its activity against *Helicobacter pylori* and antioxidant capacity. Five extracts were produced using v/v proportion: water (EB 1); ethanol: water 50:50 (EB 2); ethanol: water 70:30 (EB 3); ethanol: water 96: 4 (EB 4) and acetone: water 7: 3 (EB 5). Each extract was partitioned with ethyl acetate and *n*-butanol, resulting in: five aqueous fractions (FAQ 1-5); five ethyl acetate fractions (FAE 1-5) and five *n*-butanolic fractions (FnB 1-5). Each extract and fraction were tested for its antioxidant capacity and anti-*H. pylori* activity. The extract with the highest yield was EB 2 with 24.35% and epicatechin concentration of 15.54 mg/g extract. The best anti-*H. pylori* activity was observed in EB 5, FAE 2, FAE 5 and FnB 5, with MICs being between 64-128 µg/mL. The highest inhibition rate of the urease enzyme was observed in FAE 2, FAE 5, FnB 2 and FnB 5 and was between 37.27 - 47.08%. For the DPPH assay (IC₅₀) the results ranged from 14.51 - 98.35 µg/mL, the best result being from FAE 4. For the FRAP assay the results given in TEAC were similar, ranging from 0.77 - 5.40 mM trolox/g extract, being the best result of FAE 2. The extracts analysis by mass spectrometry allowed to determine the presence of phenolic compounds as (epi)catechin, procyanidins B1 and B2, and glycosylated flavonoids. So, it was possible to identify some compounds present in the leaves of *M. ilicifolia*, attest to the antioxidant capacity of some extracts as well as the anti-*H. pylori* activity.

Keywords: *Maytenus ilicifolia*, *espinheira santa*, *Helicobacter pylori*, antioxidant capacity, condensed tannins, glycosylated flavonoids.

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss. a) Aspecto do ramo com flores; b) e c) Variações na morfologia foliar de um mesmo indivíduo (Carvalho-Okano, 1992).	23
Figura 2	Substâncias isoladas das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Epicatequina (A); epigalocatequina (B); catequina (C); epicatequina-(4 β →8)-catequina (D) e epicatequina-(4 β →8)- epicatequina (E).	27
Figura 3	Estrutura química dos ácidos gálico (A) e elágico (B).	31
Figura 4	Tanino hidrolisável com um poliol central: β -1,2,3,4,5-pentagaloi-D-glicose.	32
Figura 5	Estrutura de um tanino condensado. A) epicatequina; B) procianidina B1.	34
Figura 6	Coleta do material vegetal – <i>Maytenus ilicifolia</i> , Marialva, PR. (Foto: PAULA, M.N. 2016)	41
Figura 7	Perda de substâncias voláteis e/ou água de folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Folhas secas a 25 °C \pm 3 por 8 dias, sem presença de luminosidade, pesadas diariamente.	49
Figura 8	Perfil cromatográfico da FAE EB 2 (etanol: água 50:50) modo positivo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.	65
Figura 9	Perfil cromatográfico da FAE EB 2 (etanol: água 50:50) - modo negativo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.	66
Figura 10	Perfil cromatográfico da FnB EB 5 (acetona: água 7:3, v/v) - modo positivo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.	68
Figura 11	Perfil cromatográfico da FnB EB 5 (acetona: água 7:3, v/v) - modo negativo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1	Gradiente de eluição utilizado na separação dos constituintes dos extratos.	48
Tabela 2	Rendimento e concentração de epicatequina por CLAE dos extratos brutos de folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . EB 1 (extrato bruto aquoso), EB 2 (extrato bruto etanol: água 50:50), EB 3 (extrato bruto etanol: água 70:30), EB 4 (extrato bruto etanol: água 96:4) e EB 5 (extrato bruto acetona: água 7:3).	56
Tabela 3	Rendimento das frações obtidas a partir dos 5 extratos brutos de <i>Maytenus ilicifolia</i> (EB 1 (extrato bruto aquoso), EB 2 (extrato bruto etanol: água 50:50), EB 3 (extrato bruto etanol: água 70:30), EB 4 (extrato bruto etanol: água 96:4) e EB 5 (extrato bruto acetona: água 7:3)).	56
Tabela 4	Resultados da atividade anti- <i>H. pylori</i> (CIM ₅₀) dos extratos e frações semi purificadas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . EB 1 (extrato bruto aquoso), EB 2 (extrato bruto etanol: água 50:50), EB 3 (extrato bruto etanol: água 70:30), EB 4 (extrato bruto etanol: água 96:4) e EB 5 (extrato bruto acetona: água 7:3).	57
Tabela 5	Resultados da inibição da enzima urease dos extratos e frações semi purificadas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . EB 1 (extrato bruto aquoso), EB 2 (extrato bruto etanol: água 50:50), EB 3 (extrato bruto etanol: água 70:30), EB 4 (extrato bruto etanol: água 96:4) e EB 5 (extrato bruto acetona: água 7:3).	60
Tabela 6	Capacidade antioxidante para o método de DPPH de extratos e frações semi purificadas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . EB 2 (extrato bruto etanol: água 50:50), EB 3 (extrato bruto etanol: água 70:30), EB 4 (extrato bruto etanol: água 96:4) e EB 5 (extrato bruto acetona: água 7:3).	62
Tabela 7	Capacidade antioxidante para o método de FRAP de extratos e frações semi purificadas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . EB 2 (extrato bruto etanol: água 50:50), EB 3 (extrato bruto etanol: água 70:30), EB 4 (extrato bruto etanol: água 96:4) e EB 5 (extrato bruto acetona: água 7:3).	64
Tabela 8	Identificação dos compostos da FAE EB 2 (etanol: água 50:50, v/v) detectados por UHPLC-HRMS – modo positivo	65
Tabela 9	Identificação dos compostos da FAE EB 2 (etanol: água 50:50, v/v) detectados por UHPLC-HRMS – modo negativo	67
Tabela 10	Identificação dos compostos da F _n B EB 5 (acetona: água 7:3, v/v) detectados por UHPLC-HRMS – modo positivo	68
Tabela 11	Identificação dos compostos da F _n B EB 5 (acetona: água 7:3, v/v) detectados por UHPLC-HRMS – modo negativo	69

Lista de Fluxogramas

Fluxograma 1	Preparação de extratos e frações semi purificadas de folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	51
Fluxograma 2	Visão geral do trabalho realizado, com rendimentos do extrato e frações.	53

Lista de Abreviações

Abs – Absorvância

ABTS – (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

CIM – Concentração Mínima Inibitória

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute

CV – Coeficiente de Variação

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picridrazila

DVP – Droga vegetal pulverizada

EB – Extrato Bruto

EB 1 – Extrato Bruto produzido com água destilada

EB 2 – Extrato Bruto produzido com etanol: água 50:50

EB 3 – Extrato Bruto produzido com etanol: água 70:30

EB 4 – Extrato Bruto produzido com etanol: água 96:4

EB 5 – Extrato Bruto produzido com acetona: água 7:3

FAE – Fração Acetato de Etila

FAQ – Fração Aquosa

FD – Fator de Diluição

F_nB – Fração *n*-butanólica

FRAP – Poder Antioxidante de Redução do Ferro

IC₅₀ – Concentração Inibitória Máxima para Inibir 50%

m/v – Massa/volume

OMS – Organização Mundial de Saúde

p/v – Peso/volume

PT – Polifenóis totais

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SPE – Cartucho de extração em Fase Sólida

TE – Teor de Extrativos

UHPLC-HRMS – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas

UV/Vis – Luz ultravioleta/visível

v/v – Volume/volume

Sumário

1	Introdução	16
2	Revisão Bibliográfica.....	20
2.1	Sistemática Vegetal	20
2.1.1	Família Celastraceae R. Br.....	20
2.1.2	Gênero <i>Maytenus</i>	21
2.1.3	Características do Gênero <i>Maytenus</i>	21
2.1.4	Características da Espécie <i>Maytenus ilicifolia</i>	22
2.2	Aspectos químicos do Gênero <i>Maytenus</i>	23
2.3	Aspectos químicos da Espécie <i>Maytenus ilicifolia</i>	24
2.4	Propriedades do Gênero	25
2.4.1	Atividade Farmacológica do Gênero <i>Maytenus</i>	25
2.4.2	Atividade Farmacológica da Espécie <i>Maytenus ilicifolia</i>	26
2.4.3	Toxicidade.....	28
2.5	Compostos fenólicos	30
2.5.1	Propriedades Biológicas dos Compostos Fenólicos.....	32
2.6	Taninos.....	33
2.6.1	Propriedades Biológicas dos Taninos.....	35
2.7	<i>Helicobacter pylori</i>	36
3	Objetivos	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos.....	40
4	Materiais e Métodos	40
4.1	Material Vegetal	40
4.2	Desengorduramento das folhas	41
4.3	Controle de qualidade da Droga Vegetal	41
4.3.1	Análises Físico-Químicas.....	41
4.3.1.1	Perda por secagem.....	41
4.3.1.2	Perda por dessecação.....	42
4.3.1.3	Teor de extrativos.....	42
4.3.1.4	Doseamento de Polifenóis Totais	42
4.4	Preparação de Extratos Brutos e Frações	43
4.4.1	Extrato bruto (EB).....	43
4.4.2	Fração acetato de etila (FAE), fração <i>n</i> -butanólica (FnB) e fração aquosa (FAQ)	43
4.5	Análise Quantitativa.....	44
4.5.1	Determinação de epicatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	44

4.6	Avaliação da atividade anti <i>Helicobacter pylori</i>	44
4.6.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)	44
4.6.1.1	Antimicrobianos Padrões	44
4.6.1.2	Preparação dos Extratos e Frações	45
4.6.1.3	Micro-organismos	45
4.6.1.4	Desenvolvimento.....	45
4.6.2	Determinação da urease	46
4.7	Ensaio Antioxidantes	46
4.7.1	DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	46
4.7.2	FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro).....	47
4.8	Caracterização química de extratos semi purificados de <i>Maytenus ilicifolia</i> por UHPLC- HRMS	47
5	Resultados e Discussão	48
5.1	Controle de Qualidade da Droga Vegetal.....	48
5.1.1	Análises Físico Químicas.....	49
5.1.1.1	Perda por secagem.....	49
5.1.1.2	Perda por dessecação.....	49
5.1.1.3	Teor de extrativos	50
5.1.1.4	Teor de Polifenóis Totais	50
5.2	Preparação de Extratos Brutos e Frações	51
5.2.1	Extrato bruto (EB).....	55
5.2.2	Fração acetato de etila (FAE), fração <i>n</i> -butanólica (FnB) e fração aquosa (FAQ)	56
5.3	Avaliação da Atividade Anti- <i>Helicobacter pylori</i>	56
5.3.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)	56
5.3.2	Determinação da inibição da enzima urease	60
5.4	Ensaio Antioxidantes	61
5.4.1	DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	61
5.4.2	FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro).....	64
5.5	Caracterização química de extratos semi purificados de <i>Maytenus ilicifolia</i> por UHPLC- HRMS	65
6	Conclusão.....	71
	REFERÊNCIAS	72

1 Introdução

Uma das formas mais antigas da prática medicinal é a utilização de plantas, para tratar, curar e prevenir doenças. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as populações de países em desenvolvimento ainda necessitam da medicina tradicional, sendo plantas medicinais e ervas medicinais para atenção primária (WHO, 1998; Brasil, 2006).

Desde a existências de seres vivos, o ser humano tem usado a natureza para suprir suas necessidades mais básicas, desde alimentação até cuidados com a saúde. Sendo assim as plantas têm formado a base dos tradicionais sistemas médicos, desempenhando até hoje um papel essencial no sistema de saúde de diversas culturas, sendo que em 1985 a OMS estimou que aproximadamente 65% da população mundial utilizava plantas ou seus derivados no cuidado primário à saúde. Atualmente é necessário com urgência novos fármacos para tratar doenças como câncer, HIV, doenças infecciosas, para isso é preciso uma exploração vigorosa dos recursos que estão disponíveis, e as plantas são claramente de vital importância nessa busca. Apesar da diversidade de produtos naturais existente uma pequena quantidade foi estudada, sendo estimado que apenas 6% das espécies de plantas superiores foram estudadas sistematicamente, e 15% do ponto de vista fotoquímico (Farnsworth *et al.*, 1985; Fabricant e Farnsworth, 2001; Raskin *et al.*, 2002; Cragg e Newman, 2013).

Um dos principais recursos para a descoberta de novos fármacos a partir de plantas medicinais é a existência de informações etnofarmacológicas, que podem fornecer subsídio para sugestão dos compostos terapeuticamente eficazes (Atanasov *et al.*, 2015).

Quando estudam as plantas temos que ter em mente a biodiversidade existente no mundo. Estão registradas mais de um milhão de nomes e aproximadamente 350 mil espécies aceitas, sendo o grupo das angiospermas o que apresenta maior riqueza. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, sendo estimada uma biota de 170 a 210 mil espécies, cerca de 13% da riqueza mundial. É reconhecida a ocorrência de 34.916 espécies, sendo 19.187 endêmicas do Brasil. As angiospermas apresentam cerca de 32 mil espécies, sendo que 19 mil (57%) crescem exclusivamente em território brasileiro (Stehmann e Sobral, 2017).

A procura por drogas vegetais como recurso terapêutico tem aumentado nos últimos anos. Os possíveis fatores que tem motivado essa procura são: a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional; os efeitos adversos e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos; a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (Rates, 2001).

Maciel *et al.* (2002) observaram que ainda hoje nas regiões mais pobres do país, e também nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas

medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação dos benefícios terapêuticos dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Veiga Junior e colaboradores apontaram que no Brasil as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (Veiga Junior *et al.*, 2005).

Depois da década de 1980 diversas portarias, resoluções e relatórios foram criados a fim de fortalecer a implementação da Fitoterapia no Sistema Único de Saúde, o qual possui hoje uma relação de fitoterápicos ofertados pelo sistema.

Visando proporcionar melhorias na qualidade de vida da população brasileira, em 2006, foi instituída, por meio do decreto nº 5.813 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006). O objetivo principal deste decreto foi “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” por meio de diversas ações. Dentre elas tem-se: “a ampliação das opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais”.

Em 2009 foi publicada pelo Ministério da Saúde a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), contendo plantas medicinais potenciais para geração de produtos de interesse ao SUS. Essa relação tem por finalidade orientar estudos e pesquisas que possam fundamentar a elaboração de um conjunto de plantas e fitoterápicos que possam ser usados pela população sem risco à saúde (Brasil, 2017a).

Em 2012 alguns medicamentos fitoterápicos foram incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Atualmente são 12 medicamentos fitoterápicos, dentre as espécies presentes encontra-se a *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, que é indicada como coadjuvante no tratamento de gastrite e úlcera gastroduodenal e sintomas de dispepsia (Brasil, 2017b).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais, e elas fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas. Nos últimos anos, no entanto, a importância dos organismos vegetais como fontes produtivas de substâncias anticancerígenas, antimicrobianas e outras atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos (Braz Filho, 2010).

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek (Celastraceae) é uma planta nativa da floresta tropical Atlântica. No Brasil essa espécie é encontrada predominantemente na região sul, no interior de matas nativas e ciliares, sendo encontrada também nos países vizinhos Paraguai, Uruguai e Argentina (Carvalho-Okano, 1992; Magalhães, 2002). É conhecida popularmente por “espinheira-santa”, “cancerosa” e também “cancerosa-de-sete-espinhos”, entre outros (Jorge *et al.*, 2004).

Comunidades indígenas e rurais presentes nas áreas de ocorrência da espécie fazem o uso medicinal da planta como analgésica, antiúlcera, antitumor, afrodisíaca, antiespasmódica, contraceptiva, antiulcerogênica, diurética e cicatrizante. Mesmo tendo seu uso já consagrado foi somente a partir de 1988 que as propriedades medicinais de *M. ilicifolia* foram comprovadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais, especialmente gastrite e úlceras. E assim a partir de 2009, foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Mossi *et al.*, 2009; Mazza *et al.*, 2011).

Por meio da extração das folhas de *M. ilicifolia* com alta pressão de CO₂ (Fluido Super Crítico) foram separados diferentes compostos como acetato de geranila, fitol, ácido dodecanóico, esqualeno, vitamina E e estigmasterol e triterpenos (Mossi *et al.*, 2004).

Diversos estudos demonstraram a ocorrência de esteroides, triterpenos, taninos condensados e flavonoides, o que auxilia na justificativa do uso de algumas espécies de *Maytenus* como droga anti-inflamatória e antiulcerogênica (Queiroga *et al.*, 2000; Jorge *et al.*, 2004; Estevam *et al.*, 2009). A presença de taninos explica sua atividade antioxidante, através da captura de radicais livres, e também pode se dar pela ação quelante, evitando a oxidação e formação de radicais livres (Ho *et al.*, 1992; Melo *et al.*, 2001; Pessuto *et al.*, 2009).

Em estudos realizados por Annuk e colaboradores (1999) foi demonstrado que os taninos derivados do ácido gálico têm capacidade de agir na parede celular de bactérias tendo assim constatada sua ação antimicrobiana. Mabe e colaboradores (1999) demonstraram que catequinas apresentam ação antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, além disso, podem apresentar efeito terapêutico frente às lesões da mucosa gástrica induzida pela bactéria.

Helicobacter pylori tem sido associada a doenças como úlcera gástrica e carcinoma gástrico, a segunda causa mais comum de câncer no mundo, sendo considerada um carcinógeno humano. Juntos a úlcera péptica e o câncer gástrico causam aproximadamente um milhão de mortes por ano em todo o mundo. A infecção por esta bactéria estima-se pode ocorrer em mais da metade da população mundial, sendo responsável por mais de 75% de todos os casos de câncer gástrico (Parkin, 2004; De Martel *et al.*, 2012; Eusebi *et al.*, 2014; Peleteiro *et al.*, 2014).

Assim, estudos com esta espécie vegetal podem contribuir para o estabelecimento e ampliação do uso correto, além de motivar o uso racional de plantas com atividade terapêutica como a espinheira-santa, além de ser uma alternativa para o tratamento da infecção causada pela bactéria *H. pylori*. Levando em consideração a atividade já comprovada da *M. ilicifolia* em úlceras gástricas e sua relação direta com a infecção por *H. pylori* foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana de diversos extratos de *M. ilicifolia* frente à bactéria *H. pylori* pelo teste de microdiluição e a avaliação da capacidade desses extratos inibirem a enzima urease.

Dessa forma, este trabalho propôs a preparação de diferentes extratos, e obtenção de suas frações, para avaliação da atividade anti-*H. pylori* e antioxidante, bem como a purificação desses

extratos por meio de métodos cromatográficos para a caracterização de substâncias com potencial atividade.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Sistemática Vegetal

2.1.1 Família Celastraceae R. Br.

A família Celastraceae é constituída de 87 gêneros incluindo 3940 espécies distribuídas nas regiões tropical e subtropical. Dentre estas espécies 1168 são aceitas, e 1431 são sinónimas (List, 2017). No Brasil encontram-se 19 gêneros e 141 espécies aceitas (Brasil, F. D., 2017).

As plantas que constituem o gênero apresentam porte lenhosos, arbustivos ou arbóreas com folhas inteiras, sendo sua disposição alterna ou oposta, sem estípulas, podendo se apresentar sem folhas. Quando presentes, as flores são pequenas em geral pentâmeras ou tetrâmeras, diclamídeas, hermafroditas ou unissexuais, de simetria radial. Fruto seco, capsular ou baciforme (Joly, 1998).

A família Celastraceae encontra-se presente predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, mas estende-se moderadamente para regiões temperadas. Elas crescem em uma grande variedade de habitats, incluindo floresta, floresta tropical, pastagem, dunas costeiras e áreas muito secas (Heywood *et al.*, 2011).

Os gêneros da família Celastraceae são muito diversificados, os táxons com a maioria das espécies são: *Maytenus* com 225, distribuídas na região tropical e subtropical; *Salacia* com 200 espécies; *Euonymus* apresentando 176 espécies, distribuídas na região do Himalaia, China e Japão; *Hippocratea* contendo 120 espécies espalhadas pela região tropical, América do Sul, México e Sul dos Estados Unidos (Muñoz *et al.*, 1996).

Souza e Lorenzi (2005) afirmam que “o interesse econômico das Celastraceae se concentra no uso de algumas espécies como medicinais ou ornamentais, sendo os principais representantes a espinheira-santa (*Maytenus* spp.) e o evônimo (*Euonymus japonicus* Thunb.), respectivamente”. Há quem faça o uso de folhas e galhos de *Catha edulis* (Vahl) Endl. mastigadas ou preparadas como chá devido sua propriedade estimulante. A maior concentração das substâncias ativas dessa espécie pode ser encontrada nas folhas e galhos jovens. Espécies de *Elaeodendron* Jacq., *Euonymus* L., *Gymnosporia* (Wight & Arn.) Benth. & Hook. f., *Hippocratea* L., *Maytenus* Juss. e *Salacia* L. são utilizadas para produção de extratos usados na medicina tradicional (Simmons, 2004).

De acordo com Furlan (1985, apud OKANO, 1992) 21 espécies haviam sido quimicamente estudadas, sendo apenas seis componentes da flora brasileira. Dentre todos os gêneros da família, quatro são os representantes brasileiros: *Maytenus*, *Goupia* Reiss., *Austroplenkia* Lund. e *Fraunhoferia* Mart. (Carvalho-Okano, 1992).

Todos os membros da família Celastraceae apresentam em suas folhas e cascas o acúmulo de dulcitol, esta característica pode ser considerada uma característica bioquímica marcante da família. Os dois alcaloides, (L(S)-(-)-alfa-aminopropiofenona (catinona) e *d*-norpseudoefedrina (catina)), são

encontrados em folhas jovens e galhos de *C. edulis*. Esses compostos atuam como estimulantes do sistema nervoso central, semelhante às anfetaminas. Dos gêneros *Gymnosporia*, *Maytenus* e *Putterlickia* Endl., foram isolados maitansina e maiteína que demonstraram atividade inibitória em células tumorais e foram investigadas em ensaios clínicos (Simmons, 2004).

2.1.2 Gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* foi descrito pela primeira vez em 1725 por Feullée sob o nome de Mayten (Carvalho-Okano, 1992). Foi somente em 1782 que Molina estabeleceu o gênero *Maytenus* baseando-se na espécie *Maytenus boaria* Molina, do Chile (Molina, 1951 apud Louteig; O'Donnell, 1955 apud Carvalho-Okano, 1992).

Em 1841 Martius descreveu para a flora brasileira oito espécies de *Maytenus*: *M. brasiliensis* Mart., *M. macrophylla* Mart., *M. nítida* Mart., *M. obtusifolia* Mart., *M. aquifolium* Mart., *M. rigida* Mart., *M. dasyclados* Mart. e *M. gonoclada* Mart. (Carvalho-Okano, 1992).

Foi publicado um estudo global sobre a taxonomia do gênero *Maytenus* no Brasil por Reissek (1861) fornecendo descrições detalhadas sobre o gênero e 51 espécies; apresentou ainda as espécies reunidas em grupos e subgrupos, baseando-se em características foliares (Carvalho-Okano, 1992).

Okano (1992) afirma que “a autoria do gênero é atribuída a diferentes autores”, mas “de acordo com o Index Genericorum, Molina é considerado o autor do gênero. [...] De acordo com o Artigo 47 do Código Internacional da Nomenclatura Botânica a citação do nome genérico é *Maytenus* Mol. Emend. Mol.”.

O gênero *Maytenus* é composto por árvores, subarbustos e arbustos, cujas folhas são alternadas, inteiras ou serrilhadas. São 446 espécies sendo 162 espécies aceitas e 88 sinônimos (List, 2017). Esse gênero é encontrado nas regiões tropicais e subtropicais em florestas úmidas ou matas secas (Simmons, 2004).

No Brasil atualmente são aceitas 49 espécies, sendo 31 endêmicas e 31 sinonímias. No Brasil o gênero *Maytenus* está presente nos domínios fitogeográficos: Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado Central, Mata Atlântica e Pampa. Sua ocorrência foi confirmada em estados de todas as regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul) (Brasil, F. D., 2017).

2.1.3 Características do Gênero *Maytenus*

No gênero *Maytenus* são encontrados representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos com porte variando entre 1,5–8 metros, e árvores que podem chegar até 20 metros (Pessuto, 2006).

Os ramos são eretos, raramente escandente, glabros, raramente pubescente. As folhas são alternadas, inteiras ou serrilhadas. Inflorescência axilar, fasciculada, cimosas ou menos frequente racemosa, ou flores isoladas. Flores bissexuadas ou unissexuadas, raramente polígamas ou dioicas; disco

bem desenvolvido, de consistência carnosa. Anteras longitudinalmente deiscentes, voltadas para dentro. Ovários 2-3 locular, óvulos eretos, 1-2 por lóculo. Cápsula esférica ou ovoide, coriácea, loculicida; de 1-6 sementes elipsoides ou ovoides, albuminosa, com arilo basal envolvendo a semente (Simmons, 2004).

As formas e dimensões das lâminas foliares podem ser variadas, desde suborbiculares até cordadas, ovais, obovais, elípticas, estreitamente elípticas e oblongas. Sendo que na maioria das espécies a lâmina se apresenta plana (Pessuto, 2006).

2.1.4 Características da Espécie *Maytenus ilicifolia*

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. é conhecida no Brasil popularmente como cancorosa, congorça, erva-cancerosa, espinheira de deus, espinheira divina, quebrachilho, salva vidas, sombra de touro e espinheira santa (Longhi, 1995). Esta espécie apresenta como sinônimos *Celestrus spinifolius* Larrañaga, *M. aquifolium* Mart., *M. hasseleri* Briq., *M. pilcomayensis* Briq (List, 2017).

Okano (1992) descreveu a espécie como um subarbusto ou árvore, com altura de cerca de 5 m. Os ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. Folhas congestas, coriáceas, glabras; pecíolo com 0,2-0,5 cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 2,2-8,9 cm de comprimento e 1,1-3,0 cm de largura; nervuras proeminentes na face abaxial; forma elíptica ou estreitamente elíptica; base aguda e obtusa; ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; margem inteira ou com espinhos em número de um a vários, distribuídos regular e irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos (Figura 1). Inflorescências em fascículos multifloros. Pedicelos florais com 0,2-0,5 cm de comprimento. Sépalas ovais, inteiras, com cerca de 0,22 cm de comprimento e 0,2 cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma captado, séssil ou com estilete distinto; ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnoso. Fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho alaranjada (Carvalho-Okano, 1992).

Sua ocorrência é constatada nos três estados da região sul do país (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul da região centro-oeste e no estado de São Paulo na região sudeste. O domínio fitogeográfico predominante nessas regiões é o cerrado, mata atlântica e pampa (Brasil, F. D., 2017).

M. ilicifolia é mais encontrada no interior de matas nativas e em matas ciliares, devido sua preferência por solos argilosos, bem drenados e com alto teor de matéria orgânica (>2%) (Magalhães, 2002).

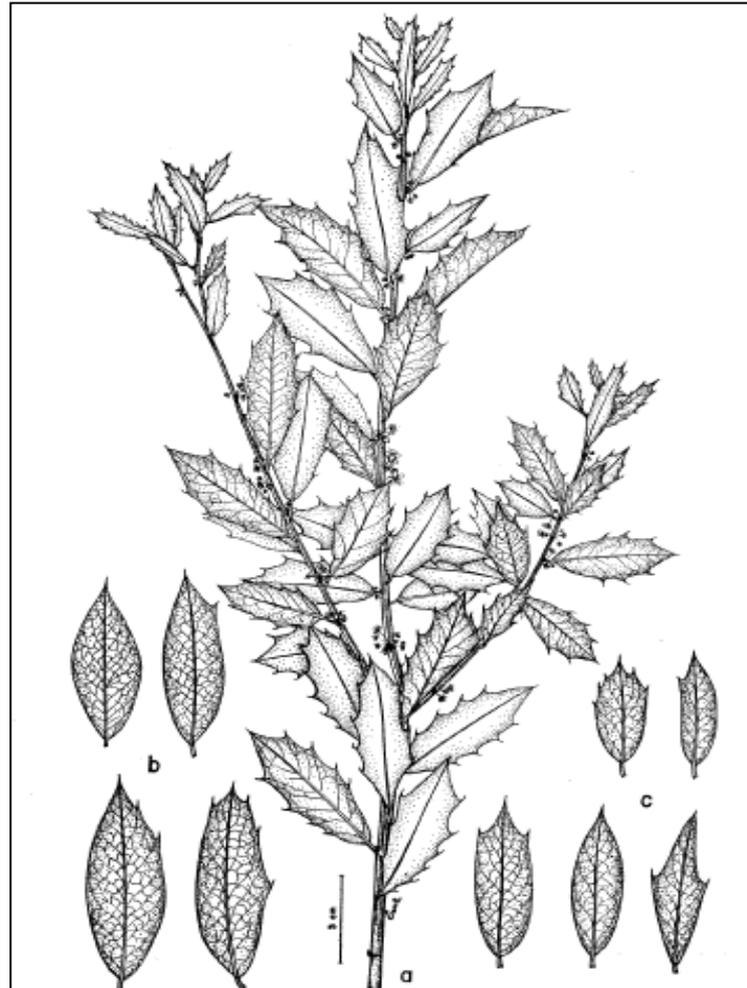


Figura 1. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. a) Aspecto do ramo com flores; b) e c) Variações na morfologia foliar de um mesmo indivíduo (Carvalho-Okano, 1992).

2.2 Aspectos químicos do Gênero *Maytenus*

Monache *et al.* (1976) isolaram ouratea-proantocianidinas A e B, e 4-*O*-metil(-)-epigallocatequina do extrato metanólico das cascas de raízes da *M. rigida*. Corsino *et al.* (1998) isolaram dois alcaloides sesquiterpênicos piridínicos a partir do extrato metanólico de cascas das raízes de *M. aquifolium*, a aquifoliulina E-I e E-II. Também foi isolado o seringaresinol, um derivado da lignina.

Chavez *et al.* (1999) isolaram os novos quinona nortriterpeno metileno, amazoquinona, (7*S*,8*S*)-7-hidroxi-7,8-dihidro-tingenona e, os triterpenos norfenólicos 7,8-dihidro-6-oxo-tingenol, 23-nor-6-oxo-tingenola 23-oxo-iso-tingenona, a partir de extrato *n*-hexano: etanol (1:1) de cascas da *M. amazonica* Mart.

Kennedy *et al.* (2001) descreveram o isolamento de dez novos sesquiterpenos com esqueleto dihidro- β -agarofurano, a partir do extrato *n*-hexano: etanol (1:1) de raízes de *M. magellanica* (Lam.) Hook. f. e *M. chubutensis* (Speg.) Lourteig, O'Donnell & Sleumer. Orabi *et al.* (2001) obtiveram a partir do extrato etanólico das folhas de *Maytenus heterophylla* (Eckl. & Zeyh.) N. Robson um novo alcaloide

dihidroagarofurano, 1- β -acetoxi-9- α -benzoiloxi-2- β ,6 α -dinicotinoiloxi- β -diidroagarofurano. Além disso, foram isoladas as substâncias β -amirina, (-)-epicatequina e (-)-4'-*O*-metil-epigalocatequina a partir do extrato etanólico de folhas de *M. arbutifolia* (Hochst. ex A. Rich.) R.Wilczek.

Schaneberg *et al.* (2001) examinaram o extrato etanólico da raiz de *M. putterlickoides* (Loes.) Exell & Mendonça, obtendo dois novos alcaloides sesquiterpenos diidroagarofuranos, puterina A e puterina B, além da maiteína.

Núñez *et al.* (2004) isolaram a partir do extrato etanólico das folhas de *M. chiapensis* Lundell novos alcaloides sesquiterpenos piridínicos chiapeninos ES-I, ES-II, ES-III e ES-IV, além de outros 10 alcaloides já conhecidos.

O trabalho de De Oliveira *et al.* (2006) destacou o isolamento do polímero natural 1,4-*trans*-poli-isopreno, lupanos, oleanos, e ursano e triterpenos quinonametídeos a partir de extrato hexânico de raízes de *M. acanthophylla* Reissek.

Da Silva *et al.* (2008) isolaram pela primeira vez no gênero *Maytenus*, a partir do extrato etanólico das raízes da espécie *M. obtusifolia*, *N*-metilflindersina, um alcaloide. Sua presença é interessante do ponto de vista biossintético, pois pode ser usada como um marcador quimiotaxonômico.

2.3 Aspectos químicos da Espécie *Maytenus ilicifolia*

Itokawa *et al.* (1990) obtiveram através da purificação de um extrato metanólico das cascas de *M. ilicifolia* novos dímeros triterpenos nomeados cangorosina A, atropcangorosina A, dihidroatropcangorosina A e cangorosina B.

Outros dois novos triterpenos foram isolados por Itokawa *et al.* (1991) de extrato metanólico das cascas das raízes de *M. ilicifolia*, cangoronina (ácido friedooleno-24-al-3-em-3-ol-2-on-29-oico) e ilicifolina (friedooleano-1-em-29-ol-3-ona). Além desses compostos foram isolados sete triterpenos conhecidos, ácido maitenoico, friedooleano-5-en-3 β ,29-diol, friedooleano-29-ol-3-ona, pristimerina, ácido salasperimico, isopristimerina III e isotingnona III.

Quatro novos triterpenoides foram isolados a partir do extrato metanólico das folhas de *M. ilicifolia* e tiveram suas estruturas elucidadas por Ohsaki *et al.* (2004), que são as maitefolinas A-C e a uvaol-3-cafeato, além de cinco triterpenoides já conhecidos (betulin-3-cafeato, moradiol, eritrodiol e eritrodiol-3-cafeato).

Pessuto *et al.* (2009) isolaram e identificaram cinco substâncias a partir da fração acetato de etila do extrato acetona: água (7:3 v/v) das folhas pulverizadas de *M. ilicifolia*, que foram identificadas como epicatequina, epigalocatequina, catequina, epicatequina-(4 β →8)-catequina, e epicatequina-(4 β →8)-epicatequina. Entretanto, as duas últimas não haviam sido isoladas das folhas de *M. ilicifolia*, podendo ser aplicadas na validação de extratos em possíveis medicamentos fitoterápicos.

2.4 Propriedades do Gênero

2.4.1 Atividade Farmacológica do Gênero *Maytenus*

Foram atribuídas propriedades anti-inflamatória e antipirética a extratos metanólicos obtidos a partir da parte aérea de *M. boaria* Molina, uma espécie que é comum nas áreas rurais do Chile e da Argentina (Muñoz *et al.*, 1996).

Chavez *et al.* (1999) demonstraram que a quinonanortriterpeno metileno amazoquinona, isoladas das cascas das raízes de *M. amazonica*, apresentou atividade antitumoral moderada contra quatro linhagens de célula.

Kennedy *et al.* (2001) testaram 14 sesquiterpenos obtidos de extratos *n*-hexano: éter etílico (1:1) de cascas de raízes da *M. magellanica* e *M. chubutensis* em uma linhagem de *Leishmania tropica* multirresistente, a fim de determinar a sua capacidade para reverter o fenótipo de resistência e para modular a acumulação intracelular de drogas, como resultado cinco compostos mostraram potente atividade. Os compostos testados apresentaram um alto efeito de reversão do fenótipo de resistência.

Orabi *et al.* (2001) mostraram que o ácido maitenfólico, obtido através do extrato etanólico de folhas moídas de *M. heterophylla*, apresenta atividade antimicrobiana proeminente, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, *Candida albicans* (Robin) Berkhout e *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill. com valores de CIM de 12,5 µg/mL.

Bruni *et al.* (2006) investigaram o extrato hidroalcoólico da casca de *M. krukovii* A. C. Sm. por sua ação mutagênica protetora. O extrato apresentou efeito inibidor nas linhagens T98 e T100 contra a atividade mutagênica do 2-aminoantraceno, porém não foi protetor contra os mutágenos azida de sódio e 2-nitrofluoreno. A ação como antioxidante e captador de radicais foi dose dependente. Esse extrato se mostrou eficiente ao inibir o crescimento do patógeno *Pythium ultimum* Trow.

Dias *et al.* (2007) testaram a atividade do extrato etanólico de cascas do caule de *M. rigida*, suas frações e compostos isolados, quanto à atividade antinociceptiva. Os autores demonstraram resultado positivo quanto ao efeito antinociceptivo em ratos a partir do extrato, das frações e da 4'-*O*-metil-epigallocatequina, o que justifica o uso analgésico tradicional dessa planta.

Crestani *et al.* (2009) testaram frações semi purificadas do infuso de folhas de *M. ilicifolia* em ratos e demonstraram que essas preparações apresentaram um efeito hipotensor potente, sendo um evento predominantemente dependente do óxido nítrico via guanilato ciclase.

Fernández De La Torre *et al.* (2010) demonstraram que o extrato obtido a partir da maceração das cascas de *M. urquiolae* Mory com *n*-hexano: éter etílico (1:1) apresentou atividade fungicida *in vitro* contra o patógeno *Curvularia clavata* B.L. Jain, inibindo a germinação dos conídios.

Cansian *et al.* (2015) demonstraram que *M. dasyclada* Mart. tem atividade antioxidante, expressos pelo IC₅₀ de DPPH, *in vitro* comparável a de *M. aquifolium* mas inferior a *M. ilicifolia*.

Também os extratos aquosos obtidos por infusão de *M. desyclada* e *M. aquifolium* promoveram um aumento no teor de carbonila, semelhante ao que ocorre na oxidação de proteínas.

2.4.2 Atividade Farmacológica da Espécie *Maytenus ilicifolia*

Souza-Formigoni *et al.* (1991) avaliaram o potencial antiulcerogênico de um extrato de água fervente de partes iguais de folhas de *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* contra lesões de úlcera induzida em ratos. A administração por via oral e intraperitoneal do extrato teve um efeito antiulcerogênico potente. Demonstrou-se que o extrato provoca um aumento do volume e do pH do suco gástrico dos animais podendo comparar o efeito ao obtido com a administração da cimetidina.

Velloso *et al.* (2006) avaliaram o extrato bruto etanólico das cascas da raiz de *M. ilicifolia* e concluíram que o mesmo apresenta potencial antioxidante baseado na capacidade de sequestrar radicais livres, expresso pela média dos valores de IC₅₀, que pode ser atribuída aos polifenóis e flavonoides presentes.

Pessuto *et al.* (2009) isolaram cinco substâncias de interesse para a espécie *M. ilicifolia*, três monômeros epicatequina, epigalocatequina e catequina, e duas procianidinas, epicatequina-(4β→8)-catequina (procianidina B1) e epicatequina-(4β→8)-epicatequina (procianidina B2) (Figura 2 A-E). As substâncias isoladas da fração acetato de etila do extrato bruto acetona: água (7:3 v/v) a 10% das folhas desengorduradas de *M. ilicifolia* foram avaliadas frente ao método do radical DPPH. Os valores obtidos pelo método em IC₅₀ demonstraram ter capacidade antioxidante, e que quanto maior o número de hidroxilas fenólicas presentes na substância, maior é a capacidade de sequestro de radicais livres.

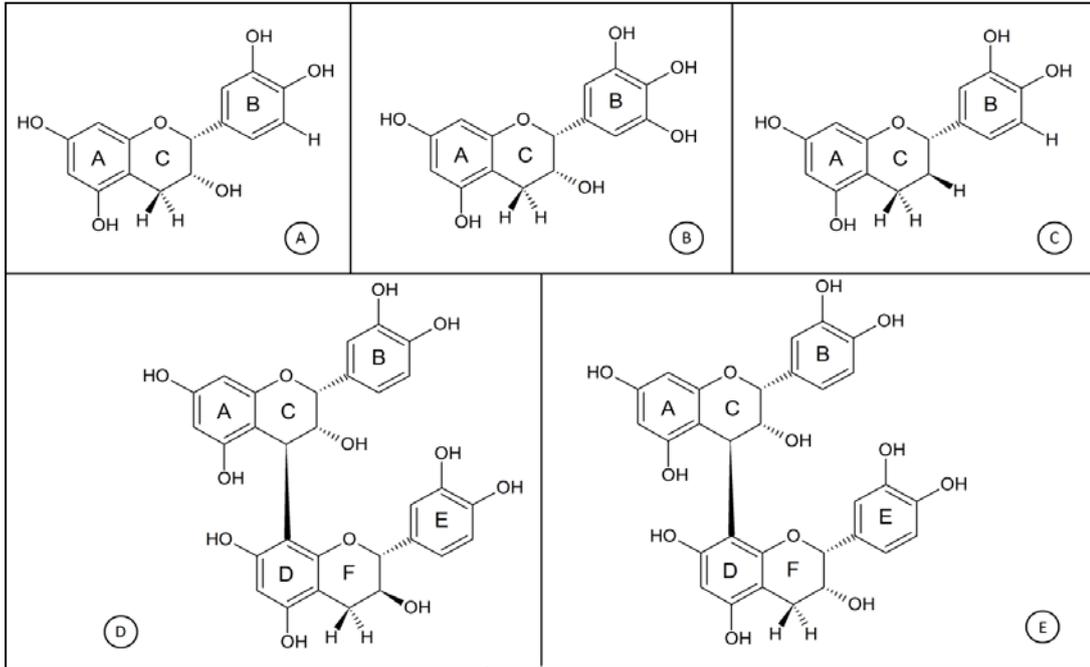


Figura 2. Substâncias isoladas das folhas de *Maytenus ilicifolia*. Epicatequina (A); epigallocatequina (B); catequina (C); epicatequina-(4β→8)-catequina (D) e epicatequina-(4β→8)-epicatequina (E).

Baggio *et al.* (2012) avaliaram o efeito protetor de arabinogalactanas tipo II isoladas de folhas de *M. ilicifolia* em modelos de hipersecreção gástrica, úlcera e motilidade gastrointestinal. Os resultados apontaram o potente efeito antiulcerogênico das arabinolactanas tipo II, porém não apresentaram atividade na secreção de ácido, nem na motilidade gastrointestinal.

Gullo *et al.* (2012) avaliaram o espectro da atividade antifúngica dos compostos maitenina e pristimerina isoladas das cascas de raízes de *M. ilicifolia*. A maitenina apresentou o melhor espectro de atividade antifúngica e um índice de seletividade de 1.0 para todos os fungos testados. A pristimerina também foi ativa e apresentou alto índice de seletividade para algumas espécies testadas.

Araújo Júnior *et al.* (2013) realizaram um estudo onde foram avaliados os efeitos apoptóticos de um extrato seco de *M. ilicifolia* utilizando células hepatocelulares humanas, células de carcinoma colorretal e queratinócitos normais os resultados do estudo demonstraram que o extrato foi capaz de induzir apoptose em células cancerígenas.

Dos Santos *et al.* (2013) avaliaram a atividade leishmanicida e tripanomicida de dois triterpenos quinonametídeos, maitenina e pristimerina. Esses compostos foram isolados das cascas de raízes de *M. ilicifolia*. Os compostos foram ativos contra *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw, *Leishmania chagasi* Nicolle e *Trypanosoma cruzi* Chagas. Os triterpenos apresentaram atividade contra promastigotas e amastigotas, com valores de inibição (IC₅₀) menor que 0,88 nM.

Wonfor *et al.* (2017) investigaram as propriedades anti-inflamatórias de extratos das folhas de *M. ilicifolia* em células epiteliais do intestino humano, pois essa linhagem celular apresenta uma resposta inflamatória mensurável via receptor TLR-2, quando estimulada por um ligante bacteriano. O

extrato foi capaz de subregular a expressão do TLR-2, sendo assim é possível que o extrato seja capaz de reduzir a expressão proteica do TLR-2, e assim reduzir os sítios ativos de estimulação. O extrato foi capaz de suprimir a secreção de IL-8, sendo uma evidência do efeito anti-inflamatório da *M. ilicifolia*.

Tabach *et al.* (2017a) realizaram estudos pré-clínico e clínico com o extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia* a fim de determinar a dose máxima segura, já que esta planta é muito utilizada na medicina tradicional no Brasil por seu efeito antidispéptico. Foi constatada a segurança do extrato até a dose de 2000 mg/dia em voluntários saudáveis. O extrato se mostrou muito promissor pois apresentou atividade antidispéptica, redução da acidez, azia e náusea sem efeitos tóxicos. A análise do fígado, rins e pâncreas, assim como o nível de colesterol, glicose, hormônios e exame de urina, mostrou-se normal mesmo depois de tratados com a dose mais alta. Os efeitos adversos reportados pelos pacientes foram poucos e nenhum de natureza séria que não impediram a continuação do tratamento.

Vieitez *et al.* (2018) avaliaram diferentes métodos de extração de algumas plantas que apresentam atividade antioxidante já comprovada e a atividade antimicrobiana de cada um desses extratos. Entre as plantas testadas está *M. ilicifolia*. Os extratos de espinheira-santa apresentaram o melhor poder antimicrobiano, sendo muito efetivo frente *Bacillus cereus* Frankland & Frankland com CIM de 0,036 a 0,54 µg/mL.

2.4.3 Toxicidade

Em pesquisa realizada por Oliveira *et al.* (1991) demonstrou-se que a espécie *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* não tem efeitos potenciais sobre a fertilidade de ratos fêmeas e machos, sem efeitos teratogênicos, nem malformações congênitas.

Oliveira *et al.* (1991) realizaram um amplo estudo farmacológico e toxicológico utilizando uma mistura de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* em ratos e camundongos. Os testes realizados para avaliação de efeitos agudos não apontaram diferença significativa quanto à frequência urinária, frequência de defecação, pilo ereção, atividade locomotora, tremores, convulsões, tônus muscular, ataxia, ptose palpebral, perda de reflexos, excreção de lágrimas ou saliva, quando comparados ao controle. Foi mostrado ainda que a administração via oral de extrato aquoso obtido por decocção de folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* não causa efeitos na atividade de locomoção do animal, porém quando administrado intraperitoneal há uma diminuição dessa atividade. Além desse efeito a administração por essa via levou a um aumento no tempo do sono induzido por pentobarbital. Nas determinações da LD₅₀ concluiu-se que os extratos testados não apresentam efeitos tóxicos.

Quanto aos efeitos crônicos dos extratos obtidos por decocção da mistura folhas de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium*, Oliveira *et al.* (1991) mostraram que a administração do extrato levou a um aumento significativo do peso dos animais, porém esse aumento também foi induzido pelo tratamento controle. Os níveis de glicose não foram diferentes entre os grupos tratado e controle, nem a temperatura corporal

na 2,6 e 8 semanas. Na quarta semana de tratamento houve uma redução significativa na temperatura corporal, porém não foi observada nenhuma outra alteração fisiológica. Quando analisado o soro dos animais, não foi encontrada nenhuma alteração, quando comparado ao controle. Não encontraram alterações após examinar o estômago, esôfago, duodeno, intestino, fígado, baço, rins, epidídimo, vesículas seminais e testículos dos ratos. E por fim os testes quanto a teratogenicidade demonstraram que os extratos de *Maytenus* não apresentam riscos.

Montanari e Bevilacqua (2002) avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico de folhas de *M. ilicifolia* em ratas em diferentes períodos de gestação. Concluíram que o extrato não foi embriotóxico e não causou alterações morfológicas na mucosa uterina e ovários, mas exibiu uma atividade estrogênica. Outro resultado obtido foi a taxa reduzida de implantação de embriões, quando o extrato foi administrado a ratas no início da gravidez, com a dose de 1000 mg/kg.

Camparoto *et al.* (2002) avaliaram o possível efeito citotóxico e mutagênico de infusão das folhas de *M. ilicifolia*. Os testes foram realizados em células da ponta da raiz da cebola e em células da medula óssea de rato. Para isso utilizaram duas concentrações do extrato, uma semelhante a usada popularmente e outra dez vezes mais alta, em ambas concentrações o extrato não apresentou efeito depressivo na mitose e não provocou alterações no número de cromossomos.

Raymundo *et al.* (2012) mostraram através do estudo com extrato hidroalcoólico obtido por maceração das folhas de *M. robusta* Reissek, quando usados nas doses suficientes para ter o efeito clínico desejado, apresenta um efeito genotóxico, porém não clastogênico.

Tavares (2014) demonstrou através da avaliação de mutagenicidade que *M. rigida* não induz danos cromossômicos em eritrócitos imaturos. O extrato etanólico da entrecasca do caule não apresentou efeito clastogênico, nem propriedades antimutagênicas, porém mostrou citotoxicidade em concentrações de 500 e 750 mg/kg.

Cunha-Laura *et al.* (2014) estudaram o efeito da *M. ilicifolia* na reprodução e no desenvolvimento embrio-fetal em ratas Wistar, utilizando uma dose equivalente de extrato, obtido por percolação das folhas com acetona: água (7:3 v/v), à usada pela população. A partir desse estudo foi evidenciado que a exposição a *M. ilicifolia* durante o período organogênico e período de gestação, não é tóxico e não interfere no desenvolvimento embrio-fetal, nem com os parâmetros reprodutivos maternos.

Cansian *et al.* (2015) analisaram os extratos das folhas de três espécies de *Maytenus* (*M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e *M. desyclada*) a fim de avaliar a genotoxicidade das espécies, que tem sido amplamente utilizada pela população brasileira. O dano ao DNA foi analisado e os resultados mostraram que as três espécies tem um nível de genotoxicidade baixo.

Tabach *et al.* (2017b) realizaram um estudo toxicológico pré-clínico completo com extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia*. O extrato testado não apresentou nenhum efeito tóxico agudo nos modelos testados. Nenhum parâmetro observado como frequência urinária e de defecação, piloereção, atividade locomotora, tremor, convulsão, salivação e morte, apresentou alteração. Foi comprovado que

o extrato não induz alterações prejudiciais no tônus muscular nem na coordenação motora dos camundongos. Além desses testes, os ensaios de toxicidade aguda, utilizando doses superiores a 5000 mg/kg não produziu morte durante os 7 dias em que o extrato foi administrado, sugerindo a baixa toxicidade desse extrato.

Para os testes de toxicidade crônica foram utilizados ratos e camundongos, em nenhuma dos grupos de animais foi observada alteração no peso depois de 90 dias de tratamento. A administração crônica do extrato (90 dias) não alterou os parâmetros séricos bioquímicos, a série hematológica vermelha e a branca, assim como as plaquetas. Nos exames anatomopatológicos não foi encontrada nenhuma alteração nos órgãos examinados (Tabach *et al.*, 2017b).

Quanto ao ciclo estral das ratas não foram observadas alterações nos vários parâmetros do ciclo nas diferentes doses testadas depois de 60 dias de tratamento com o extrato, além disso os órgãos analisados anatomopatologicamente não apresentaram alteração macroscópica nem microscópica. (Tabach *et al.*, 2017b).

Quanto a teratogenicidade, os extratos administrados não causaram alterações nos parâmetros como número e duração da gravidez, bem como o número de filhotes, peso ou sinal externo de malformação dos filhotes. Também não foram encontradas diferenças em outros parâmetros como abertura dos olhos e deambulação dos filhotes no dia 8 e 13 de vida. Ao testarem a dose máxima tolerada, não encontraram sinais de toxicidade e nenhuma redução significativa de eritrócitos nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade (Tabach *et al.*, 2017b).

Devido ao uso popular de *M. ilicifolia* Ecker *et al.* (2017) decidiram avaliar o efeito de uma dose supratrapêutica do extrato etanólico e aquoso na fertilidade e estado neurocomportamental em ratos machos e ratas prenhas. As altas doses dos extratos não induziram sinais de toxicidade nas ratas prenhas nem nos ratos machos.

A administração dos extratos não alterou as funcionalidades do sistema vestibular e cerebelar testadas. Os filhotes não sofreram nenhuma alteração com relação ao ganho de peso, e não apresentaram diferença significativa quanto a aparição das características somáticas externas. A administração dos extratos às mães não acarretou anormalidades na arquitetura do hipocampo dos filhotes, morte neuronal e alteração no peso do cérebro (Ecker *et al.*, 2017).

Nos ratos machos foram realizadas análises de contagem de espermatozóide do epidídimo, motilidade e produção diária, bem como o número de espermátides/testículos após o tratamento. Concluíram que a administração do extrato não afetou a espermatogênese nem a função epididimal em ratos (Ecker *et al.*, 2017).

2.5 Compostos fenólicos

Assim como todos os organismos vivos, os vegetais produzem, degradam e transformam diversos produtos químicos, sejam estes componentes relacionados diretamente à manutenção da vida ou não.

Estes compostos são divididos em dois grandes grupos, metabólitos primários e secundários (Santos e Mello, 2007; Poser, 2017).

Os metabólitos primários ou metabólitos basais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do ser vivo, são os lipídeos, proteínas, glicídeos. Estes metabólitos são destinados à manutenção da vida e reprodução. E é a partir desses compostos que os metabólitos secundários são produzidos, por meio das diferentes rotas biossintéticas. Os metabólitos secundários ou metabólitos especiais estão envolvidos com os processos de relação do indivíduo com o meio ambiente, sendo dispensáveis para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo sozinho, porém necessários quando em ambientes complexos. Em geral apresentam uma estrutura complexa, baixo peso molecular e atividades biológicas expressivas. Estes compostos garantem ao vegetal vantagens para sua sobrevivência e também para perpetuação da espécie (Poser e Mentz, 2007; Santos e Mello, 2007; Kreis *et al.*, 2017).

São muitos os fatores que afetam a produção dos metabólitos secundários como a sazonalidade e o ritmo circadiano, pois existem alguns metabólitos que não são produzidos durante todo o ano, ou a quantidade produzida é mínima. A diferença de produção dos metabólitos também pode variar durante o ciclo dia/noite. A idade e a época de desenvolvimento da planta, assim como os órgãos vegetais utilizados podem influenciar a quantidade dos metabólitos. A faixa de temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, altitude e poluição ambiental podem afetar a disponibilidade de algumas classes de metabólitos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

M. ilicifolia é uma planta que apresenta uma composição complexa, quanto aos seus compostos químicos presentes, dentre os quais estão os terpenos, triterpenos, óleos essenciais, taninos, glicolipídeos e os alcaloides (Santos-Oliveira *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos compõem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de metabólitos secundários. Quimicamente são caracterizados como compostos que apresentam característica estrutural fenólica, podendo apresentar estruturas simples, como o ácido gálico (Figura 3A), ou estruturas altamente polimerizadas como dos taninos hidrolisáveis (Figura 4). São oriundos de duas possíveis vias metabólicas, do ácido chiquímico ou do acetato (Bravo, 1998; Tsao, 2010).

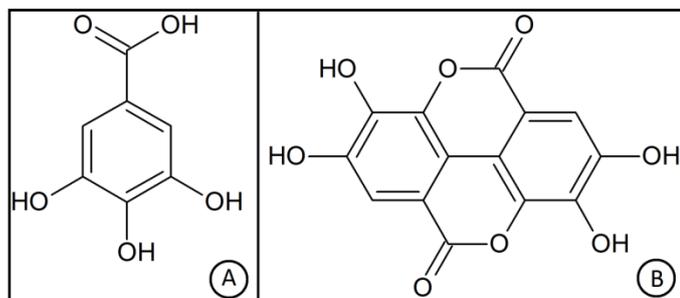


Figura 3. Estrutura química dos ácidos gálico (A) e elágico (B).

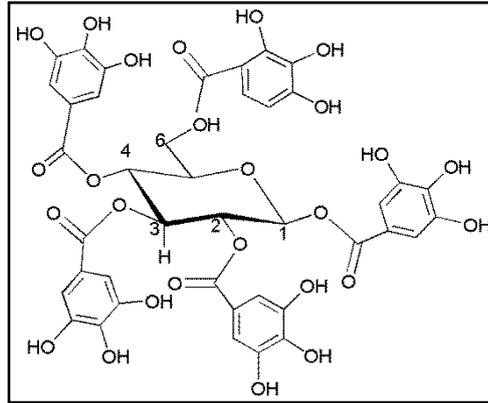


Figura 4. Tanino hidrolisável com um poliol central: β -1,2,3,4,5-pentagaloil-*D*-glicose

O grupo dos compostos fenólicos é o que apresenta maior diversidade e ampla distribuição, podendo ser encontrado em frutas, vegetais, grãos, chás, chocolate e vinhos. É dividido em diversos subgrupos, como flavonoides e taninos. Porém sua classificação se dá de acordo com sua origem, função biológica e estrutura química (Tsao, 2010).

2.5.1 Propriedades Biológicas dos Compostos Fenólicos

As evidências científicas têm sugerido que o consumo diário de alimentos e bebidas ricos em polifenóis induz um efeito positivo na saúde humana, associada ao efeito protetor contra o desenvolvimento de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, osteoporose, inflamação e diversas formas de câncer (Fantini *et al.*, 2015; Grootaert *et al.*, 2015; Chowdhury *et al.*, 2016).

Naasani *et al.* (2003) avaliaram por meio de estudos em células tumorais *in vitro* e *in vivo* a capacidade da epigallocatequina galato e de outros polifenóis como epicatequina, quercetina, miricetina, naringina, naringinina e biochanina A, de inibir as células tumorais associadas à enzima telomerase. E todos os compostos testados se mostraram muito eficazes na inibição do câncer.

Sadik *et al.* (2003) demonstraram que 15-lipoxigenase-1 de mamíferos é inibida por flavonoides de estrutura variada, e essa inibição pode contribuir para a atividade antioxidante conferida aos flavonoides ingeridos na dieta.

Hussain *et al.* (2013) demonstraram que nanopartículas poliméricas contendo hidroxitirosol, um fenol com potente atividade antioxidante, e hidrocortisona, para o tratamento de dermatite atópica são promissoras pois melhora a distribuição das substâncias, e conseqüentemente as atividades anti-inflamatória e antioxidante.

Kubota *et al.* (2009) avaliaram o papel do resveratrol na inflamação ocular induzida por endotoxina, e demonstraram que o resveratrol melhorou os parâmetros relacionados com a inflamação como a resposta inflamatória celular e molecular e danos oxidativos. Foi capaz de suprimir a adesão dos

leucócitos nos vasos da retina além de reduzir significativamente os níveis de moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 e de monócito quimiotático (MCP), que desempenham papel no recrutamento e na adesão de leucócitos.

Yang *et al.* (2013) indicaram que resinas contendo dimetacrilato de trietilenoglicol podem induzir inflamação pulpar e periapical durante um período após o tratamento. Quando utilizada epigalocatequina galato, esta demonstrou-se capaz de inibir a expressão da COX-2 induzida pela resina na polpa dentária humana e nas células palatinas embrionárias humanas.

O composto metil-3-*O*-metil galato é um polifenol raramente encontrado em produtos naturais, mas que pode ocorrer em pequenas quantidades em espécies vegetais como a *Peltiphyllum peltatum* (Torr.) Engl.. Esse produto apresentou atividade antioxidante e efeito protetor cardiovascular *in vitro*, Curti *et al.* (2014) demonstraram que a atividade antioxidante é resultado da restauração parcial das enzimas antioxidantes, devido a indução da redução do micro RNA miR-17-3p e ao aumento de mRNA responsável por codificar as enzimas antioxidantes, que realizaram seus efeitos protetores em células humanas.

A quercetina, um flavonoide amplamente distribuído em frutas, vegetais, chás e vinhos, é um excepcional sequestrador de radicais livres, podendo reduzir a inflamação e protegendo células em estresse oxidativo (D'Andrea, 2015).

A curcumina é um pigmento fenólico lipossolúvel que apresenta diversas atividades já confirmadas, como anti-inflamatória, antioxidante, redutora de gordura no sangue e antitumoral. Yu *et al.* (2015) avaliaram os efeitos da curcumina em diferentes microRNAs de células de osteosarcoma humano, a fim de identificar seus efeitos e seu mecanismo nas células. Puderam concluir que a curcumina foi capaz de aumentar a expressão de hsa-mR-138, que inibiu a proliferação celular e a capacidade invasiva dessas células por meio da inibição dos seus genes alvo.

O resveratrol é um polifenol *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, que pode ser encontrado em diversas plantas, como uvas e amendoins. Sua atividade antiobesidade já tem sido demonstrada, assim Gracia *et al.* (2016) decidiram avaliar as alterações provocadas por esse polifenol no perfil de microRNA no tecido adiposo branco, relacionando essas alterações ao metabolismo do triacilglicerol. Como resultado deste estudo eles puderam demonstrar pela primeira vez que o resveratrol modifica o perfil de microRNA no tecido adiposo branco, e que o miR-539-5p está envolvido na inibição da lipogênese.

2.6 Taninos

O termo taninos foi usado pela primeira vez por Seguin em 1796, ao definir o princípio adstringente da casca de carvalho, que era capaz de transformar a pele de animais, tornando-a imputrescível e resistente à água fervente (Costa, 1994).

Os taninos são compostos de intermediário a alto peso molecular, são moléculas altamente hidroxiladas que são capazes de formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas, característica responsável pela adstringência de plantas contendo taninos (Bravo, 1998).

A classificação dos taninos é feita segundo sua estrutura química, como taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

A característica dos taninos hidrolisáveis é a presença de um poliol central, geralmente β -D-glicose, que tem suas funções hidroxilas esterificadas com o ácido gálico (Figura 4). Esta classe ainda é dividida em galotaninos e elagitaninos (Battestin *et al.*, 2004; Santos e Mello, 2007).

Os galotaninos são resultado da união de unidades de ácido gálico (Figura 3A) por meio de ligações *meta*-depsídicas. É comum esses taninos sofrerem acúmulo particularmente nos galhos. A acidez desses compostos pode ser explicada pelo fato de que algumas ligações da glicose com certas moléculas do ácido gálico se fazem como ésteres (Costa, 1994; Santos e Mello, 2007).

Elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidróxi-difenoil-*D*-glicose de configuração (*R*) ou (*S*), obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico, além da presença de ácido elágico (Figura 3B) (Santos e Mello, 2007).

Ainda podemos encontrar os taninos hidrolisáveis oligômeros, que são formados pela condensação de unidades monoméricas, geralmente elagitaninos, interconectadas por diferentes unidades ligantes (Santos e Mello, 2007).

Taninos condensados ou proantocianidinas são oligômeros e polímeros formados por policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esses taninos apresentam a característica marcante de produzir pigmentos avermelhados como a cianidina e delphinidina (Figura 5) (Santos e Mello, 2007).

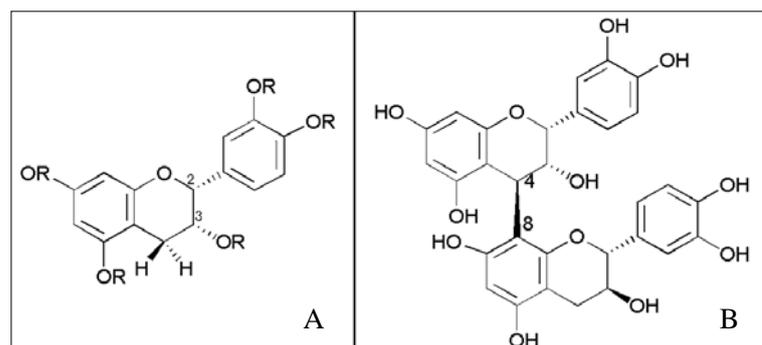


Figura 5. Estruturas de taninos condensados. A) epicatequina; B) procianidina B1.

Os taninos podem ser encontrados no reino vegetal sem seguir um padrão significativo. As proantocianidinas são amplamente encontradas em Gymnospermae e Angiospermae, enquanto os taninos hidrolisáveis estão restritos às Choripetalae das dicotiledôneas e os taninos condensados estão distribuídos amplamente em plantas lenhosas (Santos e Mello, 2007).

2.6.1 Propriedades Biológicas dos Taninos

Os taninos se caracterizam por sua propriedade adstringente, que se explica pelo fato de se complexarem com proteínas das células superficiais de mucosas e tecidos descobertos, formando assim revestimentos protetores. Sendo assim, ocorre a diminuição do volume das secreções, anulando a propriedade das células de absorver substâncias irritantes ou tóxicas. No intestino os taninos precipitam as proteínas, recobrando as células superficiais da mucosa com pequenos precipitados, bloqueando a absorção, diminuindo os movimentos peristálticos, sendo assim, um remédio para diarreia provocada por inflamação (Costa, 1994).

Revelam um poder antisséptico que pode ser explicado pelo revestimento precipitado que impede que micro-organismos se desenvolvam, associado à ação desinfetante que é característica do composto fenólico. Ainda possuem propriedades hemostáticas nas hemorragias de origem capilar, pois precipitam proteínas do soro, dando origem aos coágulos. Outra utilidade muito importante dos taninos é como antídoto nos envenenamentos, por via oral, com alcaloides e sais metálicos tóxicos, por resultarem em precipitados insolúveis (Costa, 1994).

Nishizawa *et al.* (1990) mostraram que o decocto da raiz de *Nuphar variegatum* Durand., rico em taninos, tem atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Proteus vulgare* Hausere e *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen.

Ayres *et al.* (1997) testaram a atividade anti-herbívora de taninos condensados (procianidinas e prodelfinidinas) isolados de folhas e ramos de 12 espécies vegetais (6 espécies de *Salix*, 2 de *Populus*, 3 de *Betula*, *Coleogyne ramosíssima* Torr., *Shepherdia canadenses* (L.) Nutt., e *Vaccinium vitis-idaea* L.), sobre seis espécies de larvas (*Calligrapha verrucosa* (Suffrian), *Chrysomela falsa* Brown, *Chrysomela crotchii* Brown, *Pyrrhalta luteola* (Maller), *Papilio canadensis* R & J e *P. glaucus* L.). Este estudo demonstrou a ação tóxica dos taninos condensados, o que resultou na rápida mortalidade dos insetos.

Saleem *et al.* (2002) testaram o extrato metanólico 70% de *Terminalia chebula* Retz., planta rica em taninos, frente a diversas linhagens de células malignas, e concluíram que o extrato levou a inibição da taxa de proliferação celular e induziu a morte celular. As baixas concentrações do extrato foram capazes de iniciar vias celulares que levaram a apoptose, enquanto à concentrações elevadas tiveram efeitos tóxicos diretos, conduzindo à morte celular por necrose rápida.

Fyhrquist *et al.* (2014) em busca de novos antibióticos para o tratamento da tuberculose, testaram dez extratos brutos e suas partições de cinco espécies diferentes de *Terminalia* que foram coletadas na Tanzânia. Extratos metanólicos das raízes e cascas de *T. sabesiaca* Engl. & Diels. e *T. kaiserana* F. Hoffm., assim como o extrato metanólico das frutas de *T. stenostachya* Engl. & Diels. e os extratos metanólicos das folhas de *T. spinosa* Engl. apresentaram uma boa atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468. Essa atividade antimicrobiana é atribuída aos elagitaninos, derivados de ácido gálico, galotaninos e taninos condensados presentes na *Terminalia*.

Stolarczyk *et al.* (2013) demonstraram que o extrato aquoso de *Epilobium angustifolium* L., *E. parviflorum* Schreb. e *E. hirsutum* L. são potentes inibidores da proliferação das células do câncer de próstata, reduzindo a secreção do antígeno específico (PSA) e inibindo a atividade da arginase. Os elagitaninos do extrato de *E. hirsutum* foram transformados pela microbiota do intestino humano a urolitinas. A urolitina C mostrou uma forte atividade de inibição das células proliferativas, da secreção do PSA e da atividade da arginase.

Rodrigues *et al.* (2014) testaram taninos isoladas de extratos brutos das folhas de *Psidium guineense* Sw. contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Uma primeira mistura rica em taninos condensados e a segunda rica em ésteres de ácido gálico e glicose. Os taninos do segundo grupo apresentaram uma concentração mínima inibitória de 256 µg/mL para *S. aureus* e de 512 µg/mL para a *P. aeruginosa*.

Figueroa-Espinoza *et al.* (2015) investigaram o uso de taninos obtidos de subprodutos e resíduos da produção de vinhos como agente emulsificante e antioxidante estabilizante. Os resultados demonstraram que taninos são bons estabilizantes para óleos em emulsões aquosas. As emulsões obtidas apresentaram características semelhantes às aquelas produzidas com emulsificantes comerciais.

Morey *et al.* (2016) avaliaram o efeito de uma fração enriquecida de taninos de *Stryphnodendron adstringens* Mart. no crescimento e na propriedade de adesão *in vitro* e *in vivo* de *Candida tropicalis* Berkhout. Os resultados mostraram que além da inibição do crescimento de *C. tropicalis*, a fração rica em taninos obtida a partir de cascas do caule de *S. adstringens* pode interferir nas propriedades de adesão dessa levedura, diminuindo a formação de biofilme em uma superfície abiótica.

Deng *et al.* (2016) investigaram a atividade antioxidante e a viabilidade celular em células do hepatócito humano dos taninos presentes em extratos de folhas de *Ficus altissima* Blume. Esses taninos foram capazes de proteger eficazmente o DNA plasmídial dos danos de radicais livres, além de prevenirem o dano celular causado pelo hidróperóxido de *t*-butila.

Jaradat *et al.* (2017) avaliaram quatro espécies do gênero *Astragalus* tradicionalmente utilizadas na medicina popular palestina para tratamento de doenças infecciosas e não infecciosas. O extrato aquoso de folhas de *A. boeticus* L. apresentou a maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* T. Escherich e *Pseudomonas aeruginosa*, e o extrato metanólico apresentou maior capacidade antioxidante e maior atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

2.7 *Helicobacter pylori*

O gênero *Helicobacter* foi descoberto em 1989, é pertencente à família Helicobacteraceae da classe Epsilonproteobacteria. O gênero é constituído por bacilos Gram-negativos curvos ou helicoidais, são microaerófilos e apresentam flagelos envelopados sendo sua temperatura ótima de cultura 37°C. São

conhecidas 21 espécies sendo que dez podem ser encontradas em associação com processos infecciosos no homem, dentre elas a *H. pylori*, associada com o epitélio gástrico (Trabulsi e Alterthum, 2015).

H. pylori pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças no homem tais como úlcera gástrica ou duodenal, gastrite, adenocarcinoma gástrico, linfoma do tecido associado à mucosa (MALT) e linfoma gástrico de células B primária (Wu *et al.*, 2012).

H. pylori apresenta a capacidade de expressar uma gama de fatores de virulência, que funcionam de diferentes formas, e que ampliam as possibilidades de interação da bactéria com as células do hospedeiro. Esses fatores são: motilidade, urease, catalase e superóxido dismutase extracelulares, mucinases, adesinas, ilha de patogenicidade Cag, toxina vacuolizante vacA, proteína cagA, sistema secretor tipo IV, Ure I e proteína OmpA (Wroblewski *et al.*, 2010; Wessler, 2016).

Para que a colonização e patogênese da *H. pylori* sejam bem-sucedidas é necessário que a bactéria passe por quatro etapas críticas: sobrevivência sob condições ácidas do estômago; movimento em direção a células do epitélio; adesão aos receptores do hospedeiro e promoção de danos no tecido (Kao *et al.*, 2016).

A bactéria possui a capacidade de neutralizar o ácido do estômago do hospedeiro por meio da hidrólise da ureia em amônio e CO₂ promovendo assim um ajuste do pH estomacal para neutro além de produzir um efeito citopático nas células do estômago. Esta ação permite que a bactéria sobreviva nas condições estomacais (Kao *et al.*, 2016).

A morfologia espiralar e os flagelos conferem motilidade à bactéria, permitindo movimentos rápidos em soluções viscosas, como a camada de muco que recobre as células epiteliais gástricas, permitindo assim que a infecção seja estabelecida, e que essa infecção alcance um nível robusto. Ao alcançar as células epiteliais, a bactéria interage com os receptores celulares por meio das adesinas bacterianas, a fim de se protegerem do *clearance* mecânico que ocorre com o peristaltismo e esvaziamento gástrico. A aderência causa danos ao epitélio, induzindo inflamação e liberação de toxinas (Ottemann e Lowenthal, 2002; Kusters *et al.*, 2006; Amieva e El-Omar, 2008; Kao *et al.*, 2016).

A infecção por *H. pylori* causa três fenótipos gástricos principais, cada um está associado a um conjunto de anormalidades patológicas. O primeiro é chamado de gastrite simples ou gastrite benigna, esse fenótipo é caracterizado por uma gastrite leve com pouca interferência na secreção do ácido gástrico, é observado em indivíduos assintomáticos, que não apresentam doença gastrointestinal grave. O segundo fenótipo, úlcera duodenal, é caracterizado pela predominância de gastrite com baixa secreção de ácido gástrico e presença de alto *score* inflamatório antrópico. Essa combinação de anormalidades fisiopatológicas contribui para o desenvolvimento de úlcera péptica duodenal. O terceiro fenótipo é chamado câncer gástrico, esse é caracterizado pelo padrão predominante de gastrite atrófica multifocal, com pouca secreção de ácido gástrico. É resultado direto da inflamação crônica induzida pela infecção, aumentando o risco do câncer gástrico (El-Omar *et al.*, 1995; El-Omar *et al.*, 1997; Amieva e El-Omar, 2008).

Em 2015 aproximadamente 50% da população mundial (4,4 bilhões de indivíduos) foi estimada positiva para *H. pylori*. A prevalência é alta em países em desenvolvimento e recém industrializados, sendo considerados responsáveis pela diferença na prevalência de *H. pylori* fatores como urbanização, saneamento, acesso à água potável e *status* socioeconômico (Hooi *et al.*, 2017).

A taxa de infecção por *H. pylori*, varia de um continente para outro, e às vezes de forma considerável dentro do próprio continente. A região da Oceania é a que apresenta a menor prevalência de 24,4%, enquanto o continente Africano apresenta a taxa de prevalência mais elevada, 79,1%. Na América Latina e no Caribe a prevalência é de 63,4%. Na Ásia, a prevalência da infecção é de 54,7%, porém na Ásia Central essa taxa é mais elevada (79,6%), ultrapassando a do continente Africano. A taxa de prevalência da infecção por *H. pylori* na Europa e na América do Norte é de 47,0% e 37,1%, respectivamente. É importante ressaltar que Portugal, mesmo estando na média de prevalência do continente Europeu, apresenta uma taxa muito elevada de 86,4%, enquanto a Suíça apresenta taxa de prevalência de apenas 18,9%. A prevalência em Portugal só é menor do que a encontrada na Nigéria (87,7%). O Brasil se encontra entre os países com a prevalência da infecção com maiores taxas da América Latina e Caribe (71,2%), ficando atrás apenas do Equador e Chile (72,2% e 74,6% respectivamente) (Eusebi *et al.*, 2014; Peleteiro *et al.*, 2014; Hooi *et al.*, 2017).

Ao levarmos em consideração a alta prevalência dessa bactéria em todo o mundo, e que sua presença é uma das principais causas de úlcera péptica e câncer gástrico, podemos considerá-la um problema de saúde pública muito sério. Segundo a OMS 8,8 milhões de mortes em 2015 foram consequência de câncer, dentre essas 754.000 mortes foram resultado do câncer gástrico. Dados do INCA demonstram que no ano de 2013 foram relatadas 14.182 mortes por esse tipo de câncer no Brasil. Em 2016 foram diagnosticados 20.520 novos casos de câncer gástrico no Brasil (Axon, 2014; Inca, 2017; WHO, 2017).

H. pylori é um micro-organismo de difícil erradicação, por apresentar o estado fenotipicamente resistente. A falha no tratamento pode se dar devido ao fato das bactérias oscilarem entre um estado de replicação (organismo permanece susceptível ao antibiótico) e estado não replicante (o organismo torna-se fenotipicamente resistente) de acordo com o pH no microambiente. As bactérias podem entrar para um ciclo não replicativo, mas viável quando o pH em torno de seus microambientes é entre 4,0 e 6,0 (Wu *et al.*, 2012).

Segundo Hunt *et al.* (2011) o regime de tratamento de primeira linha para *H. pylori* é o uso de um inibidor da bomba de próton + dois antimicrobianos (amoxicilina e claritromicina ou metronidazol e claritromicina). Diversas estratégias terapêuticas alternativas têm sido propostas a fim de aumentar as taxas de erradicação da bactéria, como duração do tratamento de 14 dias ou um regime terapêutico de quatro drogas, podendo ser terapia quádrupla, sequencial ou concomitante. A terapia sequencial consiste na administração de um inibidor de bomba de próton mais amoxicilina, duas vezes ao dia nos primeiros cinco dias de tratamento, seguida por uma terapia tripla contendo um inibidor de bomba de próton, claritromicina e nitroimidazol duas vezes ao dia nos cinco dias restantes de tratamento. Diversos estudos

têm demonstrado que a terapia sequencial é mais eficaz na erradicação da bactéria com uma taxa de erradicação < 90%, enquanto a taxa de erradicação da terapia tripla é < 80% (Gatta *et al.*, 2013; Liou *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2016; Schwarzer *et al.*, 2016; Thung *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2017).

A gestão de infecções causadas por *H. pylori* ainda é um desafio, já que as taxas de falha de erradicação permanecem elevadas, além das recaídas frequentes das úlceras gástricas após a cura completa. Por isso busca-se um tratamento com alta taxa de segurança e eficácia e que reduza os efeitos colaterais (Mazzolin *et al.*, 2010; Manyi-Loh *et al.*, 2012).

Com base na procura de novas metodologias para o tratamento da infecção por *H. pylori*, diversos pesquisadores ao redor do mundo têm estudado extratos vegetais popularmente utilizados, a fim de isolar compostos que sejam eficazes contra a bactéria (Chun *et al.*, 2005; Stege *et al.*, 2006).

Ma *et al.* (2010) testaram 50 extratos de plantas medicinais chinesas de uso popular e obtiveram seus respectivos CIM₁₀₀. O extrato aquoso do rizoma de *Coptis chinensis* Franch., de raízes de *Scutellaria baicalensis* Georgi e raízes de *Isatis tinctoria* L. demonstraram uma inibição da *H. pylori* com CIM₁₀₀ inferior a 7800 µg/mL, quando comparados às outras plantas estudadas. Esse resultado indica que essas plantas podem ser utilizadas como fonte para estudo e síntese de novas drogas para o tratamento contra *H. pylori*.

Cogo *et al.* (2010) estudaram a ação anti-*H. pylori* de diversas plantas como *Bixa orellana* L., *Chamomilla recutita* L., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Malva sylvestris* L., *Plantago major* L. e *Rheum rhaponticum* L. De todas as plantas testadas *C. recutita* e *I. paraguariensis* demonstraram maior potência contra *H. pylori* com CIM₅₀ < 625 µg/mL, do que *B. orellana* que apresentou CIM₅₀ = 1250 µg/mL, já os valores de CIM₉₀ demonstraram que *I. paraguariensis* (CIM₉₀ = 5000 µg/mL) foi capaz de inibir um maior número de isolados clínicos quando comparado com os outros extratos.

Rozza *et al.* (2011) estudaram a ação anti-*H. pylori* a partir do óleo essencial da casca do limão siciliano (*Citrus limon* (L.) Osbeck) e seus componentes isolados limoneno e β-pireno. O óleo essencial e o limoneno apresentaram uma atividade satisfatória contra *H. pylori*, com CIM₁₀₀ de 125 e 74 µg/mL respectivamente. Sendo assim possível o uso dessas substâncias como suplemento para as atuais terapias antibacterianas utilizadas para o tratamento de úlceras.

Castillo-Juarez *et al.* (2009) realizaram testes *in vitro* da capacidade anti-*H. pylori* de 53 plantas de uso tradicional para desordens gástricas no México. Os extratos aquosos de folhas e hastes de *Artemisia ludoviciana* subsp. *Mexicana* (Willd. ex Spreng.) D. D. Keck e *Mentha* e extratos aquosos de partes aéreas de *Cuphea aequipetala* Cav. e *Ludwigia repens* J. R. Forst. apresentaram CIM₁₀₀ 125 a < 250 µg/mL. Os extratos metanólicos das folhas de *Persea americana* Mill., das folhas e hastes de *Annona cherimola* Mill. e *Moussonia deppeana* (Schltdl. & Cham.) Klotzsch ex Hemsl., e das raízes de *Guaiacum coulteri* A. Gray apresentaram CIM₁₀₀ < 7,5 a 15,6 µg/mL.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi a realização de análise fitoquímica de extratos e frações obtidos das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae), com a finalidade identificar substâncias, e avaliar a atividade anti-*H. pylori* dos extratos e frações.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterização da matéria-prima vegetal, por meio de métodos validados de controle de qualidade da espécie vegetal.
- Identificação de compostos em extratos brutos e frações obtidas das folhas de *M. ilicifolia* por espectrometria de massas.
- Avaliação da atividade anti-*H. pylori* dos extratos brutos e frações obtidas das folhas de *M. ilicifolia*.
- Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos brutos produzidos e frações obtidas das folhas de *M. ilicifolia*.

4 Materiais e Métodos

4.1 Material Vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada no dia 11 de fevereiro de 2016 no município de Marialva, Paraná (23°28'43''S; 51°47'39''W; altitude 622 m). Uma exsicata do material foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM) e identificada sob o número de registro 29221. A correta identificação do material vegetal é de primordial importância no estabelecimento da qualidade das preparações obtidas a partir desse material (Bandaranayake, 2006). A coleta do material foi realizada com a permissão do IBAMA-SISBIO e registrado sob o número 11995-3 em 2 de novembro de 2010, com o código de autenticação 46367613, sob responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. Acesso ao material botânico foi registrado no *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado- SisGen* sob nº AB65084. As coletas foram realizadas no período da manhã, quando tempo estava seco, utilizando tesouras de poda, cortando-se os galhos para posterior separação das folhas (Figura 6).



Figura 6. Coleta do material vegetal – *Maytenus ilicifolia*–, Marialva, PR. (Foto: PAULA, M.N. 2016)

4.2 Desengorduramento das folhas

Depois de moídas, as folhas foram submetidas ao processo de maceração dinâmica com *n*-hexano em frasco âmbar, na concentração de 10% (p/v) por 10 dias. A planta foi retirada do frasco e seca em capela (Pessuto, 2006).

4.3 Controle de qualidade da Droga Vegetal

4.3.1 Análises Físico-Químicas

4.3.1.1 Perda por secagem

Foram pesados exatamente cerca de 5,0 g da droga vegetal (folhas íntegras e picadas) e colocados a secar à temperatura ambiente, sem a presença de luminosidade. Foram pesadas diariamente até peso constante. O resultado foi expresso em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, pela média de cinco determinações (Mello e Petrovick, 2000).

4.3.1.2 Perda por dessecação

Foi realizada em balança de infravermelho. Pesou-se cerca de um grama da droga vegetal pulverizada. O material foi uniformemente distribuído sobre o coletor de alumínio contido dentro do aparelho. A droga foi deixada na balança por 45 min em uma temperatura de 110 °C. Depois de decorrido o tempo o valor da umidade em porcentual apareceu no display do aparelho, e o valor foi anotado. O resultado foi expresso em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, pela média de três determinações, usando como referência o valor apresentado pela Farmacopeia Brasileira, máximo 12% de umidade (Brasil, 2010).

4.3.1.3 Teor de extrativos

Foi pesado exatamente cerca de 1,0 g da droga vegetal pulverizada, que foi submetida à decocção com 100 mL de água por 10 min. Depois de resfriada, a solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, e o volume completado. Depois disso, foi realizada a filtração em papel filtro. Os primeiros 20,0 mL foram desprezados. Pesou-se uma alíquota que equivale a 20,0 g, em pesa-filtros previamente tarados, e levou-se à evaporação até a secura em banho-maria, sob agitação. O pesa-filtro foi colocado em estufa a 105 °C por duas horas, resfriado em dessecador e posteriormente pesado. Para determinar o teor de extrativos foi calculada a massa percentual, usando a média de três determinações a partir da equação:

$$TE = \frac{g \times FD \times 100}{m}$$

Sendo: TE= teor de extrativos (%; m/m); g= massa de resíduo seco; m= massa da amostra (g); FD= fator de diluição (5) (Mello e Petrovick, 2000).

4.3.1.4 Doseamento de Polifenóis Totais

Preparo da solução estoque: foram pesados 750 mg da droga vegetal pulverizada e transferida para um erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionados 150 mL de água destilada e levado ao aquecimento em banho maria à 60°C durante 30 min. Depois de resfriado o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 250 mL, o erlenmeyer foi lavado para total transferência do material, e então o volume foi completo com água destilada. Depois de decantar a droga, o líquido foi filtrado em papel filtro, e desprezados os primeiros 50 mL.

Preparo da solução amostra: foram diluídos 5 mL do filtrado em balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Foram transferidos 2 mL dessa solução para balão de 25 mL com 1 mL de reagente

fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada. O volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 14,06%. A absorvância foi determinada em 691 nm após 15 min, utilizando água destilada como branco.

O teor de polifenóis totais foi calculado em porcentagem de polifenóis expressa em pirogalol segundo a expressão:

$$PT = \frac{15625 \times Abs}{1000 \times m}$$

em que:

PT= polifenóis totais (%); Abs= absorvância da amostra; m= massa da droga em grama (Pessuto, 2006).

4.4 Preparação de Extratos Brutos e Frações

4.4.1 Extrato bruto (EB)

Os extratos foram preparados na proporção 10% (m/v) utilizando como líquido extrator acetona: água 7:3 (v/v); etanol: água 96:4 (v/v); etanol: água 70:30 (v/v); etanol: água 50:50 (v/v); e água 100%, em Ultra-turrax® (UTC115KT) durante 20 min, controlando a temperatura ($\leq 40^{\circ}\text{C}$). Em seguida os extratos foram filtrados em pano filtro de nylon com diâmetro de poros de 10 μm e algodão, com o auxílio de uma bomba à vácuo. Depois disso a solução foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com uma temperatura abaixo de 40 $^{\circ}\text{C}$, para que o solvente orgânico fosse eliminado. O extrato concentrado foi deixado em freezer durante 10 dias para que houvesse a decantação da clorofila restante. O extrato foi filtrado e após, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado, obtendo-se então os extratos brutos de *Maytenus ilicifolia* (Pessuto, 2006).

4.4.2 Fração acetato de etila (FAE), fração *n*-butanólica (FnB) e fração aquosa (FAQ)

Uma quantidade determinada do extrato bruto foi ressuspensa em água (proporção 1:10 p/v) e particionado com o mesmo volume de acetato de etila (8 vezes). A fase aquosa (FAQ) e a fase acetato de etila (FAE) foram separadas, concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

A FAQ foi ressuspensa em água e particionada com o mesmo volume de *n*-butanol. A FAQ foi separada da fração *n*-butanólica, ambas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida para completa eliminação do solvente orgânico, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (Pessuto, 2006).

4.5 Análise Quantitativa

4.5.1 Determinação de epicatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

As análises foram realizadas utilizando o equipamento Thermo® HPLC com detector de arranjo de diodos (PDA). Foi realizado um gradiente de eluição em uma coluna Phenomenex® Gemini C-18 (250 mm x 4,6 mm) com partículas de 5 micrometros, com pré-coluna empacotada. A fase móvel consistiu de água acidificada com ácido fórmico (pH 2,5) como solvente A, e acetonitrila acidificada com ácido fórmico (pH 2,5) como solvente B. Ambos os solventes passaram pelo processo de degaseificação. A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL/min utilizando o seguinte gradiente: 0 min 18% B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B. A coluna foi estabilizada à 28 °C, e a leitura no UV/Vis foi realizada no comprimento de onda de 210 nm.

Solução amostra: foi pesado 1,0 g do extrato bruto produzido previamente, e ressuspenso em 10 mL de água ultrapura (MilliQ-Millipore). A solução obtida foi extraída com 10 mL de acetato de etila em funil de separação de 125 mL (7 vezes). Para que houvesse a separação completa das fases, o extrato foi deixado em repouso a -18 °C durante 5 min. As fases orgânicas foram combinadas e filtradas sob pressão reduzida, através de papel filtro com 5 g de Na₂SO₄ anidro. A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se um resíduo. O resíduo foi ressuspenso em 5 mL de metanol e água (2:8; v/v) e extraído em cartucho SPE C8 (55 mm, 70 Å) e armazenado em balão volumétrico de 100 mL. O resíduo sofreu eluição de 10 mL de metanol:água (2:8; v/v) no balão, e o volume foi completado, obtendo a solução S1. Uma alíquota de S1 foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, e o volume completado com metanol:água (1:1; v/v) (S2). A solução S2 foi filtrada em filtro de poro de 0,5 µm, antes da injeção (seringa de 20 µL) (Lopes *et al.*, 2010).

4.6 Avaliação da atividade anti *Helicobacter pylori*

4.6.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CBM)

4.6.1.1 Antimicrobianos Padrões

Foram utilizados como antimicrobianos padrões Amoxicilina (SIGMA cod. A8523) e metronidazol (SIGMA cod. M3761). Estes foram solubilizados em água estéril para preparação de soluções a 5 mg/mL. A partir dessas soluções, foram preparadas as concentrações empregadas nos ensaios de atividade antimicrobiana.

4.6.1.2 Preparação dos Extratos e Frações

Os extratos brutos (EB) bem como as frações (FAQ, FAE e FnB) foram solubilizados em DMSO, sendo que o extrato aquoso foi solubilizado em água estéril.

4.6.1.3 Micro-organismos

O micro-organismo utilizado nos testes foi a bactéria *H. pylori* (cepa ATCC 43504), amoxicilina sensível e metronidazol resistente, foi semeado em placas contendo Ágar Columbia (bioMérieux®), suplementado com 5% de sangue de carneiro, incubadas por 72 h a 36-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂.

4.6.1.4 Desenvolvimento

A CIM foi determinada por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a norma estabelecida por *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI:M7-A6, 2003) com adaptações. A cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI) (Merck®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®), com diversas concentrações dos extratos e frações obtidos por diluição seriada 1:2 (32-1024 µg/mL), e o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* (contendo cerca de 10⁶-10⁷ bactérias/mL). A microplaca foi submetida à leitura espectrofotométrica em 620 nm. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitora de microplacas ELISA iMark Absorbance Reader (Bio-Rad, Washington, USA). Após a leitura, a microplaca foi incubada a temperatura de 36-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por 72 h. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas e nova leitura foi realizada para determinação da CIM. Os testes foram realizados em triplicata, acompanhados de crescimento controle e repetidos no mínimo 3 vezes. A CIM foi definida, graficamente, como sendo a menor concentração do extrato capaz de induzir um brusco declínio no valor da absorvância, inibindo 50% do crescimento bacteriano, o qual foi mantido nas concentrações seguintes.

Para as amostras que apresentaram CIM foi realizado o ensaio para determinar a Concentração Mínima Bactericida (CBM). A CBM é definida como a menor concentração do extrato que inibiu a formação de colônias em placas de Agar Columbia. Neste ensaio a amostra correspondente ao poço da microplaca sem crescimento aparente em BHI foi semeada em placa de Agar Columbia contendo sangue de carneiro 5% (incubada a 37 °C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por 72 h).

4.6.2 Determinação da urease

A atividade de inibição da urease foi determinada pela produção de amônia catalisada pela enzima de acordo com o método descrito por Weatherburn (1967). A mistura reacional em microplaca continha 25 µL de urease 4 UI (Sigma Jack Bean urease tipo III) e 25 µL da amostra em diferentes concentrações (32-1024 µg/mL) e foi incubada por 2 h em temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados, 25 µL de vermelho de fenol (0,02%) e 200 µL de ureia (50 mM) em tampão fosfato 100 mM (pH 6,8). A absorvância da mistura reacional foi lida em 540 nm em leitora de microplacas iMark®, BioRad (Washington, USA) após 20 min. Como padrão de inibição foi utilizado o ácido bórico.

4.7 Ensaios Antioxidantes

Todas as análises foram realizadas no mínimo em triplicata, em microplacas de 96 poços e lidas em espectrofotômetro (Biochrom Asys UVM 340). Para esses ensaios foram escolhidos os extratos e frações que apresentaram melhores resultados nos ensaios anti-*Helicobacter pylori*.

4.7.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A atividade antioxidante dos extratos foi testada em relação à redução do radical DPPH, método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Os extratos e frações de *M. ilicifolia* foram diluídos em metanol e preparados nas concentrações finais de 3,1 a 100,0 µg/mL. Um total de 100 µL de DPPH a 130 µM recém preparada foram adicionados a 100 µL da amostra nas diferentes concentrações. As microplacas foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, para que ocorresse a reação. Depois de 30 min as absorvâncias foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). Controle negativo (metanol adicionado ao DPPH), branco (somente metanol), além do controle positivo (padrão Trolox) foram utilizados.

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = ((\text{Abs CN} - \text{Abs Amostra}) / (\text{Abs CN} - 1)) \times 100$$

Onde: Abs CN é a absorvância do controle negativo; Abs amostra é a absorvância da solução do extrato ou fração.

Com os valores obtidos foi construído um gráfico de percentagem da atividade antioxidante versus concentração dos extratos testados, em µg/mL. Por meio da regressão linear foi calculado o IC₅₀, que é a concentração do extrato com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

4.7.2 FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

Etanol foi utilizado para diluição do padrão Trolox e para o preparo das concentrações dos extratos de *M. ilicifolia* (20 a 100 µg/mL). Para o preparo de reagente FRAP, foi misturado 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-Tri (2-piridil)-S-triazina), 2,5 mL da solução de cloreto de ferro hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM. Incubou-se esta solução a 37 °C em banho-maria por 30 min. Em seguida, foram adicionadas a 150 µL do reagente FRAP, uma alíquota de 30 µL de diferentes concentrações do padrão Trolox ou dos extratos de *M. ilicifolia*. Esta mistura foi homogeneizada e lida em espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Asys UVM 340) a 595 nm, após incubação por 30 min em banho-maria a 37 °C. O equipamento foi zerado com um branco da amostra para descontar uma possível turbidez. Para isto, foram utilizados 150 µL do veículo FRAP (solução igual ao reagente FRAP exceto pela solução de TPTZ) e 30 µL da amostra.

Para determinação da atividade antioxidante total dos extratos de *M. ilicifolia* foi realizada curva de calibração do Trolox (20 µM a 600 µM; $y = 0.0028x + 0.0199$ $R^2 = 0.9993$) e equação da reta obtida a partir das absorvâncias das diferentes diluições dos extratos. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante dos extratos de *M. ilicifolia* equivalente ao Trolox (Teac) (Rufino *et al.*, 2006).

4.8 Caracterização química de extratos semi purificados de *Maytenus ilicifolia* por UHPLC-HRMS

Para as análises das frações, alíquotas de 1 mg/mL de extratos foram analisadas em UHPLC-HRMS (Ultra Performance Liquid Chromatography Untargeted Mixed-Mode Tandem Mass Spectrometry) utilizando um sistema de cromatografia líquida Nexera X2, com bomba LC-30AD e coluna Phenomenex® Gemini C-18 (250 mm x 4,6 mm), mantida a 40 °C, com um gradiente linear de eluição utilizando como solvente (A) água (0,1% de ácido fórmico) e solvente (B) acetonitrila (0,1% ácido fórmico) ambos com grau de pureza LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). A separação cromatográfica foi efetuada em 28 min, com vazão de 0,4 mL/min.

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado na separação dos constituintes dos extratos.

Tempo (min)	Vazão (mL/min)	%A	%B
0,00	0,40	82	18
13,00	0,40	75	25
16,00	0,40	66	34
20,00	0,40	58	42
23,00	0,40	35	65
25,00	0,40	82	18
28,00	0,40	82	18

O espectrômetro de massas utilizado foi do tipo Q-TOF Impact II (Bruker, Germany), com fonte de ionização do tipo *electrospray*, operado com modo de aquisição Auto MS/MS, onde os 3 íons mais intensos de cada pico cromatográfico foram selecionados, com taxa de aquisição de 5 Hz (MS e MS/MS) e tune do equipamento na faixa de m/z 70 – 1500 u. As análises foram realizadas em modo positivo e negativo de ionização, com voltagem do capilar de 4.00 kV; temperatura da fonte 220 °C; e fluxo do gás de dessolvatação 8 L/min. Os experimentos de varredura de íons-produto (*daughter scan*) foram realizados utilizando dissociação induzida por colisão (CID) obtidas utilizando uma rampa de energia de colisão na faixa de 15 – 50 eV e pressão do gás de colisão de $3,06 \cdot 10^{-3}$ mBar, na câmara de colisão.

O cromatograma de íons e os espectros de MS e MS/MS obtidos foram visualizados através do software DataAnalysis 4.4, comparados com a literatura e analisados com auxílio de bancos de dados de espectrometria de massas de acesso livre, como MassBank (Horai *et al.*, 2010).

5 Resultados e Discussão

5.1 Controle de Qualidade da Droga Vegetal

A fonte e a qualidade da matéria prima vegetal são de fundamental importância para garantir a qualidade e a estabilidade, cumprir os requisitos básicos de eficácia e segurança, das preparações que serão feitas utilizando esse material. O controle de qualidade de medicamentos feitos a base de plantas baseia-se numa definição científica clara da matéria prima que é determinada pela identidade, pureza, conteúdo e outras propriedades químicas, físicas ou biológicas (Calixto, 2000; Bandaranayake, 2006).

O controle de qualidade em geral fundamenta-se em três importantes definições: identidade, pureza e conteúdo. Dentro disso avaliam-se diversos fatores como o estado da planta (fresca ou seca), temperatura de secagem, exposição à luz, disponibilidade de água e/ou nutrientes, período e tempo de

coleta, método de coleta, embalagem, armazenamento e transporte, idade e parte da planta coletada. Todos esses parâmetros devem ser avaliados, pois afetam de forma considerável a qualidade e consequentemente o valor terapêutico da planta (Bandaranayake, 2006).

5.1.1 Análises Físico Químicas

5.1.1.1 Perda por secagem

Depois de ter sido coletado, o material foi deixado em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3$) e sombra, até que chegasse ao peso constante, sendo pesado todos os dias, por oito dias. As folhas íntegras de *M. ilicifolia* tiveram uma perda de água e/ou materiais voláteis de $49,93\%\pm 10,41$ ($\text{CV}= 0,21\%$), já as folhas picadas perderam $46,36\%\pm 6,14$ ($\text{CV}= 0,13\%$) (Figura 7).

A presença de água no material vegetal pode favorecer o desenvolvimento de micro-organismos, insetos e deterioração dos constituintes em razão de hidrólise, que podem levar a degradação desse material e dos seus constituintes. Sendo assim é preciso estabelecer limites da quantidade de água que pode estar presente na droga vegetal sem que haja alteração na sua composição, é mais importante para materiais e compostos higroscópicos para que estes não sofram rápida deterioração (Brasil, 1988; WHO, 2011).

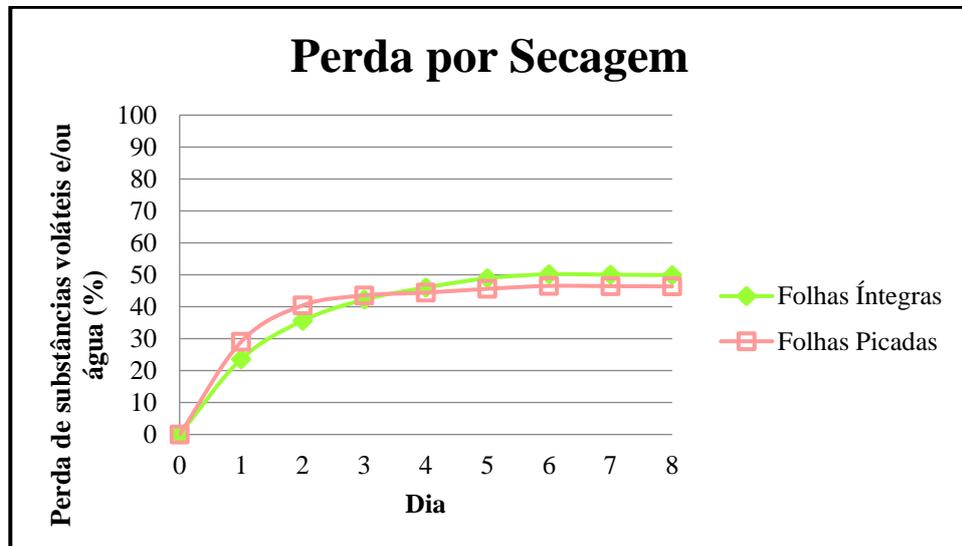


Figura 7. Perda de substâncias voláteis e/ou água de folhas de *Maytenus ilicifolia*. Folhas secas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3$ por 8 dias, sem presença de luminosidade, pesadas diariamente.

5.1.1.2 Perda por dessecação

O resultado para perda por dessecação foi de $9,73\%\pm 0,15$ ($\text{CV}= 0,01\%$). O valor obtido encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (2010).

A perda por dessecação foi realizada utilizando a droga vegetal previamente seca e moída em balança de infravermelho, a fim de determinar o teor de umidade residual. É normal que as drogas vegetais não percam totalmente a água presente nelas e mantenham de 8-12% de umidade, essa quantidade de água não traz prejuízos ao material vegetal. Sendo assim é importante fazer o controle da estabilidade da droga vegetal frente ao período de armazenamento (Montanari Júnior *et al.*, 2004). A Farmacopeia Brasileira (2010) estabelece como máximo de umidade que pode estar presente nas folhas moídas de *M. ilicifolia* de 12%.

Assim concluiu-se que o material vegetal testado estava dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira.

5.1.1.3 Teor de extrativos

Para a determinação do teor de extrativos foram realizadas três determinações obtendo-se o valor médio de 33,17%±0,24 (CV= 0,73%).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2011) o método de teor de extrativos determina a quantidade de constituintes extraídos com determinado solvente de uma quantidade determinada de material vegetal.

O resultado encontrado no presente estudo se assemelha ao resultado encontrado por Pessuto (2006) onde o teor de extrativos encontrado foi de 31,60±0,22 (CV= 0,72).

5.1.1.4 Teor de Polifenóis Totais

O valor médio obtido na análise do teor de polifenóis totais foi de 7,49±0,18 (CV= 2,47%).

A metodologia de determinação de polifenóis totais pela redução do ácido fosfotúngstico formando a coloração azul, é uma das metodologias mais difundidas e mais empregada. O ensaio utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu foi modificado a partir do ensaio de Folin-Denis, que a princípio foi usado para mensurar tirosina em proteínas sendo que todos os fenóis reagiram. Essa metodologia consiste em reações de oxidação-redução, em que o íon fenolato é oxidado, enquanto o ácido fosfotúngstico é reduzido. O cromóforo produzido é um complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico de coloração azul. Esse método é menos propício a interferência de componentes não fenólicos e formação de precipitados. Esse ensaio não é específico para nenhum grupo fenólico, mas serve para quantificar a concentração total de grupos fenólicos (Graham, 1992; Hagerman e Butler, 1994; Singleton *et al.*, 1999; Mueller-Harvey, 2001; Schofield *et al.*, 2001; Blainski, 2010).

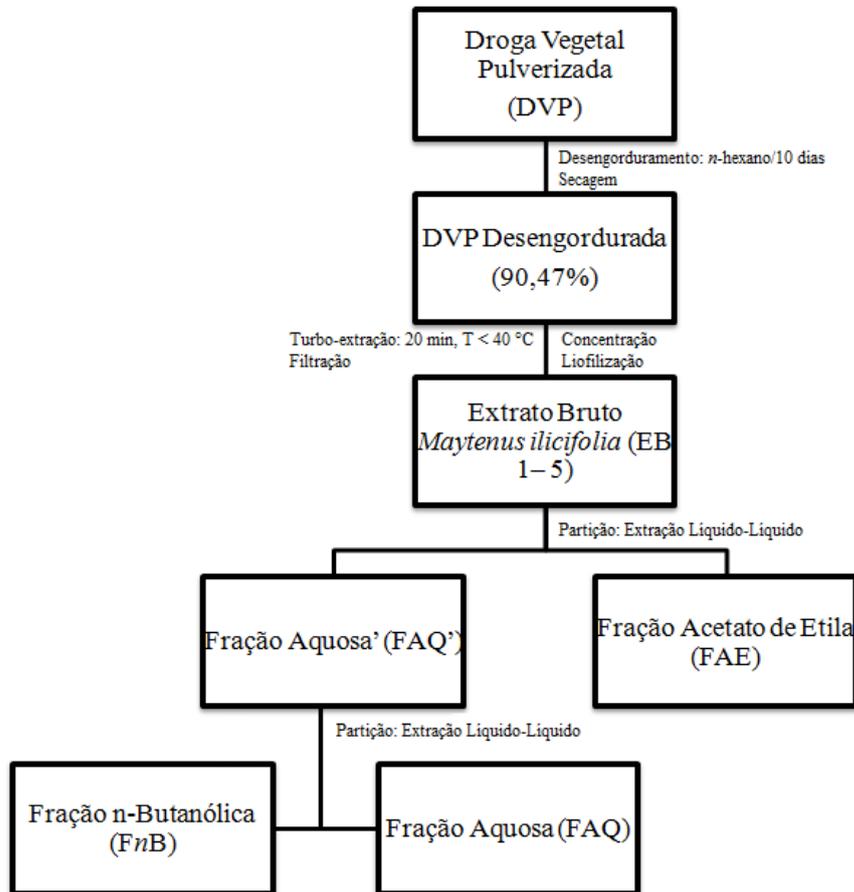
Esse resultado apresenta diferença do encontrado na literatura, já que Radomski (1998) obteve um resultado de 10,3% para folhas de *M. ilicifolia* cultivadas em pleno sol. Porém esses valores não devem ser comparados se considerarmos que as diferenças apresentadas podem ser resultado das

múltiplas variações entre as amostras, tais como local de cultivo, taxa de incidência solar, quantidade de água, nutrientes do solo.

5.2 Preparação de Extratos Brutos e Frações

As folhas de *M. ilicifolia* (13,47 kg) foram coletadas e levadas à estufa de ar circulante para secagem do material, até que as folhas chegassem ao ponto de *biscuit*, quando elas quebram com facilidade ao serem submetidas à fratura, fornecendo um rendimento de 51,6% (6,95 kg) de folhas secas (Montanari Júnior *et al.*, 2004). Após essa etapa as folhas passaram pelo moinho de martelos, a fim de ser feita a diminuição do tamanho das partículas, e facilitar o processo de extração, já que a redução das partículas e o rompimento das células auxiliam o processo extrativo (Falkenberg *et al.*, 2003; Sonaglio *et al.*, 2003).

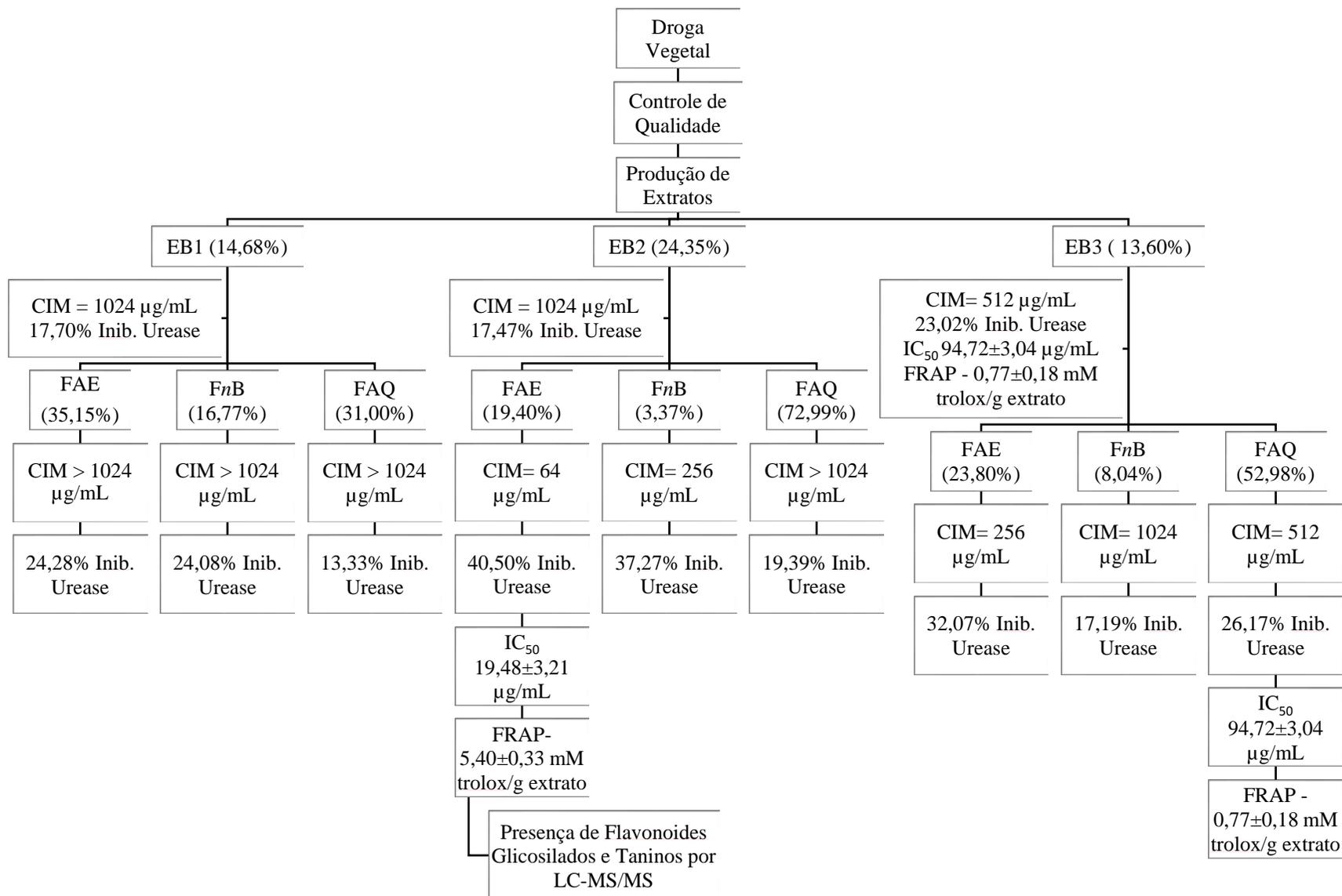
A preparação dos extratos e frações está esquematizada no fluxograma 1.



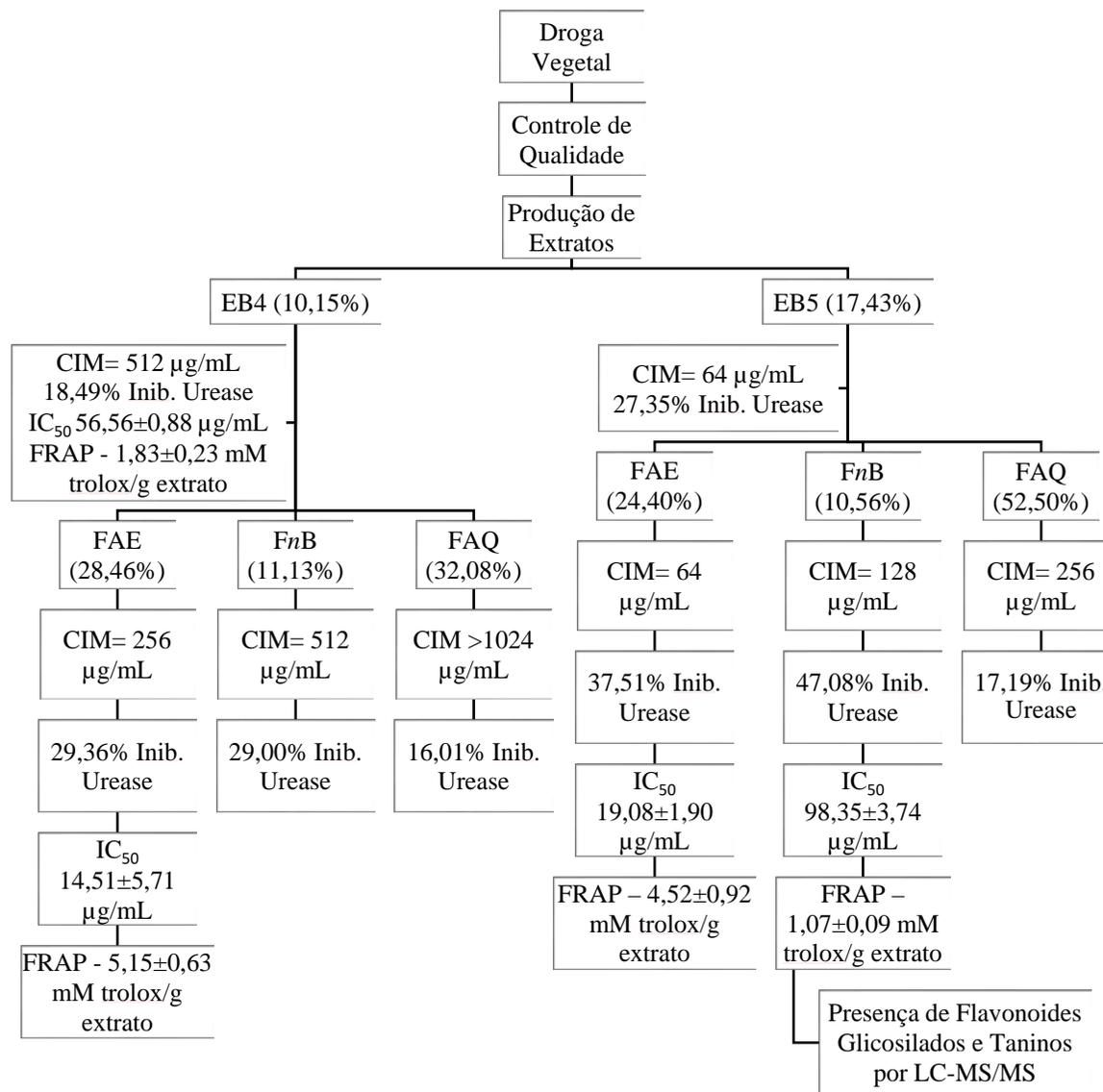
Fluxograma 1. Preparação de extratos e frações semi purificadas de folhas de *Maytenus ilicifolia*.

Enquanto o fluxograma 1 representa a forma de preparação do extrato e frações do presente trabalho, o fluxograma 2 apresenta uma visão geral do trabalho incluindo o rendimento dos extratos até a caracterização de algumas frações semi purificadas.

Fluxograma 2. Visão geral do trabalho realizado, com rendimentos do extrato e frações, substâncias determinadas e atividades biológicas.



Fluxograma 2. Visão geral do trabalho realizado, com rendimentos do extrato e frações, substâncias determinadas e atividades biológicas (Continuação).



5.2.1 Extrato bruto (EB)

Tendo em mente as diferentes propriedades e efetividade dos líquidos extratores, foram feitos cinco extratos, utilizando cinco líquidos extratores: água (1), etanol: água 50:50 (2), etanol: água 70:30 (3), etanol: água 96:4 (4) e acetona: água 7:3 (5).

Os extratos foram preparados pesando 100 g da droga vegetal pulverizada e previamente desengordurada, com 1000 mL do líquido extrator, durante 20 min, sendo que foram mantidos intervalos de 5 min de extração com 5 min de descanso, para controlar a temperatura e esta não exceder 40 °C. Após o processo extrativo, a solução extrativa foi filtrada, concentrada e liofilizada, apresentando os rendimentos apresentados na Tabela 2.

A técnica escolhida para a produção dos extratos foi a turbo-extração. Essa técnica é vantajosa pois é eficiente, simples, rápida e versátil, já que pode ser usada em pequena e média escala. Por outro lado, temos alguns aspectos negativos dessa técnica, um deles é a dificuldade de separar a solução extrativa no momento da filtração, devido ao fato de além da mistura do líquido extrator com a planta esse método também leva a diminuição das partículas do material vegetal. Outro aspecto negativo é a geração de calor, que força o controle da temperatura durante o processo, e com isso também restringe o uso de solventes voláteis (Sonaglio *et al.*, 2003).

Para a extração de taninos em tecidos foliares o líquido extrator mais indicado é a mistura acetona: água. Se os responsáveis pela atividade biológica do extrato são os polifenóis, sua concentração no extrato torna-se uma variável ideal para a escolha do melhor método extrativo. Foi realizado um ensaio comparando a extração feita com etanol ou etanol: água com acetona: água, esta demonstrou melhor capacidade de extração dos compostos de interesse, taninos (Hagerman, 1988).

Segundo estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2010) a droga vegetal deve conter no mínimo 2,8 mg de epicatequina/g de extrato. Os resultados obtidos nesse trabalho apresentaram resultados superiores aos exigidos até mesmo para o extrato aquoso (EB 1) que teve um menor rendimento e a menor concentração de epicatequina ($3,6 \pm 0,02$ mg/g de extrato), conforme valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento e concentração de epicatequina por CLAE dos extratos brutos de folhas de *Maytenus ilicifolia*.

Extrato	Rendimento (%)	Concentração de Epicatequina (mg/g extrato)
EB 1	14,68	3,6±0,02
EB 2	24,35	15,54±0,14
EB 3	13,60	19,63±2,04
EB 4	10,15	16,77±2,14
EB 5	17,43	20,66±1,99

EB 1= extrato bruto aquoso; EB 2= extrato bruto etanol: água 50:50; EB 3= extrato bruto etanol: água 70:30; EB 4= extrato bruto etanol: água 96:4; EB 5= extrato bruto acetona :água 7:3.

5.2.2 Fração acetato de etila (FAE), fração *n*-butanólica (FnB) e fração aquosa (FAQ)

Para obtenção das frações semi purificadas realizou-se uma extração líquido-líquido com acetato de etila e com *n*-butanol, que apresentaram os rendimentos conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento das frações obtidas a partir dos 5 extratos brutos de *Maytenus ilicifolia*.

	EB 1	EB 2	EB 3	EB 4	EB 5
FAE	35,15	19,40	23,80	28,46	24,40
FnB	16,77	3,37	8,04	11,13	10,56
FAQ	31,00	72,99	52,98	32,08	52,59

EB 1= extrato bruto aquoso; EB 2= extrato bruto etanol: água 50:50; EB 3= extrato bruto etanol: água 70:30; EB 4= extrato bruto etanol: água 96:4; EB 5= extrato bruto acetona: água 7:3.

5.3 Avaliação da Atividade Anti-*H. pylori*

5.3.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM)

Os resultados da concentração mínima inibitória para os extratos e frações estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da atividade anti-*H. pylori* (CIM₅₀) dos extratos e frações semi purificadas de *Maytenus ilicifolia*.

CIM ₅₀ (µg/mL±DP)	EB 1	EB 2	EB 3	EB 4	EB 5
EB	1024±2,1	1024±5,1	512±5,6	512±2,2	64±9,8
FAE	> 1024±17,3	64±5,4	256±1,3	256±3,5	64±16,1
FnB	>1024±4,7	256±1,3	1024±2,7	1024±3,2	128±4,0
FAQ	> 1024±4,5	> 1024±0,7	512±1,9	512±5,1	256±8,7

EB 1= extrato bruto aquoso; EB 2= extrato bruto etanol: água 50:50; EB 3= extrato bruto etanol: água 70:30; EB 4= extrato bruto etanol: água 96:4; EB 5= extrato bruto acetona: água 7:3.

De todos extratos brutos avaliados o EB 5 apresentou a melhor atividade inibitória, com CIM₅₀ de 64 µg/mL. Já entre as frações a FAE EB 2 e FAE EB 5 apresentaram a CIM₅₀ de 64 µg/mL. A FnB EB 5 também apresentou boa atividade, com CIM₅₀ de 128 µg/mL. Já as FAQ apresentaram CIM₅₀ superior aos demais extratos e frações.

O fracionamento com acetato de etila, para todos os extratos brutos produzidos com solventes orgânicos (etanol ou acetona), apresentou melhor resultado da atividade anti-*H. pylori*, com menor CIM₅₀ para FAE EB 5 < FAE EB 2 < FAE EB 3 < FAE EB 4 < FAE EB 1.

O rápido crescimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos está ocorrendo mundialmente, colocando em risco a eficácia desses medicamentos, tornando o tratamento das infecções bacterianas um grande desafio (Spellberg e Gilbert, 2014; Ventola, 2015).

Dentre os diversos fatores que levam a essa resistência, dois são os mais relevantes, o mau uso e o uso excessivo dos antibacterianos. Sendo que os primeiros relatos de resistência já foram identificados poucos anos depois do início da era dos antimicrobianos, em meados da década de 1940 entre a população militar, e em 1957 foi identificada resistência múltipla a antimicrobianos. Assim da década de 1960 até 1980 a indústria farmacêutica introduziu no mercado novos antibacterianos com a finalidade de resolver os problemas de resistência. Porém quando o primeiro e até mesmo o segundo esquema terapêutico se mostra limitado e inviável é necessário utilizar antibacterianos mais tóxicos para o paciente e frequentemente mais caros (Watanabe, 1963; Levy, 1982; Gould e Bal, 2013; Sengupta *et al.*, 2013; Lushniak, 2014).

A terapia de escolha para o tratamento da infecção por *H. pylori* é a terapia tripla, que consiste em dois antibacterianos e um inibidor da bomba de próton. Porém esse esquema terapêutico apresenta diversos efeitos adversos ao paciente, como diarreia, náusea, inchaço e distúrbios no paladar, o que pode levar a interrupção do tratamento pelo paciente. Além disso, *H. pylori* tem apresentado resistência aos antibióticos padrão usados no tratamento, a efetividade do tratamento tem decaído à baixos níveis, apenas 18% de sucesso, possivelmente devido ao alto grau de resistência da bactéria à claritomicina.

Em virtude desses aspectos, tratamentos alternativos contra a bactéria estão se tornando mais populares, como a terapia sequencial, terapia quádrupla e a terapia concomitante, com a finalidade de melhorar a efetividade na erradicação da bactéria (Fischbach *et al.*, 2002; Megraud, 2004; Gerrits *et al.*, 2006; Horiki *et al.*, 2009; Graham e Fischbach, 2010; Patel *et al.*, 2014; Thung *et al.*, 2016).

Maytenus ilicifolia é um produto natural que tem informações etnofarmacológicas bem documentadas, com estudos farmacológicos, microbiológicos e fotoquímicos. Em 1922 na Faculdade de Medicina do Paraná alguns pacientes portadores de úlcera gástrica foram tratados com *M. ilicifolia*, sendo o tratamento efetivo. Depois disso diversos estudos mostraram a efetividade de diversos extratos de *M. ilicifolia* ao tratar úlceras gástricas, porém sem chegar a uma conclusão sobre a patogênese da doença (Carlini e Frochtengarten, 1988; Souza-Formigoni *et al.*, 1991; Gonzalez *et al.*, 2001; Tabach e Oliveira, 2003; Jorge *et al.*, 2004; Santos-Oliveira *et al.*, 2009).

Diversos estudos mostram que uma das responsáveis pelas desordens gastroduodenais é a bactéria *H. pylori*. Essa bactéria é aceita como agente causador de gastrite aguda e crônica, bem como um fator predisponente para úlcera péptica, adenocarcinoma e linfoma gástrico. Tem-se gastado muito tempo e esforço na busca de tratamentos alternativos eficazes anti-*H. pylori*, que sejam capazes de intervir na fase inicial da infecção, desde as primeiras etapas da adesão à mucosa gástrica e células epiteliais (Annuk *et al.*, 1999; Suerbaum e Michetti, 2002; Gerrits *et al.*, 2006; Kusters *et al.*, 2006).

Diversos taninos purificados foram testados contra *H. pylori* e demonstraram boa atividade, como a epigalocatequina galato com CIM de 8 µg/mL (Annuk *et al.*, 1999; Mabe *et al.*, 1999).

Considerando os resultados obtidos podemos assumir que o melhor líquido extrator para produção de um extrato bruto, com a finalidade de ser anti-*H. pylori*, é a acetona: água (7:3, v/v), já que foi o extrato bruto que apresentou a menor CIM entre os 5 testados. Esse resultado está de acordo com o que foi encontrado por Njume *et al.* (2011) que fizeram um estudo preliminar com *Sclerocarya birrea* (A.Rich.) Hochst. testando a atividade anti-*H. pylori* de extratos produzidos com água e acetona, sendo que o extrato produzido com acetona apresentou resultados de CIM comparáveis com amoxicilina e metronidazol.

Wang e Huang (2005) fizeram um estudo comparativo utilizando quatro líquidos extratores para produção de extratos de *Plumbago zeylanica* L. que foram testados para atividade anti-*H. pylori*. Esse estudo demonstrou que o extrato produzido com acetona apresentou menor CIM quando comparado com os extratos produzidos com etanol e água.

A FAE e FnB do extrato produzido com acetona também apresentaram uma boa CIM₅₀, que pode ser explicada pelo fato que a produção do EB com a mistura acetona: água favorece a extração de compostos fenólicos (Santos e Mello, 2007).

A produção de extrato bruto com bioativos anti-*H. pylori* são produzidos com sistemas extratores com a presença de solventes orgânicos, álcoois e/ou cetonas. Quando levada em consideração a eficiência do fracionamento desses extratos ricos em bioativos, observou-se que a partição com acetato de etila foi mais eficiente, quando comparada com a extração sequencial da fase aquosa com *n*-butanol.

Popularmente o uso da espinheira-santa se dá pela forma de chá, ou seja, pela infusão das folhas com água. Assim sendo pode-se comparar o EB 1 ao utilizado popularmente para o tratamento de úlceras gástricas, é possível sugerir que mesmo apresentando uma alta CIM₅₀ (1024 µg/mL) o EB 1 apresenta relativa atividade anti-*H. pylori*, sugerindo um dos modos de ação dessa planta quando utilizada pela população (Mariot e Barbieri, 2008).

Para um extrato ser considerado potente a CIM₈₀ deve apresentar valores iguais ou inferiores a 100 µg/mL. Se a CIM₈₀ estiver no intervalo de 100 a 500 µg/mL é considerado um inibidor moderado, já quando a CIM₈₀ no intervalo de 500 a 1000 µg/mL é considerado um inibidor fraco, e acima de 1000 µg/mL é um composto inativo (Holetz *et al.*, 2002).

Silva *et al.* (2015) avaliaram o efeito gastroprotetor e atividade anti-*H. pylori* da fração aquosa do extrato hidroetanólico de folhas de *Terminalia catappa* L. o qual apresentou considerável atividade anti-*H. pylori*, com valores de CIM₉₀ de 125 µg/mL, sendo considerada pelos autores uma importante atividade antimicrobiana.

Em estudos realizados com *Hippocratea celastroides* Kunth foi observada a inibição do crescimento de *H. pylori* com os extratos testados, porém de forma menos efetiva quando comparados aos antimicrobianos de referência (amoxicilina – CIM: 0,01 µg/mL e claritromicina – CIM: 0,5 µg/mL). Porém os valores de CIM dos extratos (7,81-250 µg/mL) foram melhores do que os observados como o metronidazol (CIM= 300 µg/mL) (Hinojosa *et al.*, 2014).

Ao testarem extratos de diversos fungos foi determinado que *Hericium erinaceus* (Bull.) Persoon apresenta compostos bioativos, com atividade significativa na inibição do crescimento de *H. pylori*, sendo que o extrato etanólico, extrato clorofórmico e o extrato de éter de petróleo, apresentaram CIM entre 250 – 500 µg/mL (Liu *et al.*, 2016).

O extrato de pétalas de *Rosa hybridus*, ricas em compostos fenólicos, apresentou uma boa atividade de inibição do crescimento da *H. pylori*, com CIM de 10 µg/mL para fração butanólica e de 100 µg/mL para fração etanólica (Park *et al.*, 2016).

Sabendo-se dos compostos que podem estar presentes nos extratos e frações de *M. ilicifolia*, podemos sugerir que a boa atividade anti-*H. pylori* se dê devido a presença dos compostos fenólicos, tais como taninos e flavonoides.

A atividade antimicrobiana dos polifenóis de plantas medicinais vem sendo intensamente estudada contra diversos micro-organismos. Os resultados dessas investigações tem sido positivos, demonstrando que os compostos fenólicos inibiram o crescimento de vários micro-organismos como *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Campilobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori*, entre outras (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001; Yanagawa *et al.*, 2003; Hirasawa e Takada, 2004; Taguri *et al.*, 2004; Daglia, 2012).

Assim como os resultados no presente estudo, ao avaliar diferentes frações e extratos de *Hypericum perforatum* L., Yeşilada *et al.* (1999) encontraram uma boa atividade anti-*H. pylori* na fração butanólica tanto quando testada em cepas padrão como em isolado clínico.

5.3.2 Determinação da inibição da enzima urease

Foi avaliada a capacidade dos extratos e frações de *M. ilicifolia* de inibirem a enzima urease, os resultados foram apresentados na Tabela 5. O melhor resultado obtido foi com a FnB EB 5 que apresentou uma inibição de 47,08%, seguido pela FAE EB 2 que inibiu a enzima 40,50%. A FnB EB 2 também apresentou uma boa inibição de 37,27%, semelhante a FAE EB 5 que foi 37,51%.

Tabela 5. Resultados da inibição da enzima urease dos extratos e frações semi purificadas de *Maytenus ilicifolia*.

Inibição da Enzima Urease (%±DP)	EB 1	EB 2	EB 3	EB 4	EB 5
EB	17.70±1,3	19.47±3,96	23.02±6,56	18.49±5,54	27.35±3,06
FAE	24.28±0,92	40.50±3,40	32.07±3,55	29.36±1,64	37.51±3,84
FnB	24.08±1,49	37.27±11,97	17.19±3,70	29.00±1,84	47.08±2,85
FAQ	13.33±3,54	19.39±4,61	26.17±2,64	16.01±3,75	17.19±2,79
Ácido Bórico	80 - 90				

EB 1= extrato bruto aquoso; EB 2= extrato bruto etanol: água 50:50; EB 3= extrato bruto etanol: água 70:30; EB 4= extrato bruto etanol: água 96:4; EB 5= extrato bruto acetona: água 7:3.

Um dos fatores de virulência da *H. pylori* é a presença da enzima urease. Esta enzima é a responsável por permitir a bactéria se manter viva no ambiente ácido do estômago. A bactéria desenvolveu essa capacidade por meio da metabolização da ureia em amônia, por meio dessa enzima, deixando o ambiente neutro para o desenvolvimento da *H. pylori* (Weeks et al., 2000).

Xiao *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de inibição da enzima urease de diferentes polifenóis. Aqueles que possuíam o catecol como esqueleto apresentaram as mais potentes atividades inibitórias, variando de 38-94%. Essa atividade foi atribuída aos dois grupos orto-hidroxil presentes no anel aromático das moléculas dos polifenóis, já que os compostos que não apresentaram atividade não possuíam esse grupamento.

A diversidade estrutural dos compostos presentes nas plantas é muito grande, e a atividade que ele vai apresentar contra um micro-organismo está diretamente relacionada da configuração estrutural desse composto. A maioria dos compostos que apresentam atividade antimicrobiana possuem um anel fenólico substituído, sendo que o grupo hidroxila no composto fenólico é o responsável por sua atividade inibitória e sua posição determina a efetividade do composto (Dorman e Deans, 2000; Lai e Roy, 2004; Gyawali e Ibrahim, 2014).

Bae *et al.* (1998) fizeram um estudo com diversas plantas medicinais a fim de determinar quais espécies possuíam atividade anti-*H. pylori*. Apenas três delas (*Cimicifuga heracleifolia* Kom., *Mentha*

arvensis var. *piperascens* Malinv. ex Holmes e *Rhus javanica* L.) foram capazes de inibir a enzima urease, sendo que a que apresentou melhor resultado foi a *C. heracleifolia* com 42% de inibição da enzima.

Levando em consideração que são nas frações obtidas com acetato de etila e *n*-butanol que se encontram maiores concentrações de compostos fenólicos, pode-se sugerir que estes são os principais responsáveis pela atividade apresentada pela *M. ilicifolia*, aliados a boa capacidade antioxidante apresentada por essas frações.

5.4 Ensaios Antioxidantes

Para os ensaios de atividade antioxidante foram selecionados os extratos e frações de *M. ilicifolia* com melhores atividades contra a bactéria *H. pylori*.

5.4.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Os resultados do ensaio de DPPH estão apresentados na Tabela 6. Os valores da atividade antioxidante pelo método de DPPH foram expressos em IC₅₀, que é a concentração de extrato necessária para promover 50% da ação antioxidante.

Os resultados obtidos para o ensaio de DPPH variaram de 14,51 a 98,35 µg/mL. O melhor resultado foi obtido com a FAE EB 4, com IC₅₀ de 14,51 µg/mL, seguida da FAE EB 5 (IC₅₀= 19,08 µg/mL) e FAE EB 2 (IC₅₀= 19,48 µg/mL). A fração que apresentou pior capacidade antioxidante foi a FnB EB 5 com IC₅₀ de 98,35 µg/mL, seguida da FAQ EB 3 (IC₅₀= 94,72 µg/mL).

O termo antioxidante se tornou muito popular ao longo dos anos, e cada vez mais ganha publicidade através da disseminação pela mídia dos seus benefícios para a saúde. A definição mais relevante para o nosso contexto é que antioxidante é uma substância sintética ou natural capaz de prevenir a deterioração do material devido a ação do oxigênio do ar. Os antioxidantes são enzimas ou substâncias orgânicas que são capazes de neutralizar os efeitos prejudiciais do oxigênio em um tecido. A ação do antioxidante pode se dar pela eliminação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, parando assim as reações em cadeia do radical, ou inibindo a formação destes oxidantes (Huang *et al.*, 2005).

Os ensaios para avaliar a capacidade antioxidante de um composto podem ser divididos em duas categorias: (a) ensaios baseados na reação de transferência de átomo de hidrogênio e (b) ensaio baseado na reação da transferência de elétron. Esses ensaios são destinados a medir a capacidade de eliminação do radical livre e não a capacidade antioxidante preventiva da amostra (Huang *et al.*, 2005).

Os polifenóis possuem uma estrutura química ideal para atividade de eliminação de radical livre. Pode-se prever seu bom potencial de ação quando se avaliam suas propriedades de redução e doação de elétron. Para que a sua atividade seja a melhor, o composto precisa apresentar algumas características

estruturais, ou seja, o arranjo dos grupos hidroxila e as substituições nos anéis devem ser observadas, pois alterações podem levar a perda da capacidade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1997).

O DPPH é um dos poucos radicais de nitrogênio estáveis e comercialmente disponíveis. Sua máxima absorção no UV/Vis é em 515 nm, uma de suas características é que a coloração desaparece depois de o radical ser reduzido. A porcentagem de DPPH que não sofre redução é proporcional à concentração do antioxidante, ou seja, a queda na absorvância é proporcional ao efeito antioxidante, por isso é feito o IC₅₀ que irá relacionar quanto do radical resta após o final da reação com a concentração que causou a queda de 50% da concentração inicial de DPPH. É importante levar em conta que ácidos ou bases presentes no solvente podem influenciar o equilíbrio de ionização dos polifenóis levando a um aumento ou diminuição das constantes medidas (Huang *et al.*, 2005).

Tabela 6. Capacidade antioxidante para o método de DPPH de extratos e frações semi purificadas de *Maytenus ilicifolia*.

IC ₅₀ (µg/mL)	EB 2	EB 3	EB 4	EB 5
EB	-	61,16±3,00	56,56±0,88	19,08±1,9
FAE	19,48±3,21	-	14,51±5,71	-
F_nB	-	-	-	98,35±3,74
FAQ	-	94,72±3,04	-	-
Trolox	7,25±0,11			

EB 1= extrato bruto aquoso; EB 2= extrato bruto etanol: água 50:50; EB 3= extrato bruto etanol: água 70:30; EB 4= extrato bruto etanol: água 96:4; EB 5= extrato bruto acetona: água 7:3.

Corsino *et al.* (2003) avaliaram a atividade antioxidante de flavonoides de *M. aquifolium*, e demonstraram que aqueles flavonoides que possuíam o grupo *orto*-hidroxila no anel B apresentavam uma melhor capacidade antioxidante.

Em estudo realizado com *M. guyanensis* Klotzsch ex Reissek, Macari *et al.* (2006) testaram diversos extratos a fim de avaliar sua capacidade antioxidante pelo método de DPPH. Foi observado que os extratos etanólicos apresentaram uma boa capacidade, entretanto o extrato clorofórmico apresentou uma excelente capacidade antioxidante, sugerida pelos autores ser de responsabilidade das substâncias de polaridade intermediária presentes nas cascas.

O extrato bruto hidroetanólico de *M. krukovii* produziu uma inibição dose-dependente no ensaio de DPPH, onde apresentou um IC₅₀ de 38,38 µg/mL. Esse resultado foi considerado melhor do que o obtido com extrato comercial de polifenóis de semente de uva e chá verde, porém menor do que o do Trolox (Bruni *et al.*, 2006).

Ao testar o extrato bruto etanólico de cascas de *M. aquifolium* quanto sua capacidade antioxidante, Velloso *et al.* (2007) encontraram que o extrato foi capaz de inibir 35,5% do radical DPPH.

Silva *et al.* (2009) avaliaram a capacidade de eliminação de radicais livres pelo método de DPPH com extratos de folhas de *M. imbricata* Mart. ex Reissek. Os resultados demonstraram que os extratos produzidos com etanol e acetato de etila, possuíam maior quantidade de polifenóis e uma capacidade antioxidante maior que o ácido gálico e o BHA, que foram usados como padrão.

Shabbir *et al.* (2013) realizaram um estudo completo sobre a espécie *M. royleana* (Wall. ex M.A. Lawson) Cufod., um dos ensaios realizados foi o da capacidade antioxidante por DPPH do extrato e frações das folhas. Os resultados obtidos de IC₅₀ para fração aquosa, fração acetato de etila e fração butanólica foi de 87,21, 55,01 e 58,01 µg/mL respectivamente, sendo que nas frações de acetato de etila e *n*-butanol foram encontrados polifenóis em concentrações superiores a fração aquosa e ao extrato bruto. Os resultados de IC₅₀ foram inferiores quando comparados ao ácido ascórbico, que foi o antioxidante padrão utilizado (IC₅₀= 34,10 µg/mL).

No estudo realizado por Magalhães *et al.* (2011), os autores avaliaram a capacidade antioxidante de diversos extratos das folhas, caules e frutos de *M. salicifolia* Reissek, e foi demonstrado que os extratos das folhas produzidos com hexano, butanol e metanol, assim como o extrato do caule produzido com hexano foram considerados inativos pelo método de DPPH. Já os extratos produzidos com acetato de etila a partir de folhas, caule e polpa do fruto e com metanol a partir de caule e polpa dos frutos apresentaram atividade significativa em concentrações que variaram de 20 a 40 µg/mL.

Pereira Dos Santos *et al.* (2010) realizaram a análise da capacidade antioxidante de substâncias isoladas a partir do extrato produzido com as cascas da raiz de *M. ilicifolia* com diclorometano, pelo método de DPPH. Os flavonoides testados (maitenina e pristimerina) apresentaram capacidade de eliminar os radicais de 61,4 e 22,3% respectivamente, sendo que o composto usado como modelo foi a rutina e apresentou uma capacidade de 82,0%.

Pessuto *et al.* (2009) realizaram estudos com as folhas de *M. ilicifolia* e determinaram IC₅₀ para a fração acetato de etila de um extrato bruto acetona: água (7:3 v/v) de 25,39 µg/mL. Esse valor difere do encontrado no presente estudo, para a fração produzida nas mesmas condições que foi 19,08 µg/mL. Essa diferença pode ser consequência da data da coleta, já que a droga vegetal utilizada nos dois trabalhos foi coletada em anos e épocas diferentes e essas diferenças podem afetar a constituição metabólica na planta, interferindo nos constituintes que apresentam a atividade desejada. Gobbo-Neto e Lopes (2007) afirmam que a época da coleta é um dos principais fatores de influência nos constituintes da planta, já que a natureza dos mesmos não é constante o ano inteiro, além disso a variação de temperatura durante o ano pode interferir na produção dos metabólitos secundários. Outro fator que pode ter influenciado é a idade e o desenvolvimento da planta, que pode levar a variação da concentração e da proporção dos componentes dessa planta.

5.4.2 FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

Os valores da capacidade antioxidante pelo método de FRAP foram expressos em milimol de equivalente de Trolox por grama de extrato e estão apresentados na Tabela 7.

Os resultados obtidos para o ensaio de FRAP variaram de 0,77 a 5,40 mM de trolox/g de extrato. O melhor resultado foi obtido com a FAE EB 2, com 5,40 mM de trolox/g de extrato, seguida da FAE EB 4 (5,15 mM de trolox/g de extrato) e FAE EB 5 (4,52 mM de trolox/g de extrato). A fração que apresentou pior capacidade antioxidante foi a FAQ EB 3 com 0,77 mM de trolox/g de extrato, seguida da FnB EB 5 (1,07 mM de trolox/g de extrato).

Na reação de redução do ferro é utilizado um sal de ferro como oxidante (Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃), sendo que seu potencial redox é comparável ao ensaio de ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). O ensaio é realizado sob condições ácidas, pois o reagente FRAP utilizado é preparado com um tampão acetato (pH 3,6). Nesse ensaio a variação da absorvância encontrada é linearmente proporcional à concentração de antioxidante (Huang *et al.*, 2005).

Tabela 7. Capacidade antioxidante para o método de FRAP de extratos e frações semi purificadas de *Maytenus ilicifolia*.

mM de Trolox/g de Extrato	EB 2	EB 3	EB 4	EB 5
EB	-	1,26±0,075	1,83±0,23	4,52±0.92
FAE	5,40±0,33	-	5,15±0,63	-
FnB	-	-	-	1.07±0.09
FAQ	-	0,77±0,18	-	-

EB 2= extrato bruto etanol: água 50:50; EB 3= extrato bruto etanol: água 70:30; EB 4= extrato bruto etanol: água 96:4; EB 5= extrato bruto acetona: água 7:3.

Soobrattee *et al.* (2008) avaliaram diversas plantas de uso medicinal em Maurício, dentre elas duas pertencentes à família Celastraceae, *Cassine orientalis* (Jacq.) Kuntze e *M. pyria* (Willemet) N. Robson. Foram realizados ensaios para determinar o conteúdo fenólico dos extratos e a capacidade antioxidante. No ensaio de FRAP os resultados foram de 584±5,24 e 190±0,87 µM de trolox/g do extrato.

Pode-se concluir que os compostos extraídos do extrato bruto pelo solvente orgânico têm maior capacidade de eliminar os radicais livres do que aqueles compostos de maior polaridade que permanecem da fração aquosa do extrato.

5.5 Caracterização química de extratos semi purificados de *Maytenus ilicifolia* por UHPLC-HRMS

Com base nos resultados obtidos nos ensaios anti-*H. pylori* e inibição da enzima urease foram escolhidas as duas melhores frações para fazer a caracterização química. Por isso foram escolhidas a FAE EB 2 e FnB EB 5.

Para a análise realizada no modo positivo da FAE EB 2 obteve-se o cromatograma apresentado na figura 8 e para o modo negativo apresentado na figura 9.

As Tabelas 8 e 9 apresentam o tempo de retenção das substâncias da FAE EB 2 separadas pela cromatografia, assim como o íon e os fragmentos correspondentes.

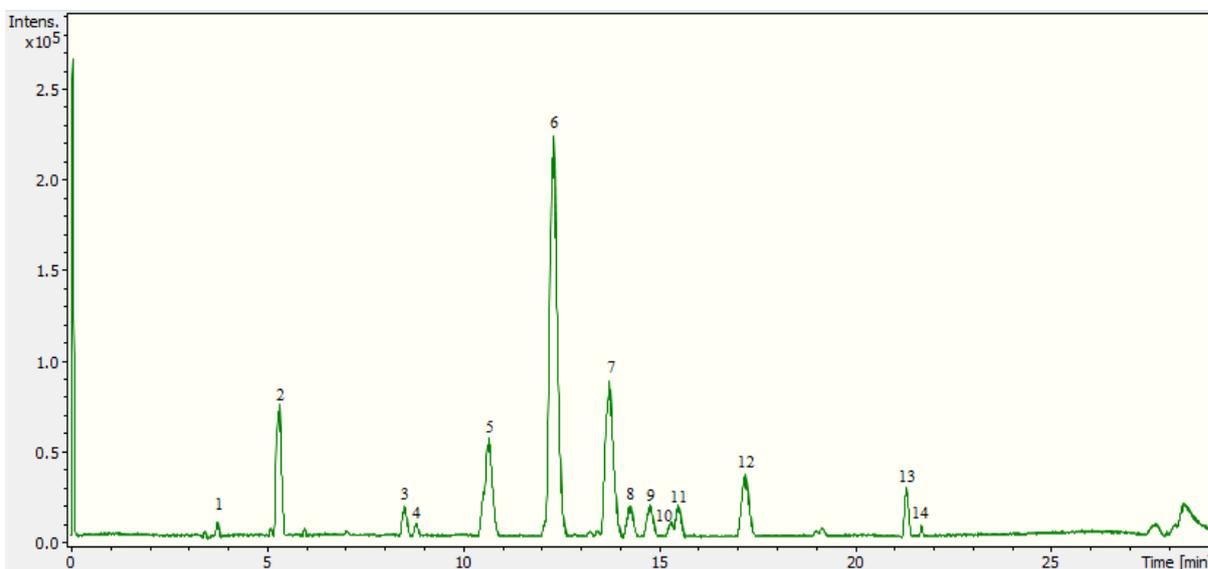


Figura 8. Perfil cromatográfico da FAE EB 2 (etanol: água 50:50) modo positivo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.

Tabela 8. Identificação dos compostos da FAE EB 2 (etanol: água 50:50) detectados por UHPLC-HRMS – modo positivo

Pico	Tempo de Retenção (min)	Íon [M+H] ⁺	Fragmentos principais	Identificação
1	3.75	104	104	n.i.
2	5.34	205	205	n.i.
3	8.53	579	127, 163, 289, 409	n.i.
4	8.87	307	139, 163, 223	(Epi)Galocatequina
5	10.64	579	127, 289, 409, 427	Procianidina B1
6	12.33	291	123, 139, 147, 165, 207	(Epi)Catequina

7	13.76	563	107, 147, 167, 231, 273, 393	(Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina
8	14.24	851	127, 231, 291, 427, 579, 697	n.i.
9	14.78	851	127, 273, 391, 563, 697	(Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina- (Epi)Catequina
10	15.32	-		n.i.
11	15.51	741	85, 287, 449	Canferol-3- Galactosídeo-6- Rhamnosídeo-3- Rhamnosídeo
12	17.21	835	107, 231, 273, 391, 563, 681	(Epi)Afzelequina- (Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina
13	21.34	563	107, 147, 231, 273, 409, 439, 545	(Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina
14	21.71	565	85, 129, 287, 419	Canferol-rhamno- pentosídeo

*n.i.= composto não identificado

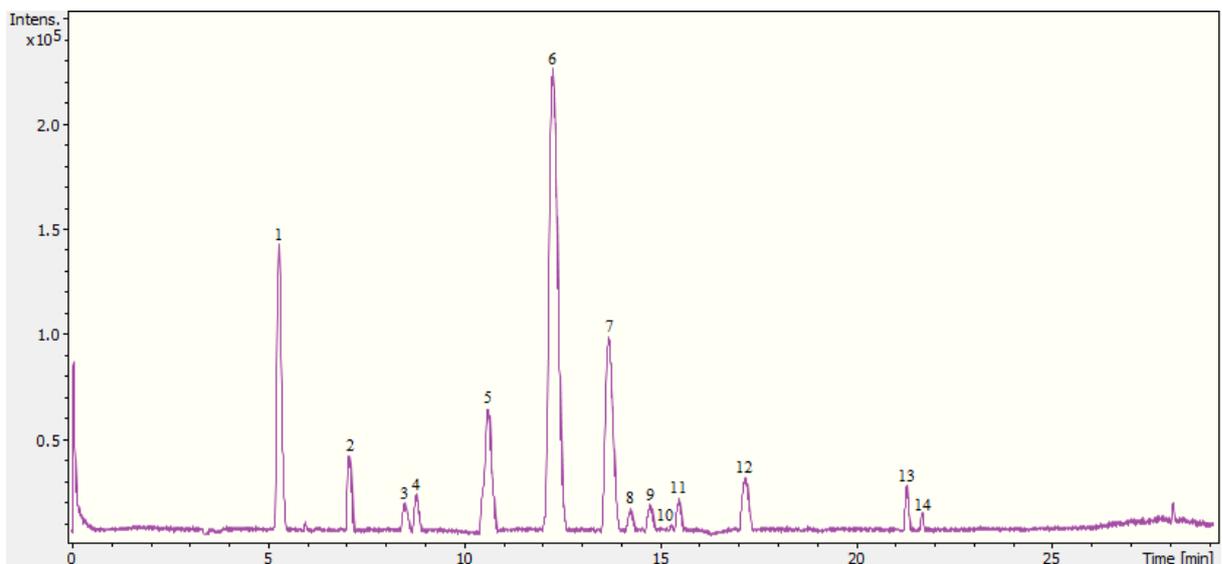


Figura 9. Perfil cromatográfico da FAE EB 2 (etanol: água 50:50) - modo negativo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.

Tabela 9. Identificação dos compostos da FAE EB 2 (etanol: água 50:50) detectados por UHPLC-HRMS – modo negativo

Pico	Tempo de Retenção (min)	Íon [M-H]⁻	Fragmentos principais	Identificação
1	5.29	151	89, 107	n.i.
2	7.07	133	89, 115	n.i.
3	8.50	191	85, 87, 111, 129	n.i.
4	8.83	305	109, 125, 139, 165, 219, 237, 261	(Epi)Galocatequina
5	10.63	577	125, 151, 245, 289, 407, 425, 451	Procianidina B2
6	12.29	289	109, 179, 203, 245	(Epi)Catequina
7	13.70	561	125, 289, 435	(Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina
8	14.25	387	89, 119, 161, 179, 341	n.i.
9	14.77	849	125, 289, 407, 559, 679	(Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina- (Epi)Catequina
10	15.31	833	125, 239, 407, 543	(Epi)Afzelequina- (Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina
11	15.51	739	284	Canferol-3- Galactosídeo-6- Rhamnosídeo-3- Rhamnosídeo
12	17.17	577	125, 161, 289, 407	(Epi)Catequina- (Epi)Catequina
13	21.31	561	289, 435	(Epi)Afzelequina- (Epi)Catequina
14	21.71	563	284	Canferol-rhamno- pentosídeo

*n.i.= composto não identificado.

A análise da F_nB EB 5 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas forneceu os cromatogramas apresentados na figura 10 e 11 para os modos positivo e negativo, respectivamente. Os dados sobre os picos presentes nos cromatogramas como tempo de retenção das

substâncias, íon, fragmentos correspondentes e identificação estão apresentados nas Tabelas 10 para o modo positivo e 11 para o modo negativo.

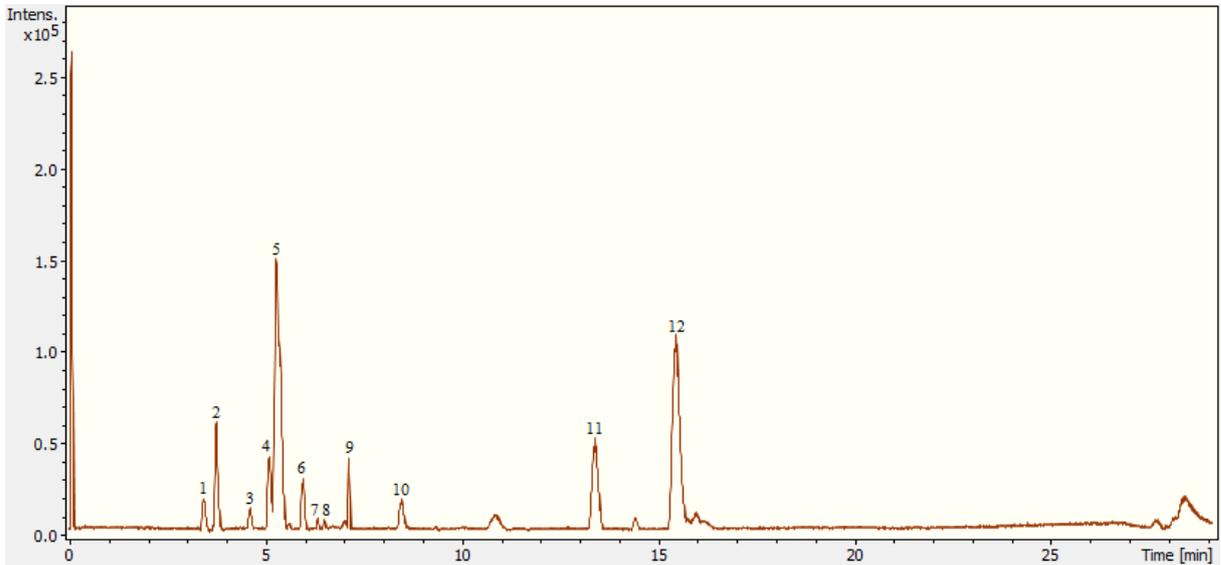


Figura 10. Perfil cromatográfico da *FnB EB 5* (acetona: água 7:3, v/v) - modo positivo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25%B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.

Tabela 10. Identificação dos compostos da *FnB EB 5* (acetona: água 7:3, v/v) detectados por UHPLC-HRMS – modo positivo

Pico	Tempo de Retenção (min)	Íon [M ⁺ H ⁺]	Fragmentos principais	Identificação
1	3.43	127	84, 99, 118	n.i.
2	3.76	104	82	n.i.
3	4.61	268	136	n.i.
4	5.10	183	91, 99, 136, 165	n.i.
5	5.28	205	147	n.i.
6	5.97	287		n.i.
7	6.33	226	85, 103, 124, 180	n.i.
8	6.51	233		n.i.
9	7.12	522	86, 382, 452	n.i.
10	8.47	215	156	n.i.
11	13.40	757	85, 147, 303, 465	Quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosil(1-2)- β -D-glucopiranosídeo-

				7-O- α -L-
				rhamnospiranosídeo
12	15.48	741	85, 147, 287, 449	Canferol-3-
				Galactosídeo-6-
				Rhamnosídeo-3-
				Rhamnosídeo

*n.i.= composto não identificado

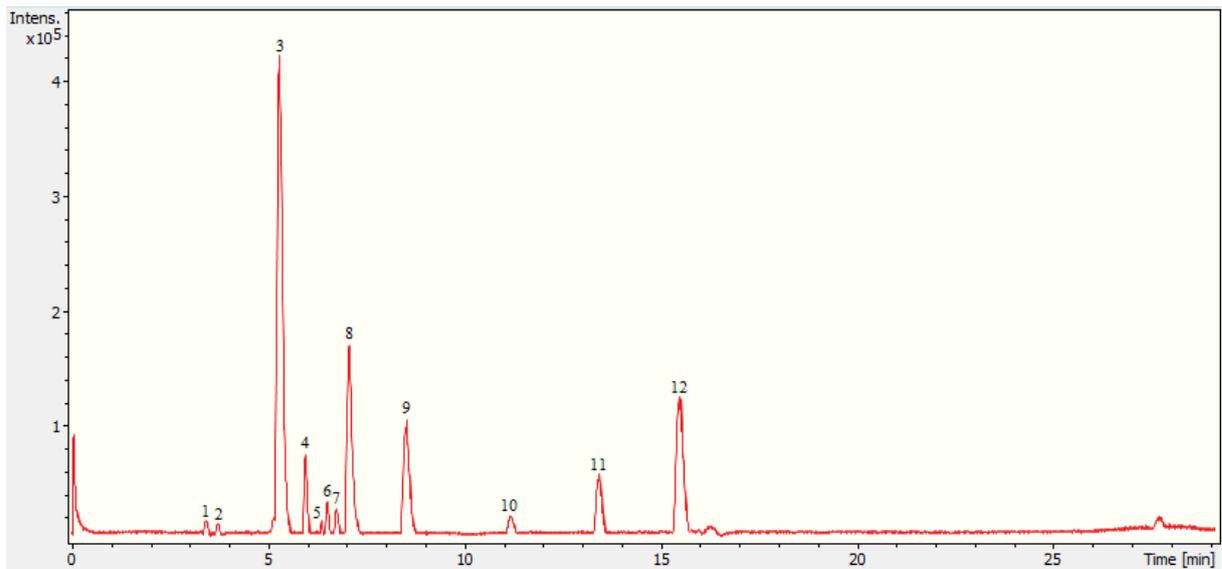


Figura 11. Perfil cromatográfico da F7B EB 5 (acetona: água 7:3, v/v) - modo negativo. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex®, Gemini C-18 (250 mm de diâmetro x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: água (ácido fórmico 0,1%) A e acetonitrila (ácido fórmico 0,1%) B; 0 min 18% de B; 13 min 25% B; 16 min 34% B; 20 min 42% B; 23 min 65% B; 25 min 18% B; 28 min 18% B; vazão 0,4 mL/min.

Tabela 11. Identificação dos compostos da F7B EB 5 (acetona: água 7:3, v/v) detectados por UHPLC-HRMS – modo negativo.

Pico	Tempo de Retenção (min)	Íon [M-H] ⁻	Fragmentos principais	Identificação
1	3.42	387	89,119, 179, 272	n.i.
2	3.77	387	89, 119, 179, 341	n.i.
3	5.30	151	89, 107, 119, 133	n.i.
4	5.97	309	103, 113, 173	n.i.
5	6.38	105		n.i.
6	6.52	209	85, 99, 111, 129, 159	n.i.
7	6.79	267	85, 113, 165	n.i.

8	7.12	223	85, 111, 129, 147, 205	n.i.
9	8.52	191	87, 111, 129	n.i.
10	11.22	203	79, 97, 115, 141	n.i.
11	13.43	755	300	Quercetina-3-O- α -L- rhamnospiranosil(1-2)- β -D-glucopiranosídeo- 7-O- α -L- rhamnospiranosídeo
12	15.49	739	284	Canferol-3- Galactosídeo-6- Rhamnosídeo-3- Rhamnosídeo

*n.i.= composto não identificado

Na FAE EB 2 foram caracterizados alguns taninos como (epi)catequina, procianidina, (epi)galocatequina, e alguns dímeros como (epi)afzelequina-(epi)catequina, (epi)catequina-(epi)catequina, e trímeros como (epi)afzelequina-(epi)afzelequina-(epi)catequina, (epi)afzelequina-(epi)catequina-(epi)catequina.

Esses resultados podem representar que a atividade apresentada pelas frações está relacionada aos compostos fenólicos, já que diversos autores demonstraram que a razão da atividade de extratos de plantas se dá pela presença desses compostos.

Ao longo dos anos diversos trabalhos têm demonstrado a presença de flavonoides e taninos em extratos de *M. ilicifolia*, os quais são considerados responsáveis pela atividade biológica (Martins *et al.*, 2003).

A presença de epicatequina em extratos de *M. ilicifolia* já foi constatada em diversos estudos que separaram e quantificaram epicatequina a partir de extrato aquoso de folhas de *M. ilicifolia* (Soares *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2010; Marcucci *et al.*, 2013).

De Souza *et al.* (2008) realizaram o isolamento e caracterização do extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia* e encontraram dentre os compostos epicatequina, que foi identificada por comparação com um padrão do composto. Além de monômeros foram identificados diversos dímeros e trímeros, assim como os caracterizados pelo presente estudo.

Leite *et al.* (2010) isolaram epicatequina a partir de extrato hexânico de folhas de *M. ilicifolia*. Pessuto *et al.* (2009) isolaram a partir de extrato acetona: água (7:3, v/v) de folhas de *M. ilicifolia* diversos compostos, dentre eles epicatequina, procianidina B1 e B2.

Estes dados confirmam a caracterização desses compostos propostos no presente trabalho, já que as mesmas substâncias foram isoladas e caracterizadas em diversos trabalhos realizados com a espécie.

Foram caracterizados no presente estudo flavonoides glicosilados como: canferol-rhamnopentosídeo, canferol-3-galactosídeo-6-rhamnosídeo-3-rhamnosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosil(1-2)- β -D-glucopiranosídeo-7-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo.

Inúmeros trabalhos têm relatado a presença de flavonoides glicosilados em espécies de *Maytenus*. Sannomiya *et al.* (1998) identificaram um flavonoide glicosilado presente na infusão aquosa de folhas de *M. aquifolium*. Vilegas *et al.* (1999) caracterizaram dois flavonoides tetrassacarídeos a partir de infusão aquosa das folhas de *M. aquifolium*.

Leite *et al.* (2001) demonstraram a ocorrência de quatro flavonoides glicosilados em *M. aquifolium* e *M. ilicifolia*, sendo compostos de 3-*O*-glicosídeos da quercetina e do canferol. Leite *et al.* (2010) isolaram outros compostos tri-glicosilados de infusão das folhas de *M. ilicifolia*.

6 Conclusão

Com este estudo foi possível traçar um perfil de diferentes extratos produzidos a partir do material vegetal de um mesmo indivíduo. Foi possível propor o melhor método de extração com base no rendimento de cada extrato e na concentração de epicatequina em cada extrato. Sendo assim pode-se concluir que o melhor sistema de extração são a mistura etanol: água 50:50 (v/v) e acetona: água 7:3 (v/v).

As amostras que apresentaram melhor atividade inibitória contra a bactéria *H. pylori* foram as frações acetato de etila dos extratos produzidos com etanol: água 50:50 e acetona: água 7:3, e a fração *n*-butanólica do extrato acetona: água 7:3. No teste da inibição da enzima urease foi observada a maior porcentagem de inibição na fração *n*-butanólica do extrato de acetona: água 7:3, seguida da fração acetato de etila do extrato de etanol: água 50:50. Com isso pode-se concluir que a *M. ilicifolia* apresenta atividade anti-*Helicobacter pylori*.

Quando testada a capacidade antioxidante os melhores resultados foram para algumas frações acetato de etila e os piores resultados para fração aquosa. Foram detectados diversos compostos fenólicos como epicatequina, procianidinas B1 e B2, dímeros e trímeros mono e diidroxilados no anel B de taninos condensados e também flavonoides glicosilados.

Este trabalho permitiu a identificação de alguns compostos presentes nas folhas de *M. ilicifolia*, atestar a capacidade antioxidante de alguns extratos, bem como observar a atividade anti-*H. pylori*.

REFERÊNCIAS

- AMIEVA, M. R.; EL-OMAR, E. M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 134, n. 1, p. 306-323, 2008. ISSN 0016-5085.
- ANNUK, H. et al. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 172, n. 1, p. 41-5, Mar 01 1999. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking).
- ARAÚJO JÚNIOR, R. F. D. et al. *Maytenus ilicifolia* dry extract protects normal cells, induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human cancer cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 238, n. 11, p. 1251-1258, 2013. ISSN 1535-3702.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015. ISSN 0734-9750.
- AXON, A. *Helicobacter pylori* and public health. **Helicobacter**, v. 19, n. s1, p. 68-73, 2014. ISSN 1523-5378.
- AYRES, M. P. et al. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. **Ecology**, v. 78, n. 6, p. 1696-1712, 1997. ISSN 1939-9170.
- BAE, E.-A. et al. Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Herbal Medicines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 9, p. 990-992, 1998. ISSN 0918-6158.
- BAGGIO, C. H. et al. *In vivo/in vitro* studies of the effects of the type II arabinogalactan isolated from *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek on the gastrointestinal tract of rats. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 67, n. 7-8, p. 405-410, 2012. ISSN 1865-7125.
- BANDARANAYAKE, W. M. Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs. **Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**, p. 25-57, 2006. ISSN 3527609989.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.
- BLAINSKI, A. **Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade in vivo de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) - Baicuru**. 2010. 134 (Mestrado). Departamento de Farmácia e Farmacologia - Programa de Pós Graduação e Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. ISSN 0023-6438.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira 4ª Edição. Parte 1**. São Paulo, SP: Atheneu Editora. 4.2.3 1988.
- _____. **Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Decreto Nº 5.813**. EXECUTIVO., P. Brasília, DF: Diário Oficial da União. 5.813: 2 p. 2006.
- _____. **Farmacopeia Brasileira 5ª Edição**. Brasília, DF: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2: 922-927 p. 2010.
- _____. MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília, DF, 2017a. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: Feb. 2018.
- _____. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, Brasília, DF: Ministério da Saúde: 230 p. 2017b.
- BRASIL, F. D. Celastraceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB82>>. Acesso em: 27 out.

- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-33, Nov 1998. ISSN 0029-6643 (Print) 0029-6643 (Linking).
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040&nrm=iso>.
- BRUNI, R. et al. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. **Fitoterapia**, v. 77, n. 7-8, p. 538-45, Dec 2006. ISSN 0367-326X (Print) 0367-326X (Linking).
- CALIXTO, J. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000. ISSN 0100-879X.
- CAMPAROTO, M. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002. ISSN 1415-4757.
- CANSIAN, R. et al. Antioxidant and genotoxic properties of *Maytenus dasyclada*: a comparative study in relation to *Maytenus* reference species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 471-476, 2015. ISSN 1519-6984. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842015000200031&nrm=iso>.
- CARLINI, E.; FROCHTENGARTEN, M. Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). pg: 67-73. **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia*" Espinheira-santa" e outras)**. CEME/AFIP. Brasília, DF, 1988.
- CARVALHO-OKANO, R. D. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico. 1992, 253 p.** 1992. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- CASTILLO-JUAREZ, I. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 402-5, Mar 18 2009. ISSN 1872-7573 (Electronic) 0378-8741 (Linking).
- CHANG, J. Y. et al. Triple therapy versus sequential therapy for the first-line *Helicobacter pylori* eradication. **BMC Gastroenterology**, v. 17, n. 1, p. 16, 2017. ISSN 1471-230X.
- CHAVEZ, H. et al. New phenolic and quinone-methide triterpenes from *Maytenus amazonica*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 434-6, Mar 1999. ISSN 0163-3864 (Print) 0163-3864 (Linking).
- CHOWDHURY, A. et al. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 50-9, Mar 2016. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking).
- CHUN, S.-S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005. ISSN 1359-5113.
- COGO, L. L. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 304-309, 2010. ISSN 1517-8382. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822010000200007&nrm=iso>.
- CORSINO, J. et al. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 137-140, 1998. ISSN 0031-9422.
- CORSINO, J. et al. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 8, p. 913-916, 2003. ISSN 1099-1573.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. . Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013. ISSN 0304-4165.

- CRESTANI, S. et al. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. **Vascular Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 57-63, 2009. ISSN 1537-1891.
- CUNHA-LAURA, A. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* on reproduction and embryo-fetal development in Wistar rats. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3711-20, May 09 2014. ISSN 1676-5680 (Electronic) 1676-5680 (Linking).
- CURTI, V. et al. Modulation of human miR-17-3p expression by methyl 3-O-methyl gallate as explanation of its *in vivo* protective activities. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 9, p. 1776-84, Sep 2014. ISSN 1613-4133 (Electronic) 1613-4125 (Linking).
- D'ANDREA, G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 2015. ISSN 0367-326X.
- DA SILVA, M. S. et al. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 5, p. 500-503, 2008. ISSN 0305-1978.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012. ISSN 0958-1669.
- DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607-615, 2012. ISSN 1470-2045.
- DE OLIVEIRA, D. M. et al. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 8, p. 661-665, 2006. ISSN 0305-1978.
- DE SOUZA, L. M. et al. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 59-67, 2008. ISSN 0731-7085.
- DENG, Y.-T. et al. Condensed tannins from *Ficus altissima* leaves: structural, antioxidant, and antityrosinase properties. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1092-1099, 2016. ISSN 1359-5113.
- DIAS, K. S. et al. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark. **Fitoterapia**, v. 78, n. 7, p. 460-464, 2007. ISSN 0367-326X.
- DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000. ISSN 1365-2672.
- DOS SANTOS, V. et al. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, 2013.
- ECKER, A. et al. Safety evaluation of suprathreshold dose of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek extracts on fertility and neurobehavioral status of male and pregnant rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 160-169, 2017. ISSN 0273-2300.
- EL-OMAR, E. M. et al. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. **Gastroenterology**, v. 113, n. 1, p. 15-24, 1997. ISSN 0016-5085.
- EL-OMAR, E. M. et al. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 3, p. 681-691, 1995. ISSN 0016-5085.
- ESTEVAM, C. D. S. et al. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart.(Celastraceae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 299-303, 2009. ISSN 1981-528X.
- EUSEBI, L. H.; ZAGARI, R. M.; BAZZOLI, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 19, n. s1, p. 1-5, 2014. ISSN 1523-5378.
- FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. Suppl 1, p. 69, 2001.

- FALKENBERG, M. D. B.; SANTOS, R. D.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 229-245, 2003.
- FANTINI, M. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9236-9282, 2015.
- FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965, 1985.
- FENG, L. et al. Sequential therapy or standard triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: an updated systematic review. **American Journal of Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. e880-e893, 2016. ISSN 1075-2765.
- FERNÁNDEZ DE LA TORRE, A. et al. Estudio fitoquímico preliminar y actividad fungicida de corteza de *Maytenus urquiolae* Mory (Celastraceae). **Fitosanidad**, v. 14, p. 247-252, 2010. ISSN 1562-3009. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092010000400008&nrm=iso>.
- FIGUEROA-ESPINOZA, M. C. et al. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 178, p. 38-44, 2015. ISSN 0308-8146.
- FISCHBACH, L. A. et al. Sources of variation of *Helicobacter pylori* treatment success in adults worldwide: a meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 1, p. 128-139, 2002. ISSN 0300-5771.
- FYHRQUIST, P. et al. Antimycobacterial activity of ellagitannin and ellagic acid derivate rich crude extracts and fractions of five selected species of *Terminalia* used for treatment of infectious diseases in African traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 90, p. 1-16, 2014. ISSN 0254-6299.
- GATTA, L. et al. Global eradication rates for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of sequential therapy. **British Medical Journal**, v. 347, p. f4587, 2013. ISSN 1756-1833.
- GERRITS, M. M. et al. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 11, p. 699-709, 2006. ISSN 1473-3099.
- 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. ISSN 0100-4042.
- GONZALEZ, F. et al. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2001. ISSN 0378-8741.
- GOULD, I. M.; BAL, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 185-191, 2013. ISSN 2150-5594.
- GRACIA, A. et al. Involvement of miR-539-5p in the inhibition of de novo lipogenesis induced by resveratrol in white adipose tissue. **Food & Function**, v. 7, n. 3, p. 1680-1688, 2016.
- GRAHAM, D. Y.; FISCHBACH, L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. **Gut**, v. 59, n. 8, p. 1143-1153, 2010. ISSN 0017-5749.
- GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992. ISSN 0021-8561.
- GROOTAERT, C. et al. Cell systems to investigate the impact of polyphenols on cardiovascular health. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9229-9255, 2015.
- GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. ISSN 1741-427X.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014. ISSN 0956-7135.
- HAGERMAN, A. E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 2, p. 453-461, 1988. ISSN 0098-0331.

- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. [42] Assay of condensed tannins or flavonoid oligomers and related flavonoids in plants. **Methods in Enzymology**, v. 234, p. 429-437, 1994. ISSN 0076-6879.
- HEYWOOD, V. H. et al. **Flowering Plants: A concise pictorial guide**. Kew: Royal Botanic Garden, 2011.
- HINOJOSA, W. I. E. et al. Anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of methanolic extracts of five different populations of *Hippocratea celastroides* collected in Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1156-1163, 2014. ISSN 0378-8741.
- HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 225-229, 2004. ISSN 1460-2091.
- HO, C.-T. et al. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. **Preventive Medicine**, v. 21, n. 4, p. 520-525, 1992. ISSN 0091-7435.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. ISSN 0074-0276.
- HOOI, J. K. et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. **Gastroenterology**, 2017. ISSN 0016-5085.
- HORAI, H. et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010. ISSN 1096-9888.
- HORIKI, N. et al. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. **Helicobacter**, v. 14, n. 5, p. 438-442, 2009. ISSN 1523-5378.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005. ISSN 0021-8561.
- HUNT, R. et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. **Journal of Gastrointestinal and Liver Disease**, v. 20, n. 3, p. 299-304, 2011.
- HUSSAIN, Z. et al. Self-assembled polymeric nanoparticles for percutaneous co-delivery of hydrocortisone/hydroxytyrosol: an *ex vivo* and *in vivo* study using an NC/Nga mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, n. 1, p. 109-119, 2013. ISSN 0378-5173.
- INCA. Tipos de câncer - Estômago. Rio de Janeiro - RJ, 2017. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao+>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2017.
- ITOKAWA, H. et al. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3713-3716, 1991. ISSN 0031-9422.
- ITOKAWA, H. et al. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 47, p. 6881-6882, 1990. ISSN 0040-4039.
- JARADAT, N. A. et al. Phytochemical and biological properties of four *Astragalus* species commonly used in traditional Palestinian medicine. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 9, p. 1-8, 2017. ISSN 1876-3820.
- JOLY, A. B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.
- JORGE, R. et al. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004. ISSN 0378-8741.
- KAO, C.-Y.; SHEU, B.-S.; WU, J.-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 1, p. 14-23, 2016. ISSN 2319-4170.
- KENNEDY, M. L. et al. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 26, p. 4668-4676, 2001. ISSN 0022-2623.

- KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R. M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. p.147-166.
- KUBOTA, S. *et al*. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 7, p. 3512-9, Jul 2009. ISSN 1552-5783 (Electronic) 0146-0404 (Linking).
- KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 449-490, 2006. ISSN 0893-8512.
- LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1451-1460, 2004. ISSN 0929-8673.
- LEITE, J. P. V. *et al*. Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 2, p. 248-254, 2010. ISSN 0103-5053.
- LEITE, J. P. V. *et al*. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3796-3801, 2001. ISSN 0021-8561.
- LEVY, S. Microbial resistance to antibiotics: an evolving and persistent problem. **The Lancet**, v. 320, n. 8289, p. 83-88, 1982. ISSN 0140-6736.
- LIU, J.-M. *et al*. Sequential versus triple therapy for the first-line treatment of *Helicobacter pylori*: a multicentre, open-label, randomised trial. **The Lancet**, v. 381, n. 9862, p. 205-213, 2013. ISSN 0140-6736.
- LIST, T. P. The Plant List (2013). Version 1.1. . Published on the Internet, 2017. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 27 out. .
- LIU, J.-H. *et al*. Anti-*Helicobacter pylori* activity of bioactive components isolated from *Hericium erinaceus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 54-58, 2016. ISSN 0378-8741.
- LONGHI, R. A. **Livro das Árvores: Árvores e arvoretas do Sul**. Porto Alegre, RS: L&PM Editores, 1995.
- LOPES, G. C. *et al*. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 781-788, 2010. ISSN 0102-695X.
- LUSHNIAK, B. D. Antibiotic resistance: a public health crisis. **Public Health Reports**, v. 129, n. 4, p. 314-316, 2014. ISSN 0033-3549.
- MA, F. *et al*. Screening test for anti-*Helicobacter pylori* activity of traditional Chinese herbal medicines. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 44, p. 5629-34, Nov 28 2010. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327 (Linking).
- MABE, K. *et al*. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1788-1791, 1999. ISSN 0066-4804.
- MACARI, P. D. A. T.; PORTELA, C. N.; POHLIT, A. M. Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch.(Celastraceae) bark extracts. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 4, p. 513-518, 2006. ISSN 0044-5967.
- MAGALHÃES, C. G. *et al*. *Maytenus salicifolia* Reissek, Celastraceae: triterpenes isolated from stems and antioxidant property of extracts from aerial parts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 415-419, 2011. ISSN 0102-695X.
- MAGALHÃES, P. M. **Agrotecnologia para o cultivo da espinheira santa**. CPQBA-UNICAMP. Campinas, SP 2002.
- MANYI-LOH, C. E.; CLARKE, A. M.; NDIP, R. N. Detection of phytoconstituents in column fractions of n-hexane extract of Goldcrest honey exhibiting anti-*Helicobacter pylori* activity. **Archives of Medical Research**, v. 43, n. 3, p. 197-204, Apr 2012. ISSN 1873-5487 (Electronic) 0188-4409 (Linking).

- MARCUCCI, M. et al. Utilização da Espectrometria de Massas e Análise Multivariada para a Confirmação da Autenticidade de Fitoterápicos Contendo *Maytenus ilicifolia*. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 6, n. 01, p. 7-16, 2013. ISSN 2446-4775.
- MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. O conhecimento popular associado ao uso da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 666-668, 2008. ISSN 1980-4849.
- MARTINS, A. G.; GUTERRES, S. S.; ORTEGA, G. G. Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from leaf extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 22, 2003.
- MAZZA, M.; DOS SANTOS, J.; MAZZA, C. D. S. Fenologia reprodutiva de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) na Floresta Nacional de Irati, Paraná, Brasil. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2011.
- MAZZOLIN, L. P. et al. *Qualea parviflora* Mart.: an integrative study to validate the gastroprotective, anti-diarrheal, anti-hemorrhagic and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 508-14, Feb 03 2010. ISSN 1872-7573 (Electronic) 0378-8741 (Linking).
- MEGRAUD, F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. **Gut**, v. 53, n. 9, p. 1374-1384, 2004. ISSN 0017-5749.
- MELLO, J. C. P. D.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC.(Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-5, 2000. ISSN 0326-2383.
- MELO, S. D. F. et al. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 496, n. 1, p. 33-38, 2001. ISSN 1383-5718.
- MONACHE, F. et al. A methylated catechin and proanthocyanidins from the Celastraceae. **Phytochemistry (UK)**, v. 15, n.4, p. 573-574, 1976.
- MONTANARI JÚNIOR, I. et al. Cultivo de espinheira-santa. **SILVA, SR Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: Maytenus spp., espinheira-santa. Brasília: IBAMA**, p. 163-181, 2004.
- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, n. 2, p. 171-175, 2002. ISSN 0010-7824.
- MOREY, A. T. et al. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2016. ISSN 1389-2010.
- MOSSI, A. et al. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 339-345, 2009. ISSN 1519-6984.
- MOSSI, A. J. et al. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 168-178, 2004. ISSN 0367-326X.
- MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 3-20, 2001. ISSN 0377-8401.
- MUÑOZ, O. et al. The Celastraceae from Latin America Chemistry and Biological Activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 18, p. 739-783, 1996.
- NAASANI, I. et al. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Research**, v. 63, n. 4, p. 824-30, Feb 15 2003. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking).
- NISHIZAWA, K. et al. Some biologically active tannins of *Nuphar variegatum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2491-2494, 1990. ISSN 0031-9422.
- NJUME, C.; AFOLAYAN, A. J.; NDIP, R. N. Preliminary phytochemical screening and in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of acetone and aqueous extracts of the stem bark of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae). **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 3, p. 252-257, 2011. ISSN 0188-4409.

- NÚÑEZ, M. J. et al. Insecticidal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus chiapensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 1, p. 14-18, 2004. ISSN 0163-3864.
- OHSAKI, A. et al. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 469-71, Mar 2004. ISSN 0163-3864 (Print) 0163-3864 (Linking).
- OLIVEIRA, M. G. M. et al. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 29-41, 1991. ISSN 0378-8741.
- ORABI, K. Y. et al. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 3, p. 475-480, 2001. ISSN 0031-9422.
- OTTEMANN, K. M.; LOWENTHAL, A. C. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 1984-1990, 2002. ISSN 0019-9567.
- PARK, D. et al. Antimicrobial activities of ethanol and butanol fractions of white rose petal extract. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 76, p. 57-62, 2016. ISSN 0273-2300.
- PARKIN, D. M. International variation. **Oncogene**, v. 23, n. 38, p. 6329-6340, 2004. ISSN 0950-9232.
- PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection—a brief review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 5, p. 429-437, 2014. ISSN 1684-1182.
- PELETEIRO, B. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, n. 8, p. 1698-1709, 2014. ISSN 0163-2116.
- PEREIRA DOS SANTOS, D. et al. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 6956-6973, 2010.
- PESSUTO, M. B. **Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante**. 2006. 105 (Master). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- PESSUTO, M. B. et al. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, p. 412-416, 2009. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000200027&nrm=iso>.
- POSER, G. L. V. A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, RS: Editora Artmed, 2017. p.23-28.
- POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, 2007.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001. ISSN 1365-2672.
- QUEIROGA, C. L. et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3beta-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 465-8, Oct 2000. ISSN 0378-8741 (Print) 0378-8741 (Linking).
- RADOMSKI, M. I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa - Paraná**. 1998. 108 (Master). Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002. ISSN 0167-7799.

- RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001. ISSN 0102-695X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2001000200001&nrm=iso>.
- RAYMUNDO, T. M. et al. Genotoxicity of the medicinal plant *Maytenus robusta* in mammalian cells *in vivo*. **Genetics and Molecular Research Journal**, v. 11, n. 3, p. 2847-54, Aug 24 2012. ISSN 1676-5680 (Electronic) 1676-5680 (Linking).
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997. ISSN 1360-1385.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996. ISSN 0891-5849.
- RODRIGUES, C. G. et al. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw.(Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 35, p. 1095-1100, 2014. ISSN 1996-0875.
- ROZZA, A. L. et al. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and beta-pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E(2). **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, n. 1-2, p. 82-9, Jan 15 2011. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking).
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP) (in Portuguese)**. . In Comunicado técnico online ed.; Fortaleza: EMBRAPA 2006.
- SADIK, C. D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 773-781, 2003. ISSN 0006-2952.
- SALEEM, A. et al. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 3, p. 327-336, 2002. ISSN 0378-8741.
- SANNOMIYA, M. et al. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 237-239, 1998. ISSN 0031-9422.
- SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 650-659, 2009.
- SANTOS, S. D. C.; MELLO, J. C. P. D. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, 2007. p.615-656.
- SCHANEBERG, B. T.; GREEN, D. K.; SNEDEN, A. T. Dihydroagarofuran Sesquiterpene Alkaloids from *Maytenus putterlickoides*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 5, p. 624-626, 2001. ISSN 0163-3864.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.; PELL, A. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 21-40, 2001. ISSN 0377-8401.
- SCHWARZER, A. et al. Sequential Therapy for *Helicobacter pylori* Infection in Treatment-naïve Children. **Helicobacter**, v. 21, n. 2, p. 106-113, 2016. ISSN 1523-5378.
- SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.
- SHABBIR, M.; KHAN, M. R.; SAEED, N. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 143, 2013. ISSN 1472-6882.
- SILVA, G. D. et al. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 530-536, 2009. ISSN 0102-695X.

- SILVA, L. P. et al. *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-295, 2015. ISSN 0378-8741.
- SIMMONS, M. P. Celastraceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **Families and genera of vascular plants: Flowering plants, Dicotyledons: Celestrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales**. Alemanha: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. p.29-37; 48.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. ISSN 0076-6879.
- SOARES, L. et al. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 4, p. 787-790, 2004. ISSN 0731-7085.
- SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, 2003. p. 289-326.
- SOBRATTEE, M. A. et al. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 1, p. 45-56, 2008. ISSN 0887-2333.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. et al. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991. ISSN 0378-8741.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, 2005. ISBN 8586714216.
- SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 2, p. S71-S75, 2014. ISSN 1537-6591.
- STEGE, P. et al. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 9, p. 724-727, 2006. ISSN 0944-7113.
- STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017. p. 1-10.
- STOLARCZYK, M. et al. Extracts from *Epilobium* sp. Herbs, Their Components and Gut Microbiota Metabolites of *Epilobium* Ellagitannins, Urolithins, Inhibit Hormone-Dependent Prostate Cancer Cells-(LNCaP) Proliferation and PSA Secretion. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 12, p. 1842-1848, 2013. ISSN 1099-1573.
- SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002. ISSN 0028-4793.
- TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract Part II—Clinical Study (Phase I). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 921-926, 2017a. ISSN 0951-418X.
- TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and toxicological study of *Maytenus ilicifolia* leaf extract. part I—preclinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 915-920, 2017b. ISSN 0951-418X.
- TABACH, R.; OLIVEIRA, W. P. D. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of a dry extract of *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reiss produced by a jet spouted bed dryer. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 8, p. 573-576, 2003. ISSN 0031-7144.
- TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 1965-1969, 2004. ISSN 0918-6158.

- TAVARES, A. V. **Avaliação in vivo do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato etanólico da entrecasca do caule de *Maytenus rigida* Mart. pelo teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos.** 2014. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB.
- THUNG, I. et al. the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 43, n. 4, p. 514-533, 2016. ISSN 1365-2036.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 6.ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 920 p. ISBN 8538806777.
- TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VELLOSA, J. et al. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 243-244, 2006. ISSN 0367-326X.
- VELLOSA, J. C. R. et al. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 447-453, 2007. ISSN 1516-9332.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.
- VIEITEZ, I. et al. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 58-64, 2018. ISSN 0896-8446.
- VILEGAS, W. et al. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 403-406, 1999. ISSN 0021-8561.
- WANG, Y. C.; HUANG, T. L. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Plumbago zeylanica* L. **Pathogens and Disease**, v. 43, n. 3, p. 407-412, 2005. ISSN 1574-695X.
- WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 27, n. 1, p. 87, 1963.
- WEEKS, D. L. et al. AH+-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 482-485, 2000. ISSN 0036-8075.
- WESSLER, S. Emerging Novel Virulence Factors of *Helicobacter pylori*. In: BACKERT, S. e YAMAOKA, Y. (Ed.). ***Helicobacter pylori* Research: From Bench to Bedside**. Tokyo: Springer Japan, 2016. p.165-188. ISBN 978-4-431-55936-8.
- WHO. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva, Switzerland: WHO Press: 49 p. 1998.
- _____. **Quality control methods for herbal materials. Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials**, 1998. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press.: 187 p. 2011.
- _____. Cancer. **WHO - Media Center**, 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> >. Acesso em: 13 Dezembro.
- WONFOR, R. et al. Anti-inflammatory properties of an extract of *M. ilicifolia* in the human intestinal epithelial Caco-2 cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, p. 283-287, 2017. ISSN 0378-8741.
- WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 713-739, 2010. ISSN 0893-8512.
- WU, W.; YANG, Y.; SUN, G. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2012, 2012. ISSN 1687-6121.

- XIAO, Z.-P. et al. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 3703-3710, 2007. ISSN 0968-0896.
- YANAGAWA, Y. et al. A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. **Current Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 244-9, Sep 2003. ISSN 0343-8651 (Print) 0343-8651 (Linking).
- YANG, W.-H. et al. Epigallocatechin-3-gallate blocks triethylene glycol dimethacrylate-induced cyclooxygenase-2 expression by suppressing extracellular signal-regulated kinase in human dental pulp and embryonic palatal mesenchymal cells. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 11, p. 1407-1412, 2013. ISSN 0099-2399.
- YEŞİLADA, E.; GÜRBÜZ, I. L.; SHIBATA, H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 289-293, 1999. ISSN 0378-8741.
- YU, D. et al. Curcumin inhibits the proliferation and invasion of human osteosarcoma cell line MG-63 by regulating miR-138. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 11, p. 14946, 2015.