



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**Departamento de Farmácia**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



**Avaliação da atividade antiadesiva de extratos de *Monteverdia ilicifolia*  
frente à *Helicobacter pylori***

MARIANA NASCIMENTO DE PAULA

Maringá

2023

Mariana Nascimento de Paula

**Avaliação da atividade antiadesiva de extratos de *Monteverdia ilicifolia*  
frente à *Helicobacter pylori***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Sintéticos Biologicamente Ativos) da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Maringá

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
PARA FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A  
FONTE.

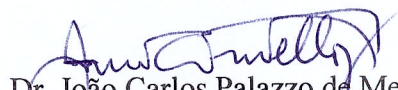
MARIANA NASCIMENTO DE PAULA

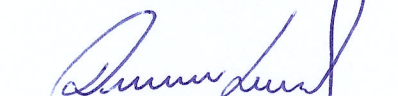
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIADESIVA DE EXTRATOS DE  
*Monteverdia ilicifolia* FRENTE À *Helicobacter pylori***

148ª Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 06 de julho de 2023


**BANCA EXAMINADORA**

  
Dr. João Carlos Palazzo de Mello  
*Universidade Estadual de Maringá*

  
Dra. Danielle Lazzarin Bidóia  
*Universidade Estadual de Londrina*

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LUZIA KALYNE ALMEIDA MOREIRA LEAL  
Data: 11/07/2023 13:45:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
*Universidade Federal do Ceará*

  
Dra. Naiara Cássia Gancedo  
*Universidade Estadual de Maringá*

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** RITA DE CÁSSIA RIBEIRO GONCALVES  
Data: 11/07/2023 18:21:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves  
*Universidade Federal do Espírito Santo*

**Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:**

de Paula, M.N.; Mello, J.C.P. UHPLC methodology development for *Monteverdia ilicifolia* semipurified fraction. In: IV International Meeting of Pharmaceutical Sciences and XII Annual Seminar of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program, 2022, Maringá - PR. Annals of the IV International Meeting of Pharmaceutical Sciences and XII Annual Seminar of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program, 2022.

de Paula, M.N.; Borges, A.S.; Pilatti, F.; Isolani, R.; Mello, J.C.P. Cell viability of *Maytenus ilicifolia* semipurified extracts on three different cell lines. In: III International Meeting of Pharmaceutical Sciences and XI Annual Seminar of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program, 2021, Maringá - PR. Annals of the III International Meeting of Pharmaceutical Sciences and XI Annual Seminar of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program, 2021.

de Paula, M.N.; Gottesmann, M.; Isolani, R.G.; Silva, F.P.; Medeiros, D.C.; Mello, J.C.P.; Hensel, A. Viabilidade celular e atividade antiadesiva de extrato semipurificado de *Maytenus ilicifolia* em células AGS e *Helicobacter pylori*. In: XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2019, Petrópolis - RJ. Caderno de Resumos, 2019.

de Paula, M.N.; Gottesmann, M.; Isolani, R.G.; Silva, F.P.; Mello, J.C.P.; Hensel, A. Cell viability and antiadhesive activity of *Maytenus ilicifolia* extract in AGS cells and *Helicobacter pylori*. In: II International Meeting of Pharmaceutical Sciences and X Annual Seminar of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program, 2019, Maringá - PR. Annals of the II International Meeting of Pharmaceutical Sciences and X Annual Seminar of the Pharmaceutical Sciences Graduate Program, 2019.

de Paula, M.N.; Gottesmann, M.; Pilatti Da Silva, F.; Isolani, R.G.; Mello, J.C.P.; Hensel, A. Cell viability and antiadhesive activity of *Maytenus ilicifolia* extract in AGS cells and *Helicobacter pylori*. In: 12th World Congress on Polyphenols Applications, 2018, Bonn, Germany. Archives of International Society of Antioxidants in Health and Nutrition, 2018. v. 6. p. 92.

**Parte deste trabalho foi publicado no periódico Revista Brasileira de Farmacognosia:**

de Paula, M.N., Kelm, M., Symma, N., Isolani, R.G., Silva, F.P., Sendker, J., Hensel, A., Mello, J.C.P. Anti-adhesive Activity of *Maytenus ilicifolia* Against *Helicobacter pylori*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **31**, 726–731 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00214-w>

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
meus irmãos, meu tio Eduardo e aos  
meus avós Evany e Francisco (in  
memorian).*

## Agradecimentos

*Quero começar agradecendo ao prof. João Carlos Palazzo de Mello. Nesses nove anos que estou no Palafito você me deu muitas chances de crescer, aprender tanto, me tornando uma profissional melhor, e também uma pessoa melhor. Muito obrigada por tanto!*

*I would like to say thank you to professor Andreas Hensel, for accepting me in the Institute for Pharmaceutical Biology and Phytochemistry in Münster for one year. It was great year for me, making possible for me living a different culture, knowing a lot of people, learning so much things in so few times. Thank you very much for this opportunity.*

*Quero agradecer a todos os colegas de laboratório que de alguma forma me ajudaram, me ouviram, me fizeram rir e me ensinaram tanto e que me ajudaram a crescer nesses nove anos de Palafito, muito obrigada!*

*I would like to say thanks to all colleagues I did in the IPBP in Münster, thank you for the patience for teaching me, and for make me feel in home.*

*I have to say thanks specially to Maren Kelm. You accept the challenge that professor Hensel give to you to teach me how to work with AGS and H. pylori, and you did this job perfectly! Thank you for all conversation, motivation and friendship!*

*Quero agradecer a Helena por ser e fazer mais do que seu trabalho como secretária do PCF. Obrigada por todo incentivo e torcida em todos os momentos, por se preocupar e cuidar tão bem de mim!*

*Agradeço aos docentes do PCF por todo o conhecimento transmitido.*

*Agradeço à UEM que sempre me ofereceu tanto, são doze anos sendo parte dessa universidade como parte do corpo docente, e aqui dentro encontrei muitas pessoas, e oportunidades que me fizeram crescer e me tornar alguém melhor, obrigada!*

*Meu muito obrigada à Capes e ao CNPq por permitirem a nós fazer o que amamos, fazer pesquisa e buscar de alguma forma ajudar alguns.*



*Quero agradecer agora a algumas pessoas que não tiveram papel direto nesse trabalho, mas que com certeza fizeram dessa jornada um caminho mais leve.*

*Agradeço aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar, buscar ser sempre melhor e fazer sempre meu melhor! Obrigada por nunca desistirem de mim.*

*Agradeço aos meus irmãos que sempre foram meus maiores torcedores, sempre demonstrando o orgulho que sentem de mim, amo vocês. Juliana, obrigada por ter aceitado o desafio de ir pra Alemanha comigo, sem você eu não teria conseguido passar aquele ano!*

*Agradeço ao meu tio Eduardo por me incentivar e torcer por mim em todo esse caminho. Também agradeço a minha cunhada Priscila e minha sobrinha Isadora, amo vocês!*

*Quero agradecer aos meus amigos brasileiros/alemães Elys, Fernando e Felipe, conhecer vocês em Münster foi um dos maiores presentes que recebi (obrigada Juliana!), obrigada por todos os almoços no Mensa, churrascos e picnics no Aasee e pela simples companhia de vocês. Vocês fizeram do nosso ano na Alemanha mais fácil, amo vocês!*

*Quero agradecer ao apoio que a família que fiz na Alemanha nos ofereceu durante aquele ano. Ficar longe da família é muito difícil, mas vocês fizeram com que esse processo fosse mais tranquilo. Obrigada Karin, Filipe, Carolina, André, Topásio e Sarmite, Karen e Sebastian, Jéssica e José, Cláudia, Leon, todos os membros da igreja adventista de Münster, que nos acolheram e nos trataram tão bem, mesmo com a dificuldade do idioma.*

*Agradeço a Deus por ter colocado cada uma dessas pessoas que eu citei acima na minha vida,  
e junto com cada um deles me dado a oportunidade de amar e aprender tanto. E também  
agradeço por ter me dado capacidade de cumprir cada desafio que apareceu, me dando força e  
sabedoria para enfrentar cada obstáculo!*



*“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.” Isaac Newton (Memoirs of the Life, Writings, and Discoveries of Sir Isaac Newton - 1855)*



**Mariana Nascimento de Paula** nascida em São Paulo, SP, em 16 de maio de 1991. Se mudou com a família para o Paraná aos 4 anos de idade. cursou 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. Finalizou seu mestrado em Ciências Farmacêuticas em 2018 na área de concentração de Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos (PCF-UEM). Desde 2018 cursa seu doutorado no laboratório Palafito pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UEM.

de Paula, M.N. 2023. Avaliação da atividade antiadesiva de extratos de *Monteverdia ilicifolia* frente à *Helicobacter pylori*. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 130p.

*Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral, é um membro da família Celastraceae, conhecida popularmente como espinheira-santa, cancorosa, espinheira de deus, espinheira divina, quebrachilho, salva vidas, entre outros. No Brasil é amplamente utilizada para tratamento de úlceras gástricas, sendo que em comunidades indígenas e rurais é utilizada por apresentar propriedades analgésica, antitumoral, afrodisíaca, antiespasmódica, contraceptiva, antiulcerogênica, diurética e cicatrizante. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade anti-*H. pylori* de extratos e substâncias isoladas das folhas de *M. ilicifolia* e atividade antiadesão *in vitro*, bem como a identificação dos compostos presentes no extrato semipurificado. O extrato bruto 2 (EB2) e o extrato bruto 5 (EB5) foram obtidos das folhas desengorduradas por extração com etanol: água (1:1, v/v) e acetona: água (7:3, v/v), respectivamente. Cada extrato foi ressuspensão em água e particionado com acetato de etila, resultando nas frações aquosas (FAQ2 e FAQ5) e nas frações acetato de etila (FAE2 e FAE5). A avaliação da influência dos extratos e frações na viabilidade celular de células AGS de estômago humano (ATCC CRL 1739) foi realizada pelo ensaio do MTT; a potencial atividade contra *Helicobacter pylori* (cepa J99, ATCC 700824) foi testada pelo ensaio de difusão em ágar e a influência do extrato na adesão bacteriana foi investigada pelo ensaio em citometria de fluxo (FACS). A caracterização química foi obtida por métodos cromatográficos como CCD, UHPLC e LC-MS. Os extratos hidroalcolóico (EB2) e hidroacetônico (EB5) das folhas de *M. ilicifolia* não influenciaram a proliferação bacteriana e não tiveram atividade relevante sobre a atividade mitocondrial de células AGS do estômago humano (1 a 1000 µg/mL). O ensaio de adesão por citometria de fluxo de *H. pylori* J99 marcado com fluorescência em células AGS indicou efeitos antiadesivos significativos de EB2 na faixa de concentração de 250 a 1000 µg/mL e uma atividade ainda mais forte foi observada para EB5 (IC<sub>50</sub> 615 µg/mL). Com relação as frações testadas, as melhores taxas de inibição foram encontradas para os compostos solúveis em água de EB5. A respectiva fração interagiu predominantemente com sistemas de adesão de *H. pylori*, enquanto o pré-tratamento das células AGS resultou em efeitos mais pronunciados. Estudos analíticos de LC-MS das frações mais ativas revelaram a presença de glicosídeos flavonoides e proantocianidinas oligoméricas. Considerando os resultados obtidos, pode-se sugerir o uso de *M. ilicifolia* como medida de profilaxia a infecção por *H. pylori*.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, espinheira-santa, Células Gástricas, Farmacognosia, Produtos Naturais, Plantas Medicinais, Fitoquímica.

de Paula, M.N. 2023. Evaluation of the anti-adhesive activity of *Monteverdia ilicifolia* extracts against *Helicobacter pylori*. Doctoral Thesis, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 130p.

*Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral, 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, and 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 anti-*H. pylori* activity of extracts and isolated compounds from *M. ilicifolia* leaves, and *in vitro* antiadhesive, as well as the identification of compounds present in the semi purified extract. Crude extract 2 (CE2) and crude extract 5 (CE5) were obtained from the degreased leaves by extraction with ethanol: water (1:1, v/v) and acetone: water (7:3, v/v), respectively. Each extract was resuspended in water and partitioned with ethyl acetate, resulting in aqueous fractions (AQF2 and AQF5) and ethyl-acetate fractions (EAF2 and EAF5). To evaluation of the extracts and fractions influence on the cell viability of human stomach AGS cells (ATCC CRL 1739), was performed the MTT assay; the potential cytotoxicity against *Helicobacter pylori* (strain J99, ATCC 700824) was tested by agar diffusion assay and the influence of the extract on bacterial adhesion was investigated by flow cytometry assay (FACS). Chemical characterisation was obtained by chromatographic methods as TLC, UHPLC and LC-MS. Hydroalcoholic (CE2) and hydroacetic extracts (CE5) from *M. ilicifolia* leaves did not influence bacterial proliferation and had no relevant activity on the mitochondrial activity of human stomach AGS cells (1 to 1000 µg/mL). Flow-cytometric adhesion assay of fluorescent-labelled *H. pylori* J99 on AGS cells indicated significant anti-adhesive effects of CE2 in the concentration range of 250 to 1000 µg/mL and an even stronger activity was observed for CE5 (IC<sub>50</sub> = 615 µg/mL). Regarding the fractions tested, the best inhibition rates were found for the water-soluble compounds of CE5. The respective fraction interacted predominantly with *H. pylori* adhesion systems, while pre-treatment of the AGS cells resulted in more pronounced effects. Analytical LC-MS studies of the most active fractions revealed the presence of flavonoid glycosides and oligomeric proanthocyanidins. Considering the results obtained, it can be suggesting the use of *M. ilicifolia* as a prophylaxis measure against *H. pylori* infection.

Keywords: *Maytenus ilicifolia*, *espinheira-santa*, Gastric Cells, Pharmacognosy, Natural Products, Medicinal Plants, Phytochemistry.

### Lista de Figuras

Figura 1.	<i>Monteverdia ilicifolia</i> (Mart. ex Reissek) Biral. a) Aspecto do ramo com flores; b) e c) Variações na morfologia foliar de um mesmo indivíduo	27
Figura 2.	Representação gráfica da prevalência da infecção por <i>Helicobacter pylori</i> em todo o mundo	69
Figure S1	Agar diffusion assay	89
Figure S2	AGS cell viability assay 24 h and 48 h – crude extract 2 and crude extract 5	90
Figure S3	AGS cell viability assay 24 h and 48 h – aqueous fraction 2 and ethyl-acetate fraction 2	91
Figure S4	AGS cell viability assay 24 h and 48 h – aqueous fraction 5 and ethyl-acetate fraction 5	92
Figure S5	AGS cell viability assay 2 h – crude extract 2 and crude extract 5	93
Figure S6	Relative adhesion of FITC-labelled <i>H. pylori</i> J99 to AGS cells – crude extract, ethyl-acetate fraction, aqueous fraction 2 and crude extract, ethyl-acetate fraction, aqueous fraction 5	94
Figure S7	Relative adhesion of FITC-labelled <i>H. pylori</i> J99 to AGS cells by different treatment protocols	95
Figure S8	Thin Layer Chromatography	96
Figure S9	Total ion chromatogram	97
Figure S10	UHPLC-FD chromatograms	98

### Lista de Tabelas

Table S1	LC-qTOF-MS peak characteristics – aqueous fraction 2	99
Table S2	LC-qTOF-MS peak characteristics – aqueous fraction 5	101

### Lista de Quadros

Quadro 1	Compostos isolados do gênero <i>Monteverdia</i> ( <i>Maytenus</i> )	23
Quadro 2	Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Monteverdia</i> ( <i>Maytenus</i> )	24
Quadro 3	Fitoquímicos isolados da espécie <i>Monteverdia ilicifolia</i> ( <i>Maytenus ilicifolia</i> )	28
Quadro 4	Propriedades biológicas da espécie <i>Monteverdia ilicifolia</i> ( <i>Maytenus ilicifolia</i> )	60

## Lista de Abreviaturas e Siglas/ List of Abbreviations and Acronyms

AGS (ATCC CRL-1739)	Linhagem celular de adenocarcinoma gástrico
AQF2	Aqueous fraction from crude extract ethanol: water 50:50 (v/v)
AQF5	Aqueous fraction from crude extract acetone: water 7:3 (v/v)
BabA	Blood group antigen binding adhesin
Cag	Cytotoxin associated gene
CagA	Cytotoxin associated protein
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE2	Crude extract ethanol:water 50:50 (v/v)
CE5	Crude extract acetone: water 7:3 (v/v)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DP	Degree of polymerisation
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAF2	Ethyl-acetate fraction from crude extract ethanol:water 50:50 (v/v)
EAF5	Ethyl-acetate fraction from crude extract acetone: water 7:3 (v/v)
EB2	Extrato bruto etanol:água 50:50 (v/v)
EB5	Extrato bruto acetona:água 7:3 (v/v)
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
FAE2	Fração acetato de etila de extrato bruto etanol:água 50:50 (v/v)
FAE5	Fração acetato de etila de extrato bruto acetona:água 7:3 (v/v)
FAQ2	Fração aquosa de extrato bruto etanol:água 50:50 (v/v)
FAQ5	Fração aquosa de extrato bruto acetona:água 7:3 (v/v)
FCS	Fetal serum calf
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional de Câncer

LC-qTOF-MS	Liquid Chromatography quadrupole time of flight Mass Spectrometry
MS	Mass spectrometry
OmpA	Proteína de membrana externa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAC	Proanthocyanidins
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Rf	Fator de retenção
SabA	Sialic acid binding adhesin
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
TLC	Thin layer chromatography
UNIPAR	Universidade Paranaense
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
Ure I	Proteína transportadora de ureia
VacA	Vacuolating cytotoxin protein
WHO	World Health Organisation

## Lista de símbolos

%	Porcentagem
'	Minuto
"	Segundo
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
eV	Elétrons volts
g	Grama
h	Horas
Hz	Hertz
L/min	Litro por minuto
m	Metro
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nM	Nanomolar
nm	Nanometro
OD <sub>550</sub>	Densidade óptica em 550 nm
S	Sul
V	volts
v/v	Volume por volume
W	Oeste
$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro



## Sumário

1	Introdução .....	17
2	Revisão Bibliográfica.....	21
2.1	Sistemática Vegetal.....	21
2.1.1	Celastraceae R. Br. ....	21
2.1.2	Alteração do binômio <i>Maytenus</i> para <i>Monteverdia</i> .....	22
2.1.3	<i>Monteverdia</i> A. Rich ( <i>Maytenus</i> Molina). ....	22
2.1.3.1	Aspectos químicos do Gênero <i>Monteverdia</i> ( <i>Maytenus</i> ) .....	23
2.1.3.2	Atividade Farmacológica do Gênero <i>Monteverdia</i> ( <i>Maytenus</i> ) .....	24
2.1.4	<i>Monteverdia ilicifolia</i> (Mart. ex Reissek) Biral ( <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek) .....	25
2.1.4.1	Aspectos químicos da Espécie <i>Monteverdia ilicifolia</i> ( <i>Maytenus ilicifolia</i> ) .....	27
2.1.4.2	Atividade Farmacológica da Espécie <i>Monteverdia ilicifolia</i> ( <i>Maytenus ilicifolia</i> ) .....	60
2.1.5	Toxicidade.....	62
2.2	Compostos fenólicos .....	63
2.3	Taninos .....	65
2.4	<i>Helicobacter pylori</i> .....	66
3	Objetivos .....	75
3.1	Objetivo Geral.....	75
3.2	Objetivos Específicos.....	75
4	Atividade antiadesiva de <i>Maytenus ilicifolia</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> .....	76
5	Conclusão.....	104
	Referências* .....	105
	Apêndice A - Desenvolvimento de metodologia analítica para separação de extratos semipurificados contendo substâncias de alto peso molecular .....	124

## 1 Introdução

Já foi identificado em antigos escritos o uso de plantas medicinais para o tratamento e cura de doenças há pelo menos 2500 anos em países como Índia, China, Egito, Grécia e na Ásia Central. Há registros que os sumérios de Nagpur usavam plantas medicinais no preparo de drogas há aproximadamente 5000 anos. A princípio as plantas eram utilizadas sem passar por muitos processos produtivos, como pós, chás, tinturas, cataplasmas, entre outros. Foi somente no século XIX que a utilização de plantas medicinais envolveu o isolamento dos compostos ativos. Em 1803 Friedrich Serturmer iniciou esse processo ao isolar a morfina da papoula, a partir de então começou a busca por outros compostos isolados, para o emprego de substâncias puras, com a ideia de serem mais seguras, por ser possível determinar a dosagem efetiva da substância (Jamshidi-Kia et al., 2017; Calixto, 2019; Fitzgerald et al., 2020; Süntar, 2020).

O uso de plantas medicinais ainda é muito importante, principalmente em países em desenvolvimento, sendo que aproximadamente 85% da população mundial as utiliza como os cuidados primários à saúde. Na Ásia aproximadamente 70.000 plantas são usadas pela medicina tradicional, e aproximadamente 20% das plantas disponíveis na Índia são usadas para a mesma finalidade. O maior uso em países em desenvolvimento pode ser justificado pela facilidade do acesso a esses materiais, quando comparado ao acesso a drogas sintéticas. Além do emprego direto das plantas no cuidado com saúde, cerca de 80% das drogas sintéticas hoje empregadas pela medicina são derivadas de compostos derivados de plantas medicinais (Fitzgerald et al., 2020; Süntar, 2020; Nasim et al., 2022).

As plantas medicinais têm sido usadas como recurso terapêutico, no tratamento direto de doenças, ou como fonte de compostos para o desenvolvimento de novas drogas, apresentando grande relevância historicamente. O uso dos produtos naturais pela medicina tradicional oferece informações importantes sobre segurança e eficácia. Quimicamente os produtos naturais apresentam algumas características que fazem com que sejam eficazes no tratamento de diversas doenças e, entre essas características estão: alto peso molecular, átomos de carbono e oxigênio com ligações passíveis de aceitar e doar hidrogênios e maior rigidez molecular (Jamshidi-Kia et al., 2017; Atanasov et al., 2021; Chopra e Dhingra, 2021; Aware et al., 2022; Nasim et al., 2022).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu, em sua trigésima primeira assembleia, em 23 de maio de 1978, a importância das plantas medicinais nos sistemas de cuidado da saúde dos países em desenvolvimento, além de identificar que as substâncias oriundas de plantas podem apresentar valor terapêutico, bem como potencial toxicidade quando empregados de forma incorreta. Foi criado então o Programa de Medicina Tradicional, que estimula o desenvolvimento de políticas públicas com a finalidade de integrar a medicina tradicional e complementar alternativa nos sistemas de atenção à saúde. Desde então a OMS tem incentivado a identificação das plantas medicinais usadas pela população, avaliação da segurança e eficácia,

bem como a divulgação das especificações com relação a identidade e pureza dos produtos utilizados (WHO, 1978; Brasil, 2016).

A maior biodiversidade do mundo se encontra na região das Américas. No mundo são aproximadamente 1 milhão de nomes registrados, sendo 350 mil espécies aceitas. Os povos sul-americanos utilizam os recursos naturais para diferentes fins, resultando em um alto grau de dependência desses recursos. A grande biodiversidade da região Sul Americana pode ser explicada pela variedade de ambientes, apresentando regiões com elevada altitude e regiões de planícies e bacias. Dentre os países Sul Americanos o Brasil é o que apresenta a maior diversidade genética vegetal, dentre 170-210 mil espécies, que correspondem a cerca de 13% da riqueza mundial (Stehmann e Sobral, 2017; Nunes e Albuquerque, 2018; Calixto, 2019).

A fitoterapia pode ser considerada uma prática sociocultural no Brasil, a princípio reunindo informações acerca das plantas medicinais trazidas pelos europeus àquelas inerentes dos povos indígenas e dos africanos que passaram a dividir o espaço no país. A rápida disseminação dessas informações pela população brasileira pode ser compreendida pela falta de acesso aos serviços de saúde e aos medicamentos sintéticos das comunidades mais carentes do país, necessitando de alternativas para a prevenção, tratamento e cura das doenças (Castro e Figueiredo, 2019; da Rocha et al., 2021; Pedroso et al., 2021).

A partir da década de 80 foram publicadas diversas portarias e resoluções visando o fortalecimento e a implementação da fitoterapia no Sistema Único de Saúde. A portaria nº 971, de 3 de maio de 2006 publicou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares da Saúde, responsável pela integração de práticas que envolvem diferentes recursos terapêuticos, como a fitoterapia. Com o objetivo de garantir a população brasileira “um acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos” além de promover “o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” foi aprovada em 22 de junho de 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - decreto nº 5.813. Esse decreto determinou diversas ações como ampliar as opções terapêuticas dos usuários do sistema de saúde, garantindo o acesso às plantas medicinais e fitoterápicos com qualidade (Brasil, 2006; Badke et al., 2019; Castro e Figueiredo, 2019; da Rocha et al., 2021; Pedroso et al., 2021).

Foi a partir de 1981 por meio da Central de Medicamentos (CEME), órgão vinculado ao Ministério da Saúde, que começaram a investigar a toxicidade e a eficácia de determinadas plantas medicinais. Em 2009 o Ministério da Saúde publicou a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), contendo 71 espécies vegetais, cuja finalidade é estimular e orientar o estudo e a pesquisa dessas espécies, para fornecer dados que auxiliem na produção de medicamentos, publicação de informações técnico-científicas de espécies nativas, bem como dispor de informações sobre segurança e eficácia dessas plantas. Em 2012 foram incluídos alguns medicamentos fitoterápicos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME),

dentre eles apresentam-se diferentes formas de espinheira-santa (*Monteverdia ilicifolia*) (Carlini, 1988; Castro e Figueiredo, 2019; Brasil, 2022).

*Monteverdia ilicifolia* (Mart. Ex Reissek) Biral (basiônimo *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) (Celastraceae), conhecida popularmente como espinheira-santa e cancorosa, é uma espécie nativa do Brasil, utilizada na medicina popular no tratamento de distúrbios gastrointestinais (gastrite, dispepsia e úlcera gástrica), como tônico, analgésico, antisséptico, cicatrizante, diurético, depurativo do sangue e laxativo. Pode ser encontrada na região sul e sudeste do país, em matas ciliares, floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila e em vegetação sobre afloramento rochoso. Sua atividade biológica foi atribuída primariamente aos compostos fenólicos, como flavonoides e taninos. Além dessas classes de metabólitos foram identificados terpenos, alcaloides e polissacarídeos. Sua monografia foi publicada na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição (Castro e Figueiredo, 2019; Perleberg et al., 2021; Farmacopeia Brasileira, 2022; de Carvalho Meirelles et al., 2022).

*Helicobacter pylori* é o maior patógeno transmissível humano. Uma bactéria Gram-negativa que infecta aproximadamente metade da população mundial. A infecção geralmente ocorre durante a infância, se estabelecendo como uma inflamação crônica progressiva podendo resultar em complicações clínicas como úlceras pépticas, gastrite, metaplasia intestinal gástrica, e câncer gástrico. Alguns estudos têm demonstrado a influência dessa bactéria no desenvolvimento de doenças extra gástricas, como distúrbios cardiovasculares, metabólicos (resistência à insulina), dermatológicas, oftálmicas e manifestações neurológicas (esclerose múltipla, Alzheimer, Parkinson e Guillain-Barré). Não existe uma terapia com um antibiótico capaz de erradicar a infecção, para isso são utilizadas terapias combinando dois ou três antibióticos mais um inibidor de bomba e/ou um componente de bismuto. As opções terapêuticas limitadas associada a habilidade de adaptação da bactéria tem promovido o desenvolvimento de resistência bacteriana primária, constituindo uma ameaça à saúde humana. Tendo em vista que *H. pylori* é um dos patógenos que apresentam maior ameaça à saúde humana devido a resistência bacteriana, é necessária a descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos que sejam efetivos contra a bactéria (Hooi et al., 2017; Yamaoka, 2018; Santos et al., 2020; Tshibangu-Kabamba e Yamaoka, 2021; Li et al., 2023).

Diversos estudos têm demonstrado que plantas ricas em compostos fenólicos possuem propriedades biológicas capazes de melhorar a saúde humana, como estímulo da microbiota intestinal, redução da inflamação e efeito antimicrobiano. Os compostos fenólicos apresentaram papel contra os efeitos produzidos pela infecção por *H. pylori* como colonização bacteriana, resposta inflamatória e atrofia da mucosa, além de demonstrar sinergismo com os antibióticos usados no tratamento (Guerra-Valle et al., 2022).

Considerando a importância e necessidade da erradicação e controle de infecções por *H. pylori*, por afetar muitas pessoas e estar associada a diversas doenças de grande relevância no

cenário mundial, é fundamental a busca por novos agentes antimicrobianos que sejam eficazes e seguros para os pacientes. Tendo em mente o uso já recomendado de *M. ilicifolia* para tratar diferentes enfermidades que podem estar associadas à *H. pylori* esse trabalho propôs a investigação da atividade antiadesiva de diferentes extratos brutos e extratos semipurificados obtidos a partir de folhas de *M. ilicifolia* em *H. pylori*, assim como a caracterização e identificação dos compostos presentes nos extratos.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Sistemática Vegetal

#### 2.1.1 Celastraceae R. Br.

Celastraceae é uma família botânica que agrupa 98 gêneros incluindo 4274 espécies (1373 aceitas e 2621 sinônimas) presentes nas regiões tropical e subtropical do globo, podendo se estender para regiões temperadas, crescendo em florestas, florestas tropicais, pastagens, dunas costeiras e áreas secas. No Brasil encontram-se 22 gêneros e 141 espécies aceitas (Heywood et al., 2011; Biral e Lombardi, 2020; WFO, 2023).

São caracterizadas por apresentarem porte lenhosos, arbustivos ou arbóreas com folhas inteiras, sendo sua disposição alterna ou oposta, sem estípulas, podendo se apresentar sem folhas. As flores, quando presentes, são pequenas pentâmeras ou tetrâmeras, diclamídeas, hermafroditas ou unissexuais, de simetria radial. Já o fruto seco, capsular ou baciforme (Joly, 1998).

Dentre os gêneros que fazem parte da família podem-se destacar os táxons com maior quantidade de espécies na seguinte ordem: *Monteverdia* (*Maytenus*) com 225 espécies (região tropical e subtropical); *Salacia* com 200 espécies; *Euonymus* apresentando 176 espécies (Himalaia, China e Japão) e *Hippocratea* contendo 120 espécies (região tropical, América do Sul, México e Sul dos Estados Unidos) (Muñoz et al., 1996).

De acordo com Souza e Lorenzi (2005) o interesse econômico nessa família se dá pelo uso de diferentes espécies para fins medicinais ou ornamentais, como por exemplo a espinheira-santa (*Monteverdia* spp.) e o evônimo (*Euonymus japonicus* Thunb.). Folhas e galhos de *Catha edulis* (Vahl) Endl. são utilizados devido sua propriedade estimulante. Ainda são utilizadas tradicionalmente em virtude de suas propriedades medicinais espécies de *Elaeodendron* Jacq., *Euonymus* L., *Gymnosporia* (Wight & Arn.) Benth. & Hook. f., *Hippocratea* L., *Monteverdia* Molina e *Salacia* L. (Simmons, 2004).

Furlan (1985, apud Carvalho-Okano, 1992) apontou que 21 espécies haviam sido quimicamente estudadas, dentre essas espécies seis componentes da flora brasileira. Podemos destacar quatro gêneros representantes brasileiros: *Maytenus*, *Goupia* Reiss., *Austroplenkia* Lund. e *Fraunhoferia* Mart.

Uma característica química importante dos membros da família Celastraceae é a presença de dulcitol em suas cascas e folhas. (L(S)-(-)-alfa-aminopropiofenona (catinona) e *d*-norpseudoefedrina (catina)), alcaloides que estão presentes em folhas jovens e galhos de *C. edulis*, apresentam atividade estimulante do sistema nervoso central, podendo ser comparada a ação das anfetaminas. Os compostos maitansina e maiteína foram isolados de espécies pertencentes aos gêneros *Gymnosporia*, *Maytenus* e *Putterlickia* Endl., e apresentaram capacidade de inibir células tumorais, sendo testadas em ensaios clínicos (Simmons, 2004).

### 2.1.2 Alteração do binômio *Maytenus* para *Monteverdia*

Baseados em evidências moleculares e em características morfológicas Biral et al. (2017) propuseram 123 novas combinações para espécies originalmente descritas como pertencentes ao gênero *Maytenus* que apresentem frutos capsulares com pericarpo coriáceo que se abre por duas valvas e possuem arilos brancos que cobrem as sementes por completo. O gênero *Maytenus* foi então subdividido em 3 gêneros (*Maytenus*, *Monteverdia* e *Tricerma*) considerando as características dos frutos. Com essa mudança da nomenclatura o binômio *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek deixou de ser aceito, passando a ser considerado um sinônimo do binômio *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral.

### 2.1.3 *Monteverdia* A. Rich (*Maytenus* Molina).

Feullé descreveu pela primeira vez, em 1725 o gênero *Monteverdia* (*Maytenus*) foi sob o nome de Mayten (Carvalho-Okano, 1992). Em 1782 o gênero *Maytenus* foi estabelecido por Molina com base nas características da espécie *Maytenus boaria* Molina, do Chile (Molina, 1951 apud Louteig; O'Donell, 1955 apud Carvalho-Okano, 1992).

Em 1841 Martius descreveu oito espécies do gênero pertencentes à flora brasileira: *M. brasiliensis* Mart., *M. macrophylla* Mart., *M. nitida* Mart., *M. obtusifolia* Mart., *M. aquifolium* Mart., *M. rigida* Mart., *M. dasyclados* Mart. e *M. gonoclada* Mart. Reissek publicou em 1861 um estudo sobre a taxonomia do gênero *Monteverdia* (*Maytenus*) no Brasil, descrevendo detalhadamente o gênero e 51 espécies divididas em grupos e subgrupos, de acordo com as características foliares (Carvalho-Okano, 1992).

O gênero *Monteverdia* (*Maytenus*) é composto por árvores, subarbustos e arbustos com porte que varia de 1,5-8 m, podendo alcançar até 20 m de altura. Os ramos são eretos, raramente escandente, glabros, raramente pubescente. As folhas são alternadas, inteiras ou serrilhadas. Inflorescência axilar, fasciculada, cimosa 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. Estão presentes nas regiões tropicais e subtropicais, em florestas úmidas ou em matas secas. 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 (Simmons, 2004; Pessuto, 2006).

São reconhecidas 576 espécies nesse gênero, sendo 178 espécies aceitas e 362 sinônimos. No Brasil atualmente são aceitas 48 espécies, sendo 35 endêmicas e 3 sinônimas. No Brasil o gênero *Monteverdia* (*Maytenus*) pode ser encontrado na: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata

Atlântica, Pampa e Pantanal. Sua ocorrência foi confirmada em estados de todas as regiões do Brasil (Norte; Nordeste; Centro-oeste; Sudeste e Sul) (Biral e Lombardi, 2020).

### 2.1.3.1 Aspectos químicos do Gênero *Monteverdia* (*Maytenus*)

Já foram isolados das diferentes espécies de do gênero *Monteverdia*, aproximadamente 500 compostos, de diferentes classes como terpenos, flavonoides, alcaloides, ligninas, taninos entre outros. Alguns desses compostos são apresentados no quadro 1.

**Quadro 1.** Compostos isolados do gênero *Monteverdia* (*Maytenus*).

Gênero	Parte da planta	Solvente	Compostos isolados	Referência
<i>M. acanthophylla</i> (Reissek) Biral	Raízes	<i>n</i> -hexano	1,4- <i>trans</i> -poli-isopreno Lupanos Oleanos Ursano Triterpenos quinonametideos	de Oliveira et al. (2006)
<i>M. amazonica</i> Mart	Cascas	<i>n</i> -hexano: etanol (1:1, v/v)	Amazoquinona (7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> )-7-hidroxi-7,8-dihidro-tingenona 7,8-dihidro-6-oxo-tingenol 23-nor-6-oxo-tingenola 23-oxo-iso-tingenona	Chavez et al. (1999)
<i>M. aquifolium</i> (Mart.) Biral	Cascas das raízes	Metanol	Aquifoliulina E-I e E-II Seringaresinol	Corsino et al. (1998)
<i>M. arbutifolia</i> (Hochst. ex A.Rich.) R. Wilczek	Folhas	Etanol	β-amirina (-)-epicatequina (-)-4'- <i>O</i> -metil-epigallocatequina	Orabi et al. (2001)
<i>M. bilocularis</i> (F. Muell.) M.P. Simmons	Raízes	Diclorometano	bilocularinas D-I pristimerina celastrol	Wibowo et al. (2018)
<i>M. chiapensis</i> Lundell	Folhas	Etanol	Sesquiterpenos piridínicos chiapeninos ES-I, ES-II, ES-III e ES-IV Wilfordina Alatamina Alatusinina Euonina Euonimina Ebenifolina E-1 Forrestina Maiteína 4-hidroxi-7-epi-chuchuhuanina E-V	Núñez et al. (2004)
<i>M. communis</i> (Reissek) Biral	Folhas e caules	Etanol e hexano	Epifriedelinol 3-oxo-friedelina	Amaral et al. (2022)
<i>M. erythroxylon</i> (Reissek) Biral	Partes aéreas	Hexano	29-norlupan-3,20-diona 30-hidroxi-20(29)-lupen-3-ona ácido 3,4-secofriedelan-3-óico	Figueiredo et al. (2021)



<i>M. heterophylla</i> (Eckl. & Zeyh.) N.Robson	Folhas	Etanol	3-oxo-30-hidroxi-friedelano 3β-hidroxi-friedelano 1-β-acetoxi-9-α-benzoiloxi- 2-β,6α-dinicotinoiloxi-β- diidroagarofurano	Orabi et al. (2001)
<i>M. magellanica</i> (Lam.) Hook. f. e <i>M.</i> <i>chubutensis</i> (Speg.) Lourteig, O'Donnell & Sleumer	Raízes	<i>n</i> -hexano: etanol (1:1, v/v)	sesquiterpenos com esqueleto diidro-β- agarofurano	Kennedy et al. (2001)
<i>M. obtusifolia</i> (Mart.) Biral	Raízes	Etanol	<i>N</i> -metilflindersina	da Silva et al. (2008)
<i>M. putterlickoides</i> (Loes.) Exell & Mendonça	Raízes	Etanol	Puterina A Puterina B Maiteína	Schaneberg et al. (2001)
<i>M. rigida</i> (Mart.) Biral	Cascas das raízes	Metanol	Ouratea-proantocianidina A e B 4- <i>O</i> -metil-(-)- epigalocatequina	Monache et al. (1976)

### 2.1.3.2 Atividade Farmacológica do Gênero *Monteverdia* (*Maytenus*)

Diversas atividades biológicas já foram testadas e comprovadas para espécies do gênero *Monteverdia*, algumas dessas atividades estão apresentadas no quadro 2.

**Quadro 2.** Atividades biológicas de espécies do gênero *Monteverdia* (*Maytenus*).

Gênero	Parte da planta	Solvente	Propriedade biológica	Referência
<i>M. amazonica</i> Mart	Cascas	<i>n</i> -hexano: etanol (1:1, v/v)	Antitumoral	Chavez et al. (1999)
<i>M. aquifolium</i> (Mart.) Biral			Antiúlcero-gênica	Gonzalez et al. (2001)
<i>M. boaria</i> Molina	Parte aérea	Metanol	Anti-inflamatória Antipirética	Muñoz et al. (1996)
<i>M. communis</i> (Reissek) Biral	Folhas e caules	Etanol e hexano	Antioxidante	Amaral et al. (2022)
<i>M. dasyclada</i> Mart. <i>M. dhofarensis</i> Sebsebe	Folhas	Água Etanol: água, acetato de etila, clorofórmio, <i>n</i> - hexano	Antioxidante Antioxidante	Cansian et al. (2015) Weli et al. (2019)
<i>M. emarginata</i> (Willd.) Ding Hou	Folhas		Antioxidante	Gupta e Sharma (2012)
<i>M. heterophylla</i> (Eckl. & Zeyh.) N.Robson	Folhas	Etanol	Antimicrobiana ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	Orabi et al. (2001)

<i>M. krukovii</i> A.C. Sm.	Cascas	Etanol: água	<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	Ação mutagênica protetora Antioxidante	Bruni et al. (2006)	
<i>M. macrocarpa</i> (Ruiz & Pav.) Briq.	Cascas das raízes	Etanol	<i>Pythium ultimum</i>	Antimicrobiana	( <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i> )	Kloucek et al. (2007)
<i>M. magellanica</i> (Lam.) Hook. f. e <i>M. chubutensis</i> (Speg.) Lourteig, O'Donnell & Sleumer	Raízes	<i>n</i> -hexano: etanol (1:1, v/v)		Anti Leishmania	Kennedy et al. (2001)	
<i>M. nemorosa</i> Biral & Lombardi				Antibacteriana ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Chukwujekwu e Van Staden (2016)	
<i>M. obscura</i> (A.Rich.) Cufod.	Folhas			Antinociceptiva	Maina et al. (2015)	
<i>M. procumbens</i> (L.f.) Loes.	Folhas	Acetona: etanol		Antitumoral	Momtaz et al. (2013)	
<i>M. rigida</i> (Mart.) Biral	Cascas de caules	Etanol		Antinociceptiva	Martins et al. (2012)	
<i>M. rigida</i> (Mart.) Biral	Cascas de caules	Etanol		Antinociceptiva	Dias et al. (2007)	
<i>M. robusta</i> Reissek	Folhas	Metanol		Hepatoprotetora	Thiesen et al. (2017)	
<i>M. urquiolae</i> Mory	Cascas	<i>n</i> -hexano: éter etílico (1:1, v/v)		Fungicida ( <i>Curvularia clavata</i> )	Fernández de la Torre et al. (2010)	

#### 2.1.4 *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek)

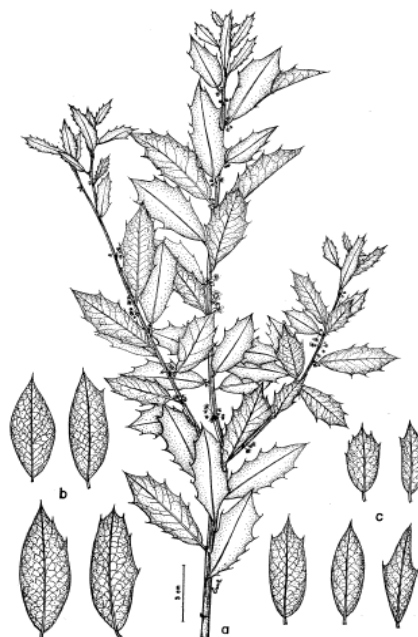
*M. ilicifolia* é uma espécie nativa do Brasil, conhecida popularmente como cancorosa, congorça, erva-cancerosa, espinheira de deus, espinheira divina, quebrachilho, salva vidas, sombra de touro e espinheira santa. Esta espécie apresenta como sinônimos *Maytenus acerifolia* Walp., *Maytenus pilcomayensis* Briq., *Maytenus oxyodonta* Reissek, *Maytenus castaneiformis* Reissek, *Maytenus hasseleri* Briq., *Maytenus muelleri* Schwacke, *Maytenus briquetii* Loes., *Celastrus spinifolius* Larrañaga, *Maytenus ilicifolia* var. *boliviana* Loes., *Maytenus officinalis*

Mabb., *Maytenus acanthophylla* Reissek, *Maytenus macrodonta* Reissek e *Monteverdia acanthophylla* (Reissek) Biral (Longhi, 1995; Biral e Lombardi, 2020).

As características da espécie estão descritas na monografia da *M. ilicifolia* presente no volume 2 da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). *M. ilicifolia* é subarbusto ou árvore, com altura de cerca de 5 m. Ramos jovens, glabros, angulosos, com estrias longitudinais. Pecíolo curto, com 0,2 a 0,5 cm de comprimento. Folhas simples, inteiras, ovalado-oblongas à elípticas ou elípticolanceoladas. Lâmina foliar com 2,1 a 9 cm de comprimento, e 1 a 3,1 cm de largura, coriáceas a subcoriáceas, glabras, de coloração verde-acinzentada, mais clara na face abaxial; ápice mucronado, base aguda a obtusa. Nervação peninérvea, craspedódroma mista, com nervuras secundárias partindo em ângulo agudo em relação à principal, terminando na margem da lâmina, ou ramificando-se nas proximidades dela, ou ainda seguindo em direção à margem, onde se reúnem com a superior subsequente, formando arcos. Na margem foliar, tanto as nervuras secundárias quanto as que delas partem, unem-se com a nervura marginal, formando projeções pontiagudas, de cinco a 15 unidades por folha, distribuídas em um ou nos dois lados da lâmina, mais frequentemente, em sua metade apical, sendo sempre uma delas terminal. Aréolas predominantemente retangulares, com terminações ramificadas; margem foliar espessada e amarelada (Figura 1) (Carvalho-Okano, 1992; Farmacopeia Brasileira, 2022).

Inflorescências em fascículos multifloros (10-15 flora). Pedicelos florais com 2-5 mm de comprimento, bracteolado na base. Sépalas semicirculares, ca. 2mm. Pétalas ca. 3 × 2 mm, ovais. Estames com filetes alargados na base. Estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnosos. Fruto cápsula orbicular; pericarpo maduro de coloração alaranjada (Biral e Lombardi, 2020).

A espécie pode ser encontrada nas regiões sul, centro-oeste e sudeste do país (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais). O domínio fitogeográfico predominante nessas regiões é o Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Os ecossistemas de ocorrência da espécie são Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial), Vegetação Sobre Afloramentos Rochoso (Biral e Lombardi, 2020).

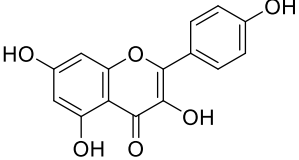
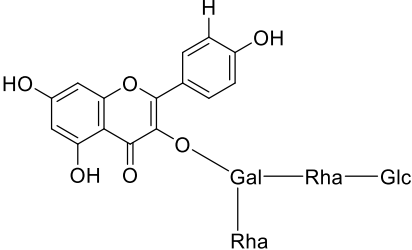
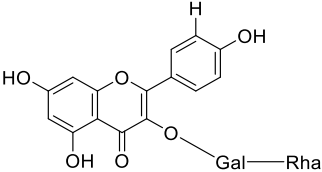
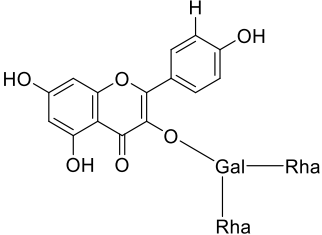


**Figura 1.** *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) a) Aspecto do ramo com flores; b) e c) Variações na morfologia foliar de um mesmo indivíduo (Carvalho-Okano, 1992).

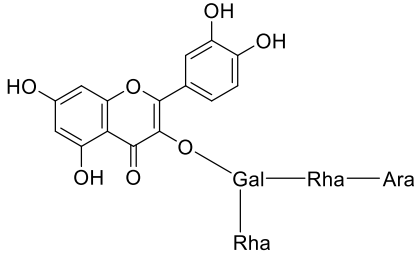
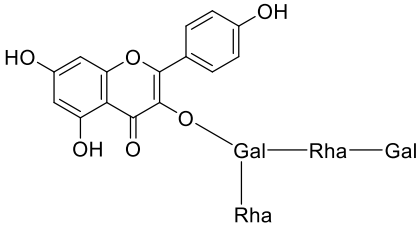
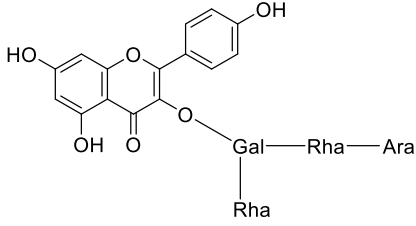
#### 2.1.4.1 Aspectos químicos da Espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*)

As rotas metabólicas que acontecem na espécie *M. ilicifolia* produzem uma grande variedade de metabólitos. Entre as principais classes encontram-se flavonoides, taninos, terpenos, sacarídeos e macrolídeos. Esses compostos foram obtidos a partir de extratos brutos ou frações semipurificadas usando solventes orgânicos como etanol, acetona, hexano, bem como água. Foram reunidos e apresentados alguns desses compostos no quadro 3.

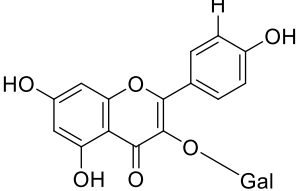
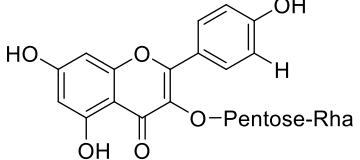
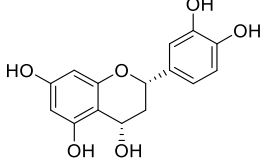
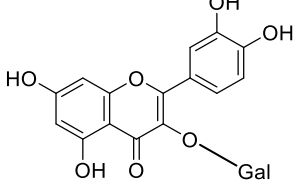
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
Flavonoides	Canferol		Folhas	<p>Baggio et al. (2007)  Leite et al. (2001)  Leite et al. (2010)  Leme et al. (2013)  Pessuto et al. (2009)  Souza et al. (2008a)  Souza et al. (2008b)  Souza et al. (2009)  Tiberti et al. (2007)  Xavier e D'angelo (1996)</p>
	Canferol-3- <i>O</i> -[2-glicopiranosil(1→3)- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil-6-ramnopiranosil]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo			
	Canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1→2)- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo			
	Canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→6)- <i>O</i> -[L-ramnopiranosil(1→2)]- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo			

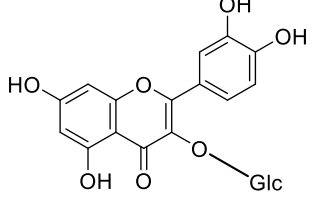
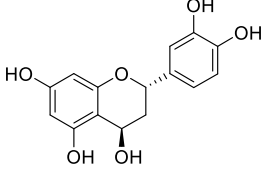
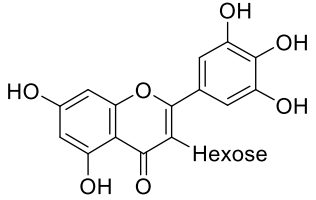
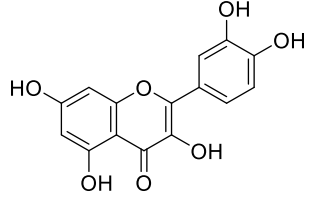
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)]- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo			
	Canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo			
	Canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-arabinopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)]- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

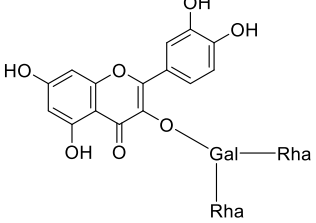
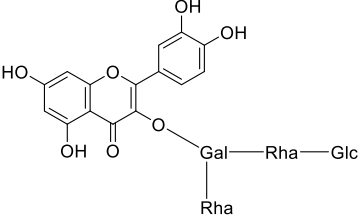
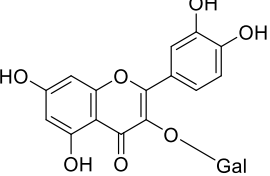
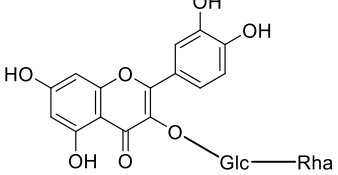
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Canferol-3- <i>O</i> -β-D-galactopiranosídeo			
	Canferol-ramno-pentosídeo			
	Epiluteoforol			
	Hiperosídeo			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

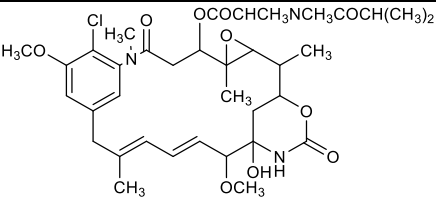
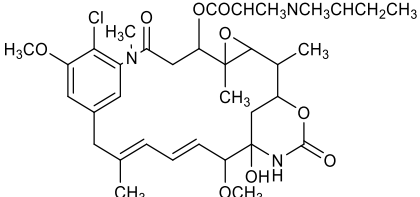
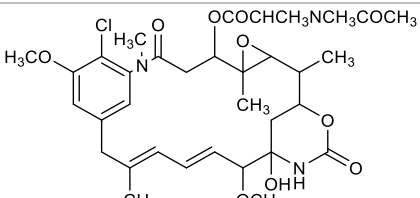
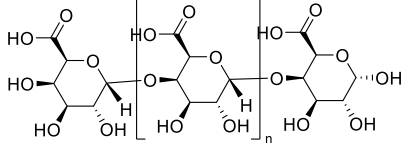
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Isoquercetina			
	Luteoforol			
	Miricetina-hexosídeos (P13A and P13B)			
	Quercetina			



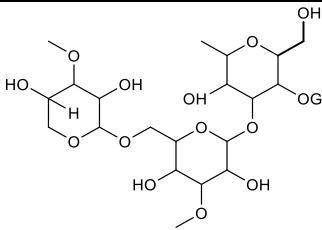
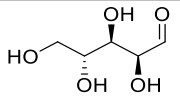
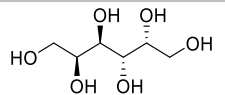
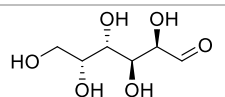
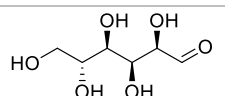
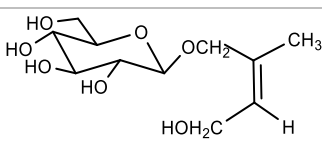
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo			
	Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)]- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-galactopiranosídeo			
	Quercetina-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo			
Rutina				

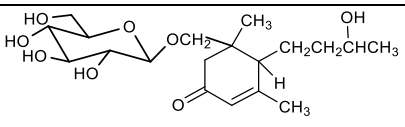
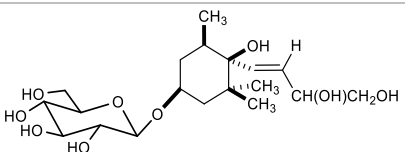
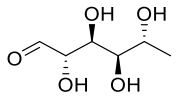
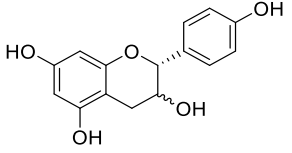
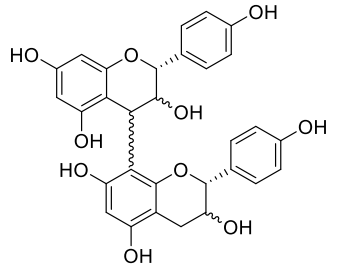
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
Macrolídeos	Maitanbutina		Folha, Caule e Raízes	Ahmed et al. (1981)
	Maitanprina			
	Maitansina			
Sacarídeos	Ácido poligalacturônico		Folhas	Baggio et al. (2007) Cipriani et al. (2004) Cipriani et al. (2006) Cipriani et al. (2008)

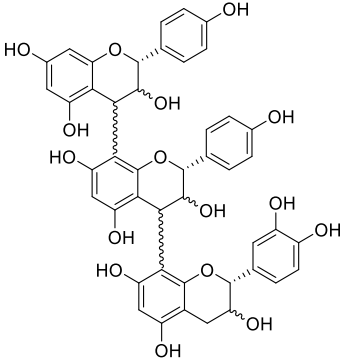
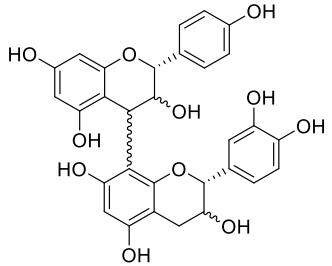
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Arabinogalactana			Cipriani et al. (2009) Leite et al. (2001) Leite et al. (2010) Souza et al. (2008a) Zhu et al. (1998)
	Arabinose			
	Galactitol			
	Galactose			
	Glicose			
	Ilicifolinosídeo A			

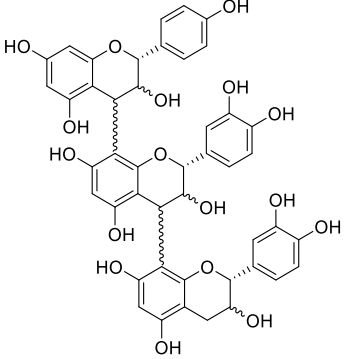
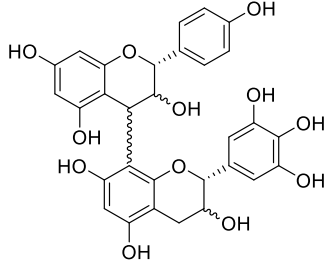
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Ilicifolinosídeo B			
	Ilicifolinosídeo C			
	Ramnose			
<b>Taninos</b>	(epi)afzelequina		Folhas	Pessuto et al. (2009) Souza et al. (2008b)
	(epi)afzelequina-(epi)afzelequina			

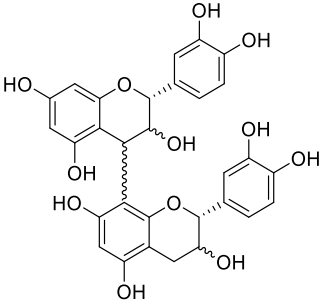
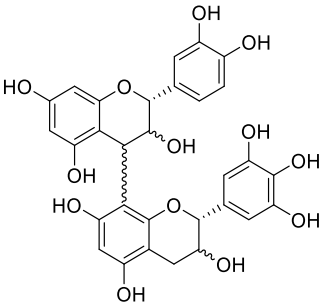
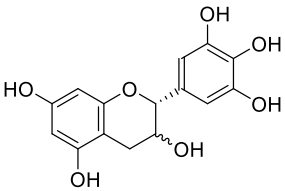
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	(epi)afzelequina–(epi)afzelequina–(epi)catequina			
	(epi)afzelequina–(epi)catequina			

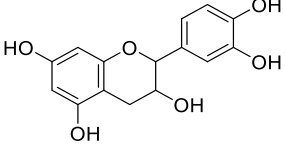
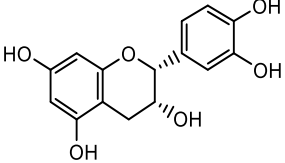
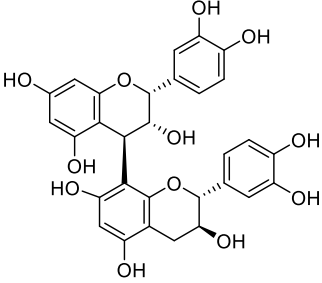
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	(epi)afzelequina–(epi)catequina–(epi)catequina			
	(epi)afzelequina–(epi)galocatequina			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

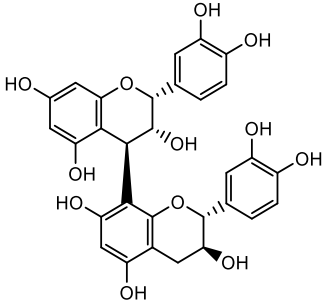
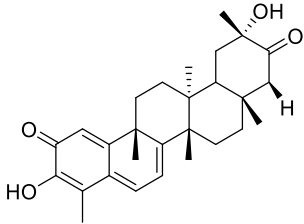
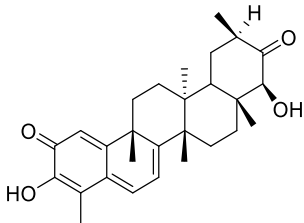
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	(epi)catequina–(epi)catequina			
	(epi)catequina–(epi)galocatequina			
	(epi)galocatequina			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

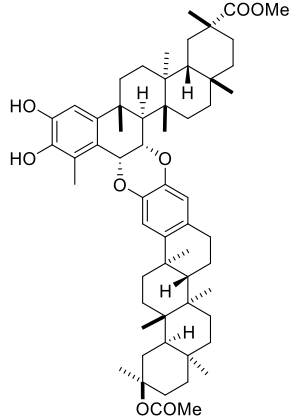
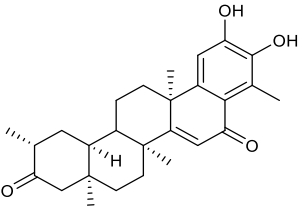
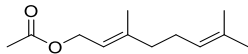
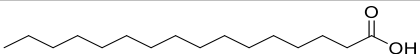
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Catequina			
	Epicatequina			
	Epicatequina-(4β→8)-catequina (procianidina B1)			



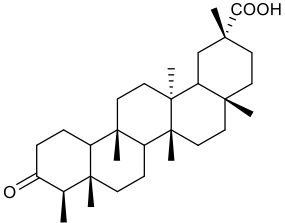
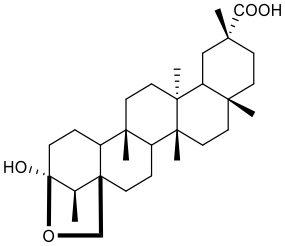
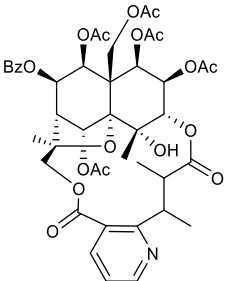
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina (procianidina B2)			
Terpenos	22 $\alpha$ -Hidroximaitenina		Folhas Raízes	Buffa Filho et al. (2002a)
	22 $\beta$ -Hidroximaitenina			Buffa Filho et al. (2002b)
				Coppede et al. (2014)
				Cordeiro et al. (1999)
				Costa et al. (2008)
				Gutiérrez et al. (2007)
				Itokawa et al. (1990)
				Itokawa et al. (1991)
				Itokawa et al. (1994)

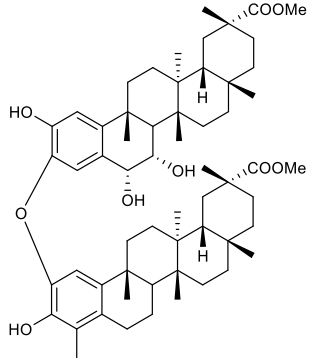
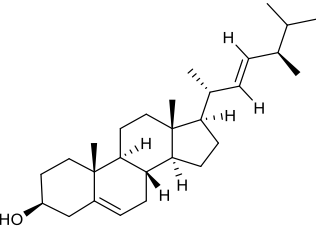
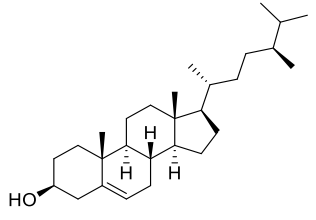
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	6',7'-diidroisocangorosina A			<p>Mossi et al. (2004)  Mossi et al. (2007)  Mossi et al. (2010)  Ohsaki et al. (2004)  Paz et al. (2017)  Pereira et al. (2005)  Queiroga et al. (2000)  Santos et al. (2010)  Santos et al. (2012)  Santos et al. (2013)</p>
	6-oxotingenol			<p>Shirota et al. (1994)  Shirota et al. (1997)  Vilegas et al. (1995)  Vistuba et al. (2013)</p>
	Acetato de geranila			
	Ácido hexadecanóico			

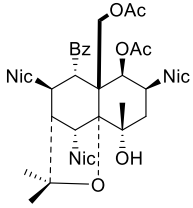
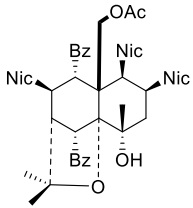
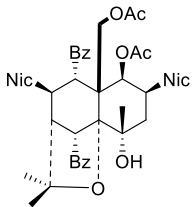
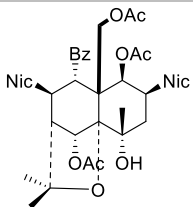
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Ácido maitenoico			
	Ácido salasperimicio			
	Aquifoliunina E-I			

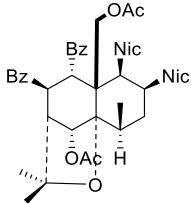
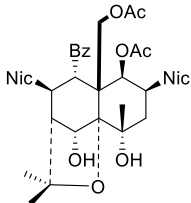
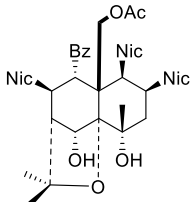
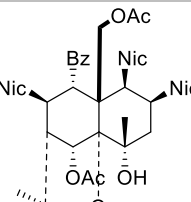
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Atropcangorosina A			
	Brassicasterol			
	Campesterol			

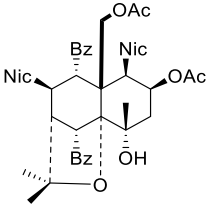
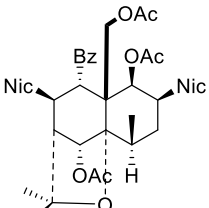
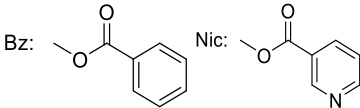
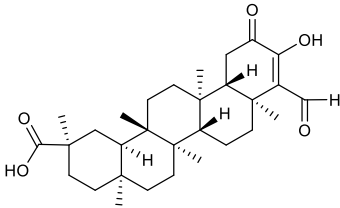
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Cangorina A*			
	Cangorina B*			
	Cangorina C*			
	Cangorina D*			

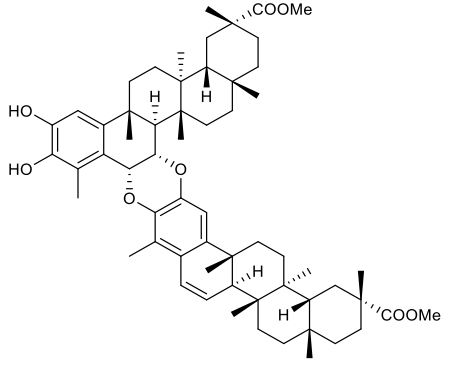
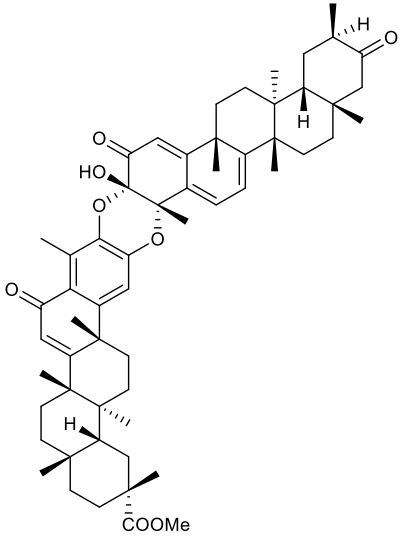
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Cangorina E*			
	Cangorina F*			
	Cangorina G*			
	Cangorina H*			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

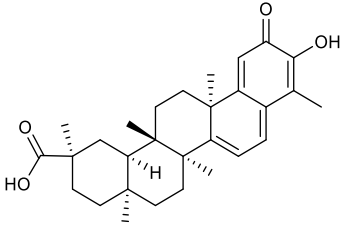
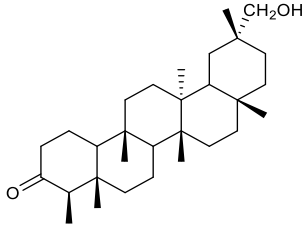
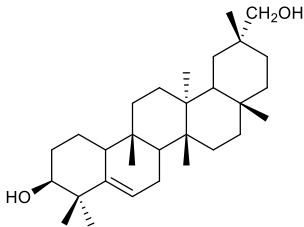
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Cangorina I*			
	Cangorina J*			
	*			
	Cangoronina			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

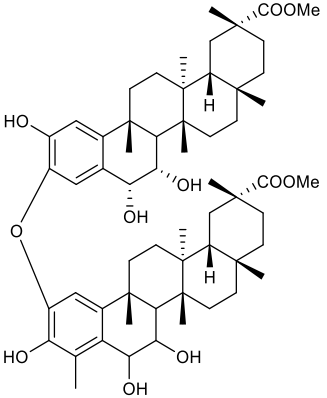
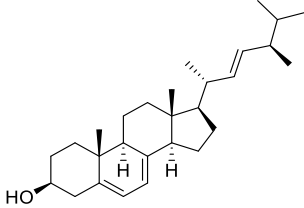
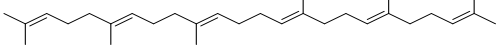
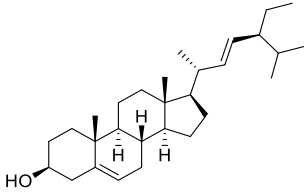
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Cangorosina A	 <p>The structure of Cangorosina A is a complex pentacyclic steroid. It features a central steroid nucleus with two phenolic rings attached via ether linkages. The upper phenolic ring has two hydroxyl groups and a methyl group. The lower phenolic ring has a methyl group and a methyl ester group. The steroid nucleus has several methyl groups and a methyl ester group at the C-20 position.</p>		
	Cangorosina B	 <p>The structure of Cangorosina B is a complex pentacyclic steroid. It features a central steroid nucleus with a carboxylic acid group and a methyl ester group. The steroid nucleus has several methyl groups and a methyl ester group at the C-20 position.</p>		



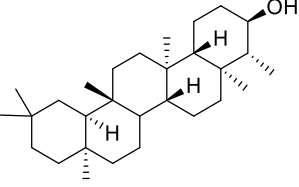
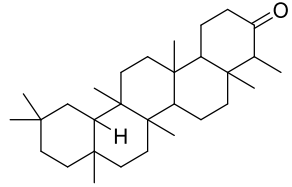
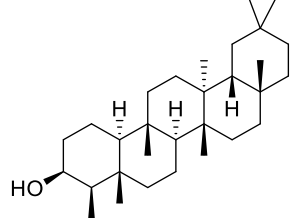
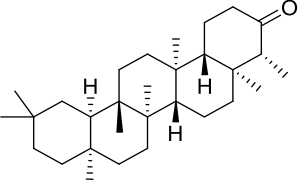
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Celastrol			
	D:A-friedoolean-29-ol-3-ona			
	D:B-friedoolean-5-en-3f,29-diol			

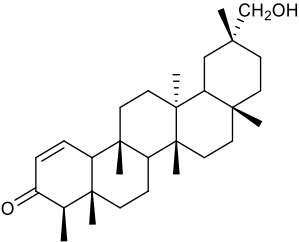
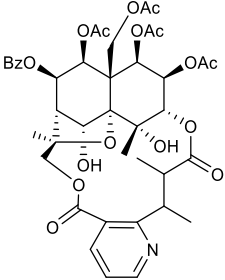
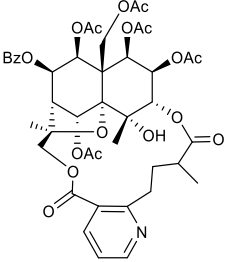
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Diidroatropcangorosina A			
	Ergosterol			
	Esqualeno			
	Estigmasterol			

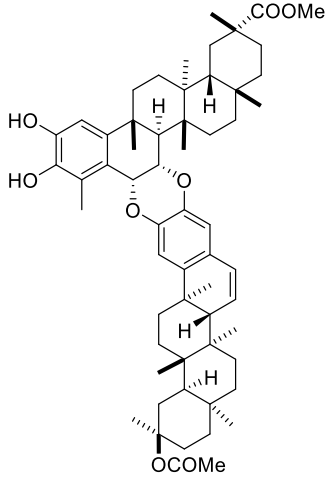
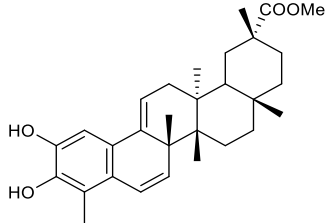
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Friedelan-3-ol			
	Friedelan-3-ona			
	Friedelan-3β-ol			
	Friedelina			

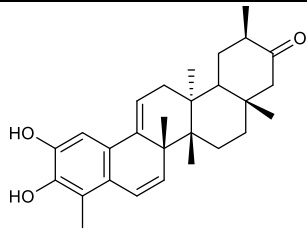
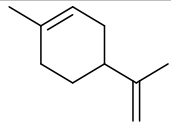
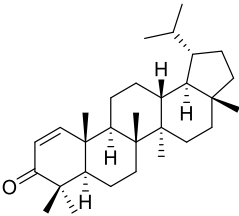
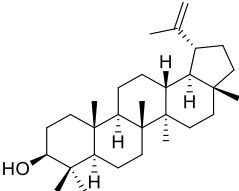
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Ilicifolina			
	Ilicifoliunina A			
	Ilicifoliunina B			

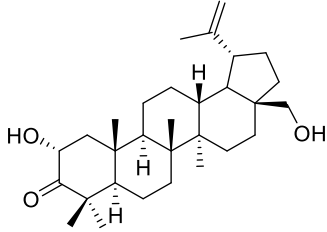
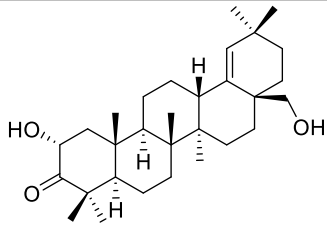
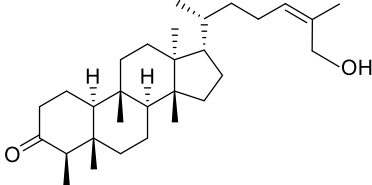
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Isocangorosina A			
	Isopristimerina III			

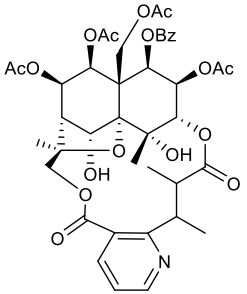
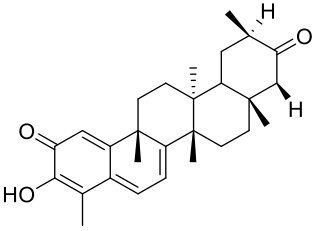
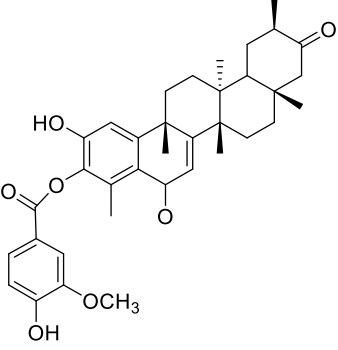
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Isotingenona III			
	Limoneno			
	Lupenona			
	Lupeol			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

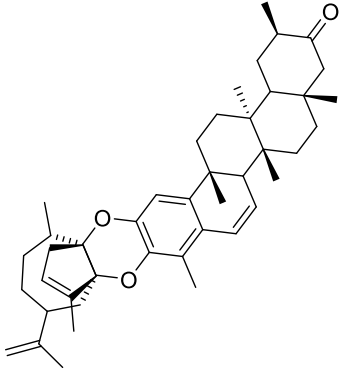
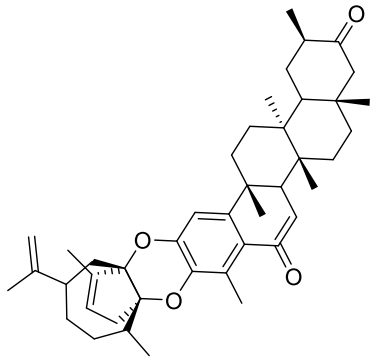
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Maitefolina A			
	Maitefolina B			
	Maitefolina C			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

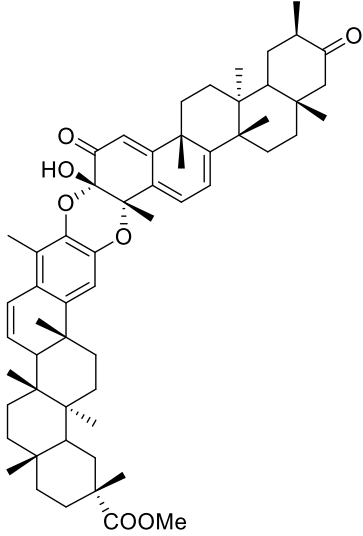
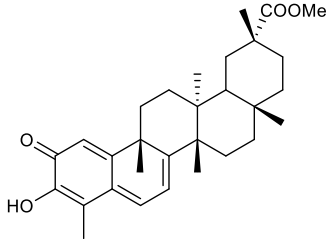
Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Maiteína			
	Maitenina			
	Milicifolina A			



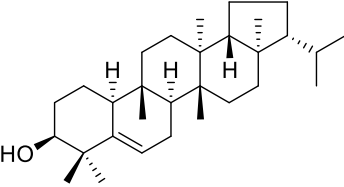
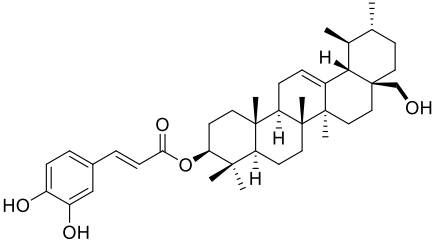
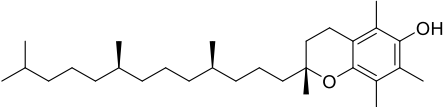
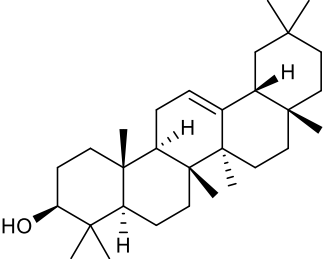
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Milicifolina B	 The chemical structure of Milicifolina B is a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring with two methoxy groups (-OCH3) at the 1 and 3 positions. This benzene ring is fused to a six-membered ring containing a double bond and a methyl group. This six-membered ring is further fused to a seven-membered ring with a double bond and a methyl group. The seven-membered ring is fused to a six-membered ring with a double bond and a methyl group. Finally, this six-membered ring is fused to a six-membered ring with a ketone group (=O) and a methyl group. The entire structure is highly substituted with methyl groups and has a specific stereochemistry indicated by wedges and dashes.		
	Milicifolina C	 The chemical structure of Milicifolina C is very similar to Milicifolina B. It has the same core polycyclic framework. However, the central benzene ring has a methyl group at the 1 position and a methoxy group (-OCH3) at the 3 position, which is the reverse of the substitution pattern in Milicifolina B. The rest of the structure, including the fused rings, double bonds, and methyl groups, is identical to Milicifolina B.		

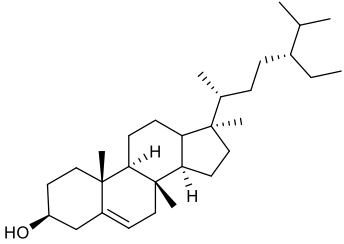
**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Milicifolina D			
	Pristimerina			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	Simiarenol			
	Uvaol-3-cafeato			
	$\alpha$ -tocoferol			
	$\beta$ -amirina			

**Quadro 3.** Fitoquímicos isolados da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Classe	Composto	Estrutura Química	Parte da planta	Referência
	$\beta$ -sitosterol			

#### 2.1.4.2 Atividade Farmacológica da Espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*)

Popularmente folhas de espinheira-santa (*M. ilicifolia*) são usadas para o tratamento de condições que acometem o estômago, como náusea, gastrite e úlceras. Para esse fim são preparados infusos das folhas. Além disso o infuso é usado para melhorar os sintomas causados pelo consumo excessivo de álcool, no preparo de tônicos, como antisséptico, carminativo, diurético e laxativo. A medicina popular brasileira usa essa espécie para o tratamento de diabetes, infecções no trato urinário, problemas intestinais, doenças nervosas, e desordens nos rins e no sangue (Périco et al., 2018).

Diversas atividades biológicas usadas popularmente foram estudadas de forma extensa utilizando diferentes extratos brutos e semipurificados de *M. ilicifolia*. Algumas dessas atividades e seus resultados estão apresentados no quadro 4.

**Quadro 4.** Propriedades biológicas da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Parte da planta	Solvente	Propriedade biológica	Referência
Folhas	Água	Efeito antiulcerogênico: Aumento do volume e do pH do suco gástrico em animais.	Souza-Formigoni et al. (1991)
Folhas	Etanol: água	Atividade gastroprotetora: Aumento do volume e pH da secreção gástrica	Tabach e Oliveira (2003)
Folhas	Hexano	Atividade antiulcerogênica Atividade anti-inflamatória	Jorge et al. (2004)
Folhas	Água	Atividade gastroprotetora	Cipriani et al. (2006)
Folhas	Metanol	Atividade relaxante no endotélio da aorta de ratos	Rattmann et al. (2006)
Cascas de raízes	Etanol	Potencial antioxidante	Velloso et al. (2006)
Raízes	Etanol	Atividade anti-leishmanicida	Alvarenga et al. (2008)
Folhas	Água	Atividade antiulcerogênica: Redução de lesões gástricas	Cipriani et al. (2008)
Cascas de raízes	Etanol	Atividade antiproliferativa em células tumorais humanas	Costa et al. (2008)
Folhas	Água	Redução da motilidade gastrointestinal	Baggio et al. (2009)
Folhas	Água	Atividade antiúlcera	Cipriani et al. (2009)
Folhas	Água	Efeito hipotensivo	Crestani et al. (2009)

**Quadro 4.** Propriedades biológicas da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Parte da planta	Solvente	Propriedade biológica	Referência
Folhas	Acetona: água (7:3, v/v)	Potencial antioxidante	Pessuto et al. (2009)
Folhas	Água	Efeito protetor gástrico	Baggio et al. (2012)
Cascas de raízes	Etanol	Atividade antiprotozoário ( <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> – IC <sub>50</sub> = 1,4 e 41,9 µM)	Santos et al. (2012)
Partes aéreas	Água	Efeito apoptótico em células cancerígenas	Araújo Júnior et al. (2013)
Cascas de raízes	Diclorometano	Atividade leishmanicida e tripanomicida ( <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> ): IC <sub>50</sub> < 0,88 nM	Dos Santos et al. (2013)
Folhas	Água	Atividade diurética; Atividade hipotensiva	Leme et al. (2013)
Folhas	Hexano	Atividade anti-inflamatória em células epiteliais do intestino humano: subregulação da expressão do TLR-2 e supressão da secreção de IL-8	Wonfor et al. (2017)
Folhas	Água	Ensaio clínico: Atividade antidispéptica; Redução da acidez, azia e náusea; Sem efeitos tóxicos	Tabach et al. (2017a)
Erva seca	Etanol: água (75:25, v/v) Hexano	Atividade antimicrobiana ( <i>Bacillus cereus</i> – CIM= 0,036 a 0,54 µg/mL)	Vieitez et al. (2018)
Folhas	Etanol	Atividade antimicrobiana ( <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> )	Ramírez et al. (2020)
Raízes		Atividade antitumoral: Atividade pró-apoptótica em células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço	Hernandes et al. (2020)
Folhas	Etanol: água	Atividade cicatrizante em feridas; Efeito anti-inflamatório; Estímulo na produção de colágeno tipo III;	Moura et al. (2021)

**Quadro 4.** Propriedades biológicas da espécie *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*).

Parte da planta	Solvente	Propriedade biológica	Referência
		Aumento na atividade pro-metaloproteases e metaloproteases 9	
Folhas	Etanol	Atividade hipoglicêmica	Schindler et al. (2021)

### 2.1.5 Toxicidade

A toxicidade da espécie *M. ilicifolia* foi avaliada em diferentes estudos. Oliveira et al. (1991) avaliaram os efeitos farmacológico e toxicológico de uma mistura de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* em ratos e camundongos. Os resultados referentes aos efeitos agudos não apontaram diferença significativa quando comparados aos animais controle. A frequência urinária, frequência de defecação, pilo ereção, atividade locomotora, tremores, convulsões, tônus muscular, ataxia, ptose palpebral, perda de reflexos, excreção de lágrimas ou saliva não apresentaram alterações. Quando o extrato aquoso foi administrado via oral não afetou a locomoção do animal, porém quando a via de administração foi via intraperitoneal houve diminuição dessa atividade. A administração pela via intraperitoneal resultou no aumento do tempo do sono induzido por pentobarbital. Ao determinar a  $DL_{50}$  os extratos testados não apresentam efeitos tóxicos.

Com relação aos efeitos crônico dos extratos, Oliveira et al. (1991) demonstraram que os animais que receberam os extratos apresentaram aumento significativo do peso dos animais, semelhante ao aumento de peso observado no grupo controle. Não houve diferença entre os níveis de glicose, temperatura corporal entre os grupos tratado e controle nas semanas 2, 6 e 8. Na quarta semana de tratamento foi observada uma redução significativa na temperatura corporal, sem outra alteração fisiológica. Ao analisar o soro dos animais não foram encontradas quaisquer alterações. Os órgãos avaliados não apresentaram nenhuma alteração. Os testes que avaliaram a teratogenicidade demonstraram que os extratos de *M. ilicifolia* não apresentam riscos.

Ao avaliar o efeito de extrato hidroalcoólico de folhas de *M. ilicifolia* na gestação de ratas Montanari e Bevilacqua (2002) observaram que o extrato não foi embriotóxico e não causou alterações morfológicas na mucosa uterina e ovários. Esse extrato exibiu uma atividade estrogênica, e alterou a taxa implantação de embriões, reduzindo essa taxa, quando o extrato foi administrado a ratas no início da gravidez, com a dose de 1000 mg/kg.

Cunha-Laura et al. (2014) avaliaram o efeito de *M. ilicifolia* na reprodução e no desenvolvimento embrio-fetal em ratas Wistar, levando em consideração a dose usada pela população do extrato obtido das folhas com acetona: água (7:3 v/v). Como resultado foi possível observar que a exposição ao extrato não resulta em toxicidade, além de não interferir no desenvolvimento embrio-fetal e com os parâmetros reprodutivos maternos.

Ao analisarem a genotoxicidade de três espécies diferentes de *Monteverdia*, entre elas *M. ilicifolia*, Cansian et al. (2015) observaram que as espécies testadas apresentam 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. O extrato não induziu alterações prejudiciais no tônus muscular nem na coordenação motora dos camundongos. Nos ensaios de toxicidade aguda, utilizando doses superiores a 5000 mg/kg não houve morte durante os 7 dias em que o extrato foi administrado, sugerindo a baixa toxicidade desse extrato.

Ao avaliar a toxicidade crônica foram utilizados ratos e camundongos, em nenhum 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, bem como as plaquetas. Nos exames anatomopatológicos não foi encontrada nenhuma alteração nos órgãos examinados. O ciclo estral das ratas não sofreram alterações nas diferentes doses testadas depois de 60 dias de tratamento com o extrato, e os órgãos analisados anatomopatologicamente não apresentaram alteração macroscópica nem microscópica (Tabach et al., 2017b).

Os extratos testados não apresentaram efeitos teratogênicos, não causaram alterações no número e duração da gravidez, bem como o número de filhotes, peso ou sinal externo de malformação dos filhotes. A abertura dos olhos e deambulação dos filhotes no dia 8 e 13 de vida não sofreu alterações. A dose máxima tolerada, não levou a sinais de toxicidade e a redução significativa de eritrócitos nos testes de genotoxicidade e mutagenicidade (Tabach et al., 2017b).

Ecker et al. (2017) avaliaram o efeito de uma dose supraterapêutica 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. As funcionalidades do sistema vestibular e cerebelar não sofreram alterações. 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. A contagem de espermatozoide do epidídimo, motilidade e produção diária, bem como o número de espermátides/testículos após o tratamento demonstrou que não houve efeito na espermatogênese nem a função epididimal.

## 2.2 Compostos fenólicos

Os vegetais, bem como todos organismos vivos, produzem, degradam e transformam alguns produtos químicos que podem estar diretamente relacionados as necessidades vitais ou não. Nos vegetais podemos classificar esses compostos em duas grandes classes, dependendo da



função exercida no organismo, em metabólitos primários e secundários (Santos e Mello, 2007; Poser, 2017).

São componentes do grupo dos metabólitos primários, aqueles que são essenciais para a manutenção e funcionamento do organismo, como os lipídeos, proteínas, nucleotídeos e polissacarídeos. Os metabólitos primários estão diretamente relacionados à manutenção da vida e reprodução. Os metabólitos primários ainda têm o papel de precursor na síntese dos metabólitos secundários. Essa produção segue o que chamamos de rotas biossintéticas. Os metabólitos secundários, por sua vez estão relacionados com os processos de relação do indivíduo com o meio ambiente, portanto não são indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento do organismo quando este está inserido em um ambiente sem muita complexidade. Em geral a estrutura química desses metabólitos é complexa, possuindo baixo peso molecular com atividades biológicas importantes, apresentando vantagens para sobrevivência e perpetuação da espécie. apresentam uma estrutura complexa, baixo peso molecular e atividades biológicas expressivas. A produção dos metabólitos secundários é influenciada por fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, ciclo dia/noite, idade do indivíduo, época de desenvolvimento da planta, órgão vegetal usado como farmacógeno, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes, níveis de radiação UV, altitude e níveis de poluição (Poser e Mentz, 2007; Santos e Mello, 2007; Kreis et al., 2017).

A classe dos compostos fenólicos abrange uma grande quantidade de metabólitos secundários, sendo amplamente distribuídos entre os vegetais, podendo ser encontrados em frutas, vegetais e grãos. São caracterizados por possuir uma estrutura fenólica (anel aromático com ao menos um hidrogênio substituído por uma hidroxila). Os componentes dessa classe apresentam estruturas químicas muito variadas, podendo ser muito simples, como a do ácido gálico, ou muito complexa, com alto grau de polimerização, como alguns taninos hidrolisáveis. A produção desses compostos pode seguir duas vias, a do ácido chiquímico ou a do acetato. Esses compostos podem ser subdivididos de acordo com o esqueleto base, como os flavonoides, alcaloides e taninos (Bravo, 1998; Tsao, 2010).

Ao longo dos anos diversos estudos têm demonstrado que o consumo de alimentos e bebidas rico em compostos fenólicos são benéficos para saúde humana. Esses compostos auxiliam na prevenção e proteção contra doenças crônicas cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, osteoporose, inflamação e câncer (Fantini et al., 2015; Grootaert et al., 2015; Chowdhury et al., 2016).

Diversos estudos avaliaram a atividade de compostos fenólicos *in vitro* e *in vivo*. Esses compostos foram capazes de inibir a proliferação de células tumorais, inibição de enzimas pro-oxidantes, atividade anti-inflamatória por diferentes vias, atividade protetora celular e antiobesidade (Naasani et al., 2003; Sadik et al., 2003; Kubota et al., 2009; Hussain et al., 2013; Yang et al., 2013; Curti et al., 2014; D'Andrea, 2015; Yu et al., 2015; Gracia et al., 2016).

### 2.3 Taninos

Seguin foi o primeiro a definir os taninos em 1796, ele estabeleceu o princípio adstringente da casca de carvalho, que permite a transformação da pele de animais em um material resistente à água e ao putrescimento. Os taninos podem apresentar peso molecular entre intermediário a alto. São compostos ricos em hidroxilas, o que faz com que eles se complexem com carboidratos e proteínas formando precipitados insolúveis (Costa, 1994; Bravo, 1998).

Uma forma de se classificar os taninos é de acordo com a estrutura química, podendo ser condensado ou hidrolisável. O tanino hidrolisável é caracterizado por possuir um poliol central ( $\beta$ -D-glicose), que tem suas funções hidroxilas esterificadas com o ácido gálico como a  $\beta$ -1,2,3,4,5-pentagaloil-D-glicose. Os taninos hidrolisáveis podem ser divididos em galotaninos, que são formados em decorrência da união de unidades de ácido gálico, por meio de ligações *meta*-depidídicas, e elagitaninos que apresentam 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. Os galotaninos estão presentes em maior quantidade em galhos (Costa, 1994; Battestin et al., 2004; Santos e Mello, 2007).

Monômeros de taninos condensados podem sofrer condensação formando oligômeros, chamados de taninos condensados ou proantocianidinas. Essa condensação acontece pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Sua característica mais marcante é coloração avermelhada da cianidina e delphinidina (Santos e Mello, 2007).

A adstringência é uma das principais características dos taninos, explicada pela complexação desses compostos com proteínas presentes nas células superficiais da mucosa e de tecidos descobertos, produzindo uma camada de revestimento capaz de proteger o tecido. Essa proteção atua diminuindo o volume de secreção liberado, impedindo que as células absorvam substâncias que sejam tóxicas e irritantes. No intestino os taninos precipitam as proteínas, recobrando as células superficiais da mucosa, bloqueando a absorção e diminuindo os movimentos peristálticos, justificando o uso de plantas ricas em taninos como remédio para diarreia provocada por inflamação (Costa, 1994).

Os taninos apresentam poder antisséptico por impedir o desenvolvimento de microorganismos de vida sua complexação com proteínas, além da ação desinfetante que é característica dos compostos fenólicos. As propriedades hemostáticas dos taninos em hemorragias capilares se devem a capacidade de formar coágulos ao se precipitarem com proteínas presentes no soro (Costa, 1994).

Plantas ricas em taninos foram estudadas a fim de confirmar as propriedades biológicas dessa classe. Diversas atividades biológicas foram atribuídas aos taninos: antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Proteus vulgare* Hausere, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* T. Escherich, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* Berkhout; atividade tóxica em herbívoros; atividade inibitória do crescimento

de células tumorais de próstata entre outras; indução da morte celular; atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis*; atividade antioxidante; agente emulsificante (Nishizawa et al., 1990; Ayres et al., 1997; Saleem et al., 2002; Stolarczyk et al., 2013; Fyhrquist et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Figueroa-Espinoza et al., 2015; Deng et al., 2016; Morey et al., 2016; Jaradat et al., 2017).

#### 2.4 *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* é considerada o membro mais antigo e mais comum da microbiota estomacal do homem, sendo que aproximadamente metade da população mundial apresenta essa bactéria como colonizadora do estômago. Em 1982 Marshall e Warren isolaram a bactéria da mucosa gástrica, e somente em 1989 foi nomeada como *Helicobacter pylori*. Essa bactéria pertence a classe Epsilonproteobacteria. É um bacilo Gram-negativo curvo ou helicoidal, microaerófilo e apresenta flagelos envelopados com temperatura ótima de cultura 37,0 °C. Pode ser encontrada em associação com processos infecciosos no homem, associada com o epitélio gástrico, como úlcera gástrica ou duodenal, gastrite, adenocarcinoma gástrico, linfoma do tecido associado à mucosa (MALT) e linfoma gástrico de células B primária (Trabulsi e Alterthum, 2015; Maixner et al., 2019; Charitos et al., 2021; McNulty, 2023).

Para ser capaz de sobreviver no estômago humano, um ambiente não favorável para o crescimento bacteriano, a bactéria é capaz de expressar fatores de virulência, ou seja, apresentam estruturas celulares, moléculas e sistemas reguladores que permitem que a bactéria colonize o hospedeiro. Esses fatores funcionam de formas diferentes, aumentando as possibilidades da bactéria interagir com o hospedeiro. Os fatores de virulência que *H. pylori* pode apresentar 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. São esses fatores os responsáveis pela bactéria ser tão bem adaptada e capaz de manter a infecção de forma persistente (Wroblewski et al., 2010; Wessler, 2016; Šterbenc et al., 2019).

Para que a bactéria cause a infecção, ela precisa sobreviver às condições ácidas do estômago, fazendo a neutralização do ácido por meio da hidrólise da ureia em amônio e CO<sub>2</sub>, resultando em um pH estomacal neutro e na danificação ou até mesmo destruição das células do estômago. Depois de alterar o pH a bactéria precisa alcançar o epitélio gástrico a fim de colonizar essas células, para isso as bactérias apresentam os flagelos, responsáveis pela motilidade bacteriana em soluções mais viscosas, que é a condição do muco que recobre o epitélio. 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).

Ao chegar às células epiteliais, a interação da bactéria com as células acontece por meio dos receptores celulares e adesinas bacterianas, essa interação impede que a bactéria seja removida do estômago pelo clearance mecânico, resultante do peristaltismo e do esvaziamento gástrico. Ao concluir a adesão às células estomacais, a bacteriana 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).

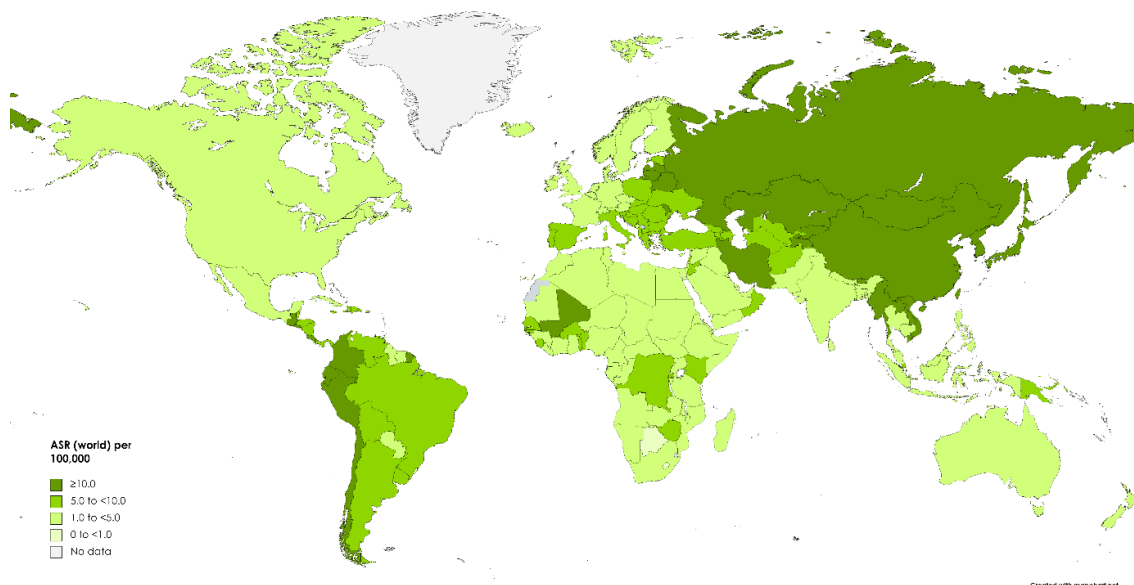
A adesão da *H. pylori* às células epiteliais do hospedeiro é essencial para a sobrevivência da bactéria e sua consequente colonização nas condições do ambiente estomacal, pois a constante produção de ácido clorídrico e a renovação celular a cada 2-3 dias são desfavoráveis à colonização. Para sobreviver a essas condições a bactéria deve se aderir às células hospedeiras e essa adesão só é alcançada devido as famílias de proteínas de membrana externa e proteínas do sistema de secreção tipo IV da bactéria (Bonsor e Sundberg, 2019).

As adesinas são as proteínas responsáveis pelo reconhecimento de moléculas presentes nas células do hospedeiro (açúcares ou proteínas). As adesinas Bab (A/B/C) são adesinas de ligação ao antígeno do grupo sanguíneo. Essas adesinas reconhecem e se ligam aos antígenos dos grupos sanguíneos que estão presentes na superfície das células epiteliais gástricas. Adesinas Sab (A/B) são proteínas de ligação ao ácido siálico. SabA reconhece e conecta glicanos sialilados, que podem ser encontrados em baixa concentração na mucosa gástrica normal. Além disso as SabA podem se ligar a dois gangliosídeos menores no estômago, que podem promover a infecção inicial. Essas adesinas ainda podem se ligar a proteínas sialiladas nos eritrócitos, levando a hemaglutinação (Bonsor e Sundberg, 2019).

São descritos três fenótipos gástricos principais causados pela infecção por *H. pylori*, definidos de acordo com as anormalidades patológicas desenvolvidas. A gastrite simples ou gastrite benigna é o fenótipo caracterizado por uma gastrite leve com pouca interferência na secreção do ácido gástrico. É observada em indivíduos assintomáticos, que não apresentam doença gastrointestinal grave. A úlcera duodenal é caracterizada 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 câncer gástrico é o terceiro fenótipo descrito, é caracterizado pelo padrão predominante de gastrite atrófica multifocal, com pouca secreção de ácido gástrico. É resultado direto da inflamação crônica induzida pela infecção. Portanto a presença da bactéria aumenta o risco do câncer gástrico, sendo classificada como um carcinógeno do grupo I. Entre aproximadamente 65-80% dos casos de câncer gástrico é identificada a presença de *H. pylori*, que é também associada a ocorrência de adenocarcinoma e linfoma gástrico (IARC, 1994; El-Omar et al., 1995; El-Omar et al., 1997; Helicobacter and Group, 2001; Amieva e El-Omar, 2008; Sitarz et al., 2018).

A prevalência da bactéria pode variar de acordo com as condições socioeconômicas dos indivíduos, bem como com a origem étnica. Além disso o método de diagnose da infecção pode ser uma fonte de variação da prevalência, devido a variação da sensibilidade e especificidade do método usado. É observado que o declínio da prevalência de *H. pylori* se dá com a melhora das condições gerais de higiene, por ser um fator determinante na transmissão da infecção. A melhoria da higiene pode ser observada com a melhora das condições socioeconômicas da população, pois resulta em uma maior disponibilidade de água potável e saneamento, conseqüentemente a uma melhor higiene doméstica (Hooi et al., 2017; Sjomina et al., 2018; Zamani et al., 2018; Curado et al., 2019; Farhadkhani et al., 2019; Varga et al., 2020; Yang et al., 2022; Li et al., 2023).

A taxa de infecção por *H. pylori*, varia de um continente para outro, e às vezes de forma considerável dentro do próprio continente (Figura 2). A prevalência da infecção por *H. pylori* no período entre 1980-2022 foi de 48,9% no mundo todo. Quando avaliada por períodos a prevalência global de *H. pylori* apresentou um decréscimo entre os anos 1980-1990 (58,2%) para os anos 2011-2022 (43,1%). Considerando as regiões da OMS a menor prevalência foi reportada na região do Sudeste Asiático (46,6%), enquanto a maior prevalência foi reportada na região do Mediterrâneo Oriental (59,1%), seguida da região Africana (58,3%). A região Europeia apresentou uma prevalência de 47,5%, da região das Américas foi 46,9% e da região do Pacífico Ocidental 46,8%. De modo geral a prevalência de *H. pylori* foi menor em indivíduos com menos de 20 anos de idade (37,7%), sendo que a maior prevalência foi reportada em indivíduos com mais de 60 anos (56,1%). No período de 1980-1990 a região com maior prevalência era a Africana (85,1%), enquanto na região das Américas, Europeia e Pacífico Ocidental a prevalência variou de 52,7 a 59,2%. No período de 2011-2022 somente as regiões do Mediterrâneo Oriental e Africana apresentaram prevalência acima de 50%. A menor prevalência nesse período foi na região das Américas (32,8%). Já as regiões Europeia, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental reportaram prevalência em torno de 40%.(Hooi et al., 2017; Zamani et al., 2018; Li et al., 2023).



**Figura 2.** Representação gráfica da prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* em todo o mundo (Martel et al., 2020).

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. Em 2018 2,2 milhões de novos casos de câncer no mundo todo foram atribuídos a algum tipo de infecção, sendo 13% de todos os casos de câncer, excluindo câncer de pele não melanoma. A presença de *H. pylori* foi responsável por 810.000 casos (8,7 casos por 100.000 pessoas-ano) em 2018, principalmente adenocarcinoma gástrico não cardíaco. O câncer gástrico ocupa o quinto lugar entre as neoplasias malignas mais comuns no mundo e a terceira maior causa de mortalidade por câncer, com alta taxa de mortalidade na América do Sul. 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; Ferlay et al., 2015; Torre et al., 2015; INCA, 2017; Malfertheiner et al., 2017; WHO, 2017; Savoldi et al., 2018; Martel et al., 2020).

Em 2014 foi recomendada a erradicação de *H. pylori* como uma medida preventiva de câncer gástrico, sendo assim de extrema importância o diagnóstico e o tratamento da infecção. Usualmente o tratamento é feito com 2 a 3 antibióticos e um inibidor de bomba de prótons. A seleção do regime de tratamento deve ser feita considerando a taxa de resistência bacteriana na região e a exposição prévia do paciente aos antibióticos. De acordo com o as orientações publicadas pelo Consenso de Maastricht V/Florença 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) por 14 dias. Diversas estratégias terapêuticas

alternativas têm sido propostas a fim de aumentar as taxas de erradicação da bactéria, como um regime terapêutico de quatro drogas, podendo ser terapia quádrupla, sequencial ou concomitante, e o uso do bismuto. A terapia quádrupla com bismuto é composta por um inibidor de bomba de próton ou um antagonista do receptor de histamina-2 mais bismuto, metronidazol e tetraciclina, por 10-14 dias. Essa terapia é indicada como tratamento de primeira linha em regiões onde há resistência à claritromicina. Outra possível terapia é a concomitante, que inclui um inibidor de bomba de próton, amoxicilina, claritromicina e metronidazol de 3 a 10 dias. A terapia sequencial consiste na administração de um inibidor de bomba de próton mais amoxicilina, por cinco dias, seguida por uma terapia tripla contendo um inibidor de bomba de próton, claritromicina e nitroimidazol nos cinco dias restantes de tratamento. A terapia híbrida consiste na administração de um inibidor de bomba e amoxicilina por 7 dias, seguida por 7 dias de inibidor de bomba de próton, amoxicilina, claritromicina e um nitroimidazol (Hunt et al., 2011; Gatta et al., 2013; Liou et al., 2013; Feng et al., 2016; Schwarzer et al., 2016; Thung et al., 2016; Chang et al., 2017; Salehi et al., 2018; Ford et al., 2020; Hu et al., 2020; O'Connor et al., 2020; AJMC, 2021; Sousa et al., 2022; Yang et al., 2022; Ji et al., 2023).

*H. pylori* apresenta como característica o estado fenotipicamente resistente, tornando-a um micro-organismo de difícil erradicação. 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. Além disso a taxa de resistência aos antimicrobianos escolhidos para o tratamento e erradicação da *H. pylori* tem aumentado. A taxa de resistência primária à claritromicina é > 15% na Europa e na região oriental do Mediterrâneo, 10% nas Américas e no sudeste da Ásia. A resistência primária ao metronidazol é superior a 15% em todas as regiões da OMS, a resistência à levofloxacina é  $\geq$  15% em todas as regiões da OMS, com exceção da Europa, enquanto a resistência à claritromicina e metronidazol é de 19% na região oriental do Mediterrâneo e < 10% nas outras regiões. A resistência à amoxicilina e à tetraciclina é  $\leq$  10% em todas as regiões, com exceção da região oriental do Mediterrâneo. A resistência secundária à claritromicina, ao metronidazol e à levofloxacina é  $\geq$  15% em todas as regiões da OMS, e a resistência à amoxicilina e tetraciclina permaneceu  $\leq$  10% em todas as regiões (Wu et al., 2012; Savoldi et al., 2018; Kocsmár et al., 2021).

A gestão de infecções causadas por *H. pylori* ainda é um desafio, já que as taxas de falha de erradicação permanecem elevadas, das recaídas frequentes das úlceras gástricas após a cura completa e do aumento da resistência bacteriana. Por isso busca-se um tratamento com alta taxa de segurança e eficácia e que reduza os efeitos colaterais. Porém a erradicação bem sucedida não é suficiente para garantir que não ocorra uma recaída, sendo assim é recomendada algumas medidas alternativas para manter a não infecção, como uso de pro e prebióticos e produtos naturais. Baseados na necessidade de erradicar e impedir a reinfeção por *H. pylori*, diversos

pesquisadores ao redor do mundo têm estudado extratos vegetais popularmente utilizados, a fim de isolar compostos com custos mais baixos, alta eficácia, biodisponibilidade e que apresentem poucos ou nenhum efeito adverso (Mazzolin et al., 2010; Manyi-Loh et al., 2012; Sousa et al., 2022; Yang et al., 2022; Ji et al., 2023).

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. Extratos aquosos e metanólicos de folhas, raízes e hastes de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D. D. Kec, *Mentha*, *Cuphea aequipetala* Cav., *Ludwigia repens* J. R. Forst. *Persea americana* Mill., *Annona cherimola* Mill., *Moussonia deppeana* (Schltdl. & Cham.) Klotzsch ex Hemsl. e *Guaiacum coulteri* A. Gray apresentaram CIM<sub>100</sub> entre 7,5 a 250 µg/mL.

Ao avaliarem a ação anti-*H. pylori* de diversas plantas Cogo et al. (2010) observaram que *Chamomilla recutita* L. e *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. demonstraram CIM<sub>50</sub> < 625 a 1250 µg/mL. Enquanto os valores de CIM<sub>90</sub> demonstraram que *I. paraguariensis* (CIM<sub>90</sub> 5000 µg/mL) foi capaz de inibir um maior número de isolados clínicos quando comparado com os outros extratos.

Rozza et al. (2011) avaliaram a ação anti-*H. pylori* do óleo essencial da casca do limão siciliano (*Citrus limon* (L.) Osbeck) e do limoneno e β-pireno. Foi observada uma atividade contra *H. pylori*, CIM<sub>100</sub> de 125 e 74 µg/mL do óleo essencial e do limoneno.

Messing et al. (2014) avaliaram a interação de polissacarídeos presentes nas sementes de *Ribes nigrum* L. como um agente antiadesivo e a influência desses compostos na expressão gênica de diferentes OMPs e fatores de virulência de *H. pylori*. Foi observado que os polissacarídeos foram capazes de inibir a ligação da bactéria às células AGS, sem afetar a bactéria e células de adenocarcinoma gástrico. Esses compostos ainda foram capazes de inibir a ligação da BabA e da adesina de ligação de fibronectina aos seus ligantes específicos, resultando na inibição da adesão bacteriana.

Nontakham et al. (2014) isolaram xantonas das raízes de *Garcinia fusca* Pierre e a atividade anti-*H. pylori* dessas substâncias isoladas foi avaliada em duas cepas clínicas. A CIM das substâncias isoladas cowaxantona, fucugisídeo e isojacareubina foi de 4,6, 10,8 e 23,9 µM, maiores do que a apresentada pelos controles metronidazol e amoxicilina.

Awaad et al. (2015) avaliaram a atividade anti-*H. pylori* do extrato etanólico das partes aéreas de *Convolvulus autro-egyptiacus* e das substâncias isoladas escopoletina e escopolina. Os sete isolados clínicos utilizados no teste foram sensíveis às substâncias testadas no ensaio de disco difusão. As substâncias isoladas apresentaram a menor CIM (50 µg/mL) para três cepas de isolados clínicos e para cepa ATCC® 43504 usada como referência.

Thöle et al. (2015) estudaram a capacidade de polímeros presentes nos frutos imaturos de *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench de inibir a adesão de *H. pylori* em células AGS. As frações obtidas a partir do extrato aquoso tiveram um efeito antiadesivo significativo em *H. pylori* da cepa



J99 e em bactérias obtidas a partir de isolados clínicos. Além disso foi observada uma redução da ligação bacteriana a ligantes complementares a BabA e SabA.

Rong et al. (2016) investigaram os efeitos bactericidas de *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep var. *craveniana* (S.Y.Hu) Lo em *H. pylori*. Para o constituinte majoritário do extrato etanólico, palmatina, foi obtida uma CIM= 6,25 µg/mL e 3,12 µg/mL para as cepas SCYA201401 e SS1 de *H. pylori*. Já nos estudos *in vivo* a taxa de erradicação da bactéria em camundongos foi de 80 e 50% para o extrato e a palmatina, respectivamente, comparado a taxa do grupo tratado com a terapia tripla (70%).

Borges et al. (2020) avaliaram a atividade anti-*H. pylori* da fração acetato de etila das folhas de *Plectranthus barbatus* Andrews em cepa ATCC®. Como resultado o valor da CIM foi 256 µg/mL e da CBM 1024 µg/mL.

Yahya et al. (2022) testaram a atividade biológica de um gel de *Aloe vera* (L.) Burm.f. com nanopolímeros como nanopartículas de quitosana. Foi analisada ainda o efeito desse gel no crescimento de *H. pylori*. O gel de *A. vera* inibiu o crescimento de duas cepas de *H. pylori*, com zonas de inibição de 16 e 16,5 mm. O gel incorporado com nanopolímeros apresentou uma inibição maior (28 e 30 mm). Já a CIM foi 15,62 e 3,90 µg/mL, enquanto a CBM foi 15,60 e 7,80 µg/mL.

Gomes et al. (2022) avaliaram os efeitos de extrato etanólico de folhas de *Xylopiya sericea* A. St.-Hil no crescimento de *H. pylori*, a toxicidade em células AGS e na produção de citocinas. O extrato foi capaz de inibir a produção de NO e IL-6 na concentração de 100 µg/mL. Para o TNF-α e os níveis de superóxido as concentrações testadas do extrato não foram inibitórias. Com relação a inibição da enzima urease o extrato etanólico foi capaz de inibir a enzima de forma dose-dependente, semelhante ao ácido bórico (278,7 µg/mL), em uma concentração de 282,3 µg/mL para o extrato. O extrato não demonstrou toxicidade nas células AGS.

Ao avaliar a atividade anti-*H. pylori* de extrato hidroetanólico da própolis vermelha Santiago et al. (2022) determinaram *in vitro* a CIM e CBM. Foi determinada uma CIM de 50 µg/mL para cepa ATCC 43526, e 100 µg/mL para uma cepa de isolado clínico, enquanto o padrão usado (tetraciclina) apresentou uma CIM de 0,74 µg/mL. No ensaio *in vivo*, ao avaliar a mucosa de ratos, os tratamentos reduziram a quantidade de bactéria no estômago, e na concentração de 300 mg/kg modulou a resposta inflamatória tecidual.

Athaydes et al. (2022) avaliaram o efeito de extrato hidroetanólico de sementes de *Persea americana* Mill. e suas frações contra a infecção por *H. pylori*, o processo patológico, e em células de adenocarcinoma gástrico. Na maior concentração testada (1024 µg/mL) o extrato e as frações apresentaram inibição da enzima urease que variou entre 14,92-22,42%. A CIM foi de 128 µg/mL para a fração acetato de etila em relação as duas cepas testadas, sendo que para a cepa ATCC 43629 a CBM foi de 256 µg/mL. Foi identificada a presença de bolhas e deformações na membrana das bactérias tratadas com o extrato e frações de *P. americana*. Quando avaliada a

atividade das frações acetato de etila e hexano em células de adenocarcinoma gástrico, as frações apresentaram IC<sub>50</sub> de 55,43 e 11,80 µg/mL, respectivamente.

Nguyen et al. (2022) testaram a atividade antiadesiva do extrato aquoso de *Basella alba* L. contra *H. pylori*. Foi possível observar que o extrato, nem o polissacarídeo isolado reduziram a viabilidade celular de células de adenocarcinoma gástrico (AGS) nem de *H. pylori*. Porém foi possível determinar a capacidade de inibir a adesão da bactéria às células AGS de maneira dose-dependente.

Sosa et al. (2022) avaliaram o efeito *in vivo* de azeite de oliva extra virgem, hidroxitirosol e oleuropeína em duas cepas de *H. pylori* e o efeito *in vivo* sobre a mucosa gástrica de camundongos infectados com a bactéria. No ensaio *in vitro* os autores observaram uma CIM de 229,5 µg/mL para o azeite, sendo que as substâncias testadas não tiveram efeito de forma isolada. Para os ensaios *in vivo* foi possível observar uma aparência saudável na mucosa gástrica de animais tratados com o azeite de oliva e os animais do grupo controle. Nas análises histológicas os animais do grupo tratado com azeite de oliva apresentaram características normais.

Xu et al. (2022) identificaram e testaram novas naftoquinonas diglicosiladas e novas antraquinonas extraídas das partes aéreas de *Mitracarpus hirtus* (L.) DC. contra *H. pylori*. Alguns compostos apresentaram atividade antibactericida contra múltiplas cepas de *H. pylori*, sendo que a CIM variou de 0,065-64 µg/mL. Além disso foi observada a capacidade de romper biofilmes maduros de *H. pylori*, tendo erradicado 51% dos biofilmes pré-formados.

Ayoub et al. (2022) avaliaram a potencial atividade inibitória de *H. pylori* do extrato metanólico e do óleo essencial de folhas e tronco de *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W.Moore. Foi observada uma CIM de 3,9 µg/mL do óleo essencial do tronco de *P. racemosa*, e uma CIM de 15,63 µg/mL do extrato metanólico do tronco. Sendo que esses resultados são muito próximos aos valores obtidos para o padrão usado (claritromicina) que foi de 1,95 µg/mL. Já a análise *in silico* revelou que alguns dos compostos presentes nos extratos apresenta potencial inibitório na enzima urease.

Elraey et al. (2022) avaliou a atividade de extrato hidroalcolico de folhas de *Vitis vinifera* L. bem como de dois flavonoides isolados em seis cepas de isolado clinico de *H. pylori* resistentes a claritromicina. O extrato e os flavonoides testados isoladamente e em combinação com claritromicina reduziram o crescimento bacteriano, com CIM variando de 1,20-8,20 µg/mL. Na análise de *docking* molecular dos compostos isolados de *V. vinifera* foi possível sugerir que os dois flavonoides podem inibir a atividade de HypB, enzima bacteriana que auxilia no processo de colonização da bactéria.

Jeong et al. (2022) identificaram dois diterpenos a partir do extrato metanólico de *Pinus elderica* (Medw.) Silba. Ao avaliar o potencial antibacteriano desses compostos, obtiveram uma inibição de 72,7% de *H. pylori*, com CIM<sub>50</sub> de 92 µM para o ácido de óxido de manóila, e 54,5% com CIM<sub>50</sub> de 95 µM para eldaricóximo A.

Sayed et al. (2022) avaliaram a atividade o extrato metanólico de sementes de *Moringa oleifera* Lam. e também do óleo obtido das sementes contra *H. pylori*. Os resultados apontaram o extrato metanólico como um potente inibidor do crescimento bacteriano com  $CIM_{50} = 0,92 \mu\text{g/mL}$ .

Elhefni et al. (2023) investigaram o potencial anti-*H. pylori* e anti-inflamatório de compostos isolados de *Phoenix dactylifera* Linn CV 'Zaghloul'. Foi observada a atividade anti-*H. pylori* de diversos compostos, com CIM variando de 0,48 a 1,95  $\mu\text{g/mL}$ , bem como uma atividade anti-inflamatória promissora com valores de  $IC_{50}$  variando de 0,45 a 1,04  $\mu\text{g/mL}$ .

Widelski et al. (2023) fizeram avaliação anti-*H. pylori in vitro* de extrato etanólico 70% de diferentes amostras de própolis. Todas as amostras avaliadas apresentaram atividade bactericida contra as cepas testadas, sendo uma ATCC e 10 isolados clínicos com resistência a antibióticos. A amostra que apresentou o melhor potencial anti-*H. pylori* teve uma  $CIM = 31,3 \mu\text{g/mL}$ , sendo que algumas amostras apresentaram  $CIM = 62,5$  e  $125 \mu\text{g/mL}$ . Com relação a inibição da enzima urease as amostras apresentaram valores de  $IC_{50}$  que variaram de 4,01 a 1484,8  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação da atividade de extratos; frações e substâncias isoladas obtidos das folhas de *Monteverdia ilicifolia* (Mart. ex Reissek) Biral (Celastraceae), anti-*H. pylori*, avaliando a atividade antiadesão.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Isolar, purificar e identificar compostos em frações obtidas das folhas de *M. ilicifolia*;
- Avaliar a atividade anti-*H. pylori* de substâncias isoladas a partir dos extratos de folhas de *M. ilicifolia*;
- Avaliar a atividade antiadesão de frações e compostos isolados de *M. ilicifolia*;
- Desenvolver metodologia analítica para análise de extrato semipurificado de *M. ilicifolia*.

#### 4 Atividade antiadesiva de *Maytenus ilicifolia* contra *Helicobacter pylori*

##### Anti-Adhesive Activity of *Maytenus ilicifolia* Against *Helicobacter pylori*

Mariana Nascimento de Paula<sup>1,2</sup>, Maren Kelm<sup>2</sup>, Nico Symma<sup>2</sup>, Raquel Garcia Isolani<sup>1</sup>, Fernanda Pilatti da Silva<sup>1</sup>, Jandirk Sendker<sup>2</sup>, Andreas Hensel<sup>2</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

<sup>2</sup>Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Corrensstraße 48, D-48149, Münster, Germany

Corresponding author: João Carlos Palazzo de Mello, mello@uem.br


Journal: Revista Brasileira de Farmacognosia

de Paula, M.N., Kelm, M., Symma, N., Isolani, R.G, Silva, F.P., Sendker, J., Hensel, A., Mello, J.C.P. Anti-adhesive Activity of *Maytenus ilicifolia* Against *Helicobacter pylori*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **31**, 726–731 (2021).

DOI: <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00214-w>

Short communication | [Published: 03 December 2021](#)

### Anti-adhesive Activity of *Maytenus ilicifolia* Against *Helicobacter pylori*

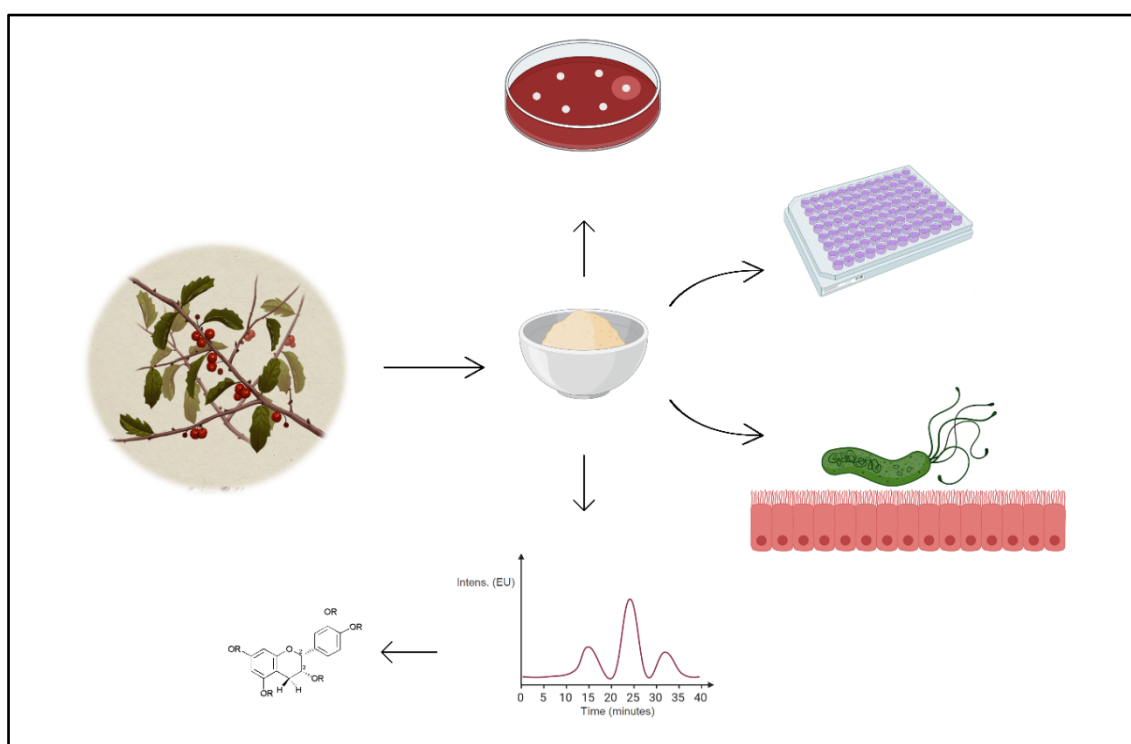
[Mariana Nascimento de Paula](#), [Maren Kelm](#), [Nico Symma](#), [Raquel Garcia Isolani](#), [Fernanda Pilatti da Silva](#), [Jandirk Sendker](#), [Andreas Hensel](#) & [João Carlos Palazzo de Mello](#) 

[Revista Brasileira de Farmacognosia](#) **31**, 726–731 (2021) | [Cite this article](#)

61 Accesses | 1 Altmetric | [Metrics](#)

**Abstract:** *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae, a Brazilian native medicinal plant, is widely used for the treatment of gastric ulcer. The present study aimed to investigate whether this plant can be correlated to an anti-virulence activity Against *Helicobacter pylori*. Hydroalcoholic and hydroacetic extracts did not influence the bacterial proliferation and had no relevant activity on the mitochondrial activity of human stomach AGS cells (1000 to 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Flow-cytometric adhesion assay of fluorescent-labeled *H. pylori* J99 on AGS cells indicated significant anti-adhesive effects of hydroalcoholic extracts in the concentration range of 1000 to 250  $\mu\text{g/ml}$ , and even stronger activity was observed for hydroacetic extracts ( $\text{IC}_{50}$  615  $\mu\text{g/ml}$ ). Analytical LC-MS studies of fractions revealed the presence of flavonoid glycosides and oligomeric proanthocyanidins. The active components were shown to interact predominantly with adhesion systems of *H. pylori*, while pre-treatment of the AGS cells resulted in less pronounced effects.

**Keywords:** Adhesion; Proanthocyanidins; Glycosylated flavonoids; Espinheira-santa; Gram-negative bacteria.



## Introduction

*Helicobacter pylori* is a Gram-negative spiral-shaped microorganism, which grows under microaerophilic conditions and can colonize the epithelial lining of the human stomach (Ghasemian et al. 2019). It is estimated that around 50% of the world's population is infected by *H. pylori*. In this context, Latin America has the highest infection rate worldwide, with an estimated prevalence of about 58% (Zamani et al. 2018; Curado et al. 2019). *H. pylori* first-line treatment involves proton pump inhibitors together with two or three antibiotics (mostly amoxicillin, clarithromycin, metronidazole or tetracycline), considering the local prevalence antibiotic resistance. *H. pylori* eradication rates have decreased in the last 10 years, mostly due to a dramatic increase in antimicrobial resistance. According to the World Health Organization antibiotic resistance of *H. pylori* exceeds 15% in most regions (Savoldi et al. 2018; Smith et al. 2019). Infections with *H. pylori* are responsible for chronic gastric inflammation, often accompanied with gastric and duodenal ulcers. Additionally, *H. pylori* is classified by WHO as a group I carcinogen, strongly associated with the occurrence of adenocarcinoma and gastric lymphoma. On the other side, 65 to 80% of gastric cancers are reported to test positive for *H. pylori* (Sitarz et al. 2018). Gastric cancer is the fifth most common malignancy in the world, and the third leading cause of cancer-associated mortality, with a high lethality in South America (Malfertheiner et al. 2017; Savoldi et al. 2018).

Since centuries, herbal medicines have been used to treat various diseases. Herbal medicines are commonly regarded as inexpensive, and complementary or alternative remedies (Ghasemian et al. 2019). *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae, is popularly known in Brazil as “espinheira-santa”. The leaves have a long tradition of use due to their analgesic, antitumoral, aphrodisiac, contraceptive, antiulcer, diuretic, and healing activities (Mossi et al. 2009). Some biological and pharmacological activities have been proven, such as antiulcerogenic (Souza-Formigoni et al. 1991), antioxidant (Pessuto et al. 2009), anti-inflammatory (Wonfor et al. 2017), antidiabetic (Tabach et al. 2017), and antimicrobial properties (Vieitez et al. 2018). The leaves extracts were chemically characterized by the presence of triterpenes, essential oils (Ohsaki et al. 2004), and tannins (Pessuto et al. 2009).

The following study aimed to evaluate the potential activity of *M. ilicifolia* leaves extracts against *H. pylori*, and to identify compounds responsible for this activity. Treatment options of *H. pylori* infections are not only based on the disease eradication by the use of classical antibiotics with anti-proliferative activity. Since a few years, there is increasing use of compounds which specifically interact with virulence factors of the pathogens. The screening for such anti-adhesive, anti-quorum sensing, or anti-invasive compounds has been strongly intensified (Peña-González et al. 2020). In particular, the increasing discovery of anti-adhesive natural compounds (Georgi et al. 2017; Lu et al. 2018; Ngnameko et al. 2019), makes it reasonable to consider such a mechanism of action for the antiulcerogenic activity of *M. ilicifolia*.

## Materials and Methods

Leaves from *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae, were collected in Marialva, Paraná, Brazil (23°28'43''S; 51°47'39''W; 622 m altitude), in February 2016. The plant material was identified by Prof. Dr. E. Jacomassi (UNIPAR, Umuarama, Brazil) and deposited in the Universidade Estadual de Maringá herbarium under the registration number HUEM#29221. The material was collected with the permission of IBAMA-SISBIO (registration number 11995-3). Access to the botanical material was registered by the Brazilian *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado*, SisGen under #AB65084.

Pulverized dried defatted leaves (570 g) were extracted (10%, w/v) as described by Pessuto et al. (2009). The yield for the crude extract obtained of EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v; CE2) was 143.3 g (25.2%, w/w) and for the crude extract (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO:water (7:3 v/v; CE5) was 138.4 g (24.31%, w/w). Each individual extract (100 g) was resuspended in water (1 l), followed by portioning with ethyl acetate (1 l, 8 ×), the yield after liophilisation was EAF2 17.2 g (17.1%; w/w, related to the crude extract), and AQF2 69.42 g, (69.3%; w/w, related to the crude extract) for CE2 and EAF5 20.8 g, (20.8%; w/w, related to the crude extract), and AQF5 72.1 g, (71.9%; w/w, related to the crude extract) for CE5.

For cell viability determination and for the anti-adhesive assay it was used human adherent gastric adenocarcinoma epithelial cells (AGS, ATCC CRL-1739) (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.), originate from the gastric adenocarcinoma of a 54-year-old Caucasian woman, cultivated at 37 °C/5% CO<sub>2</sub> (Chierrito et al. 2019) in RPMI 1640 with L-glutamine medium, 10% FCS (v/v) and 1% Penicillin/Streptomycin (v/v). To investigate the influence of test extracts on the mitochondrial activity and the viability of AGS cells MTT assay was performed according (Gottesmann et al. 2020b).

*Helicobacter pylori* strain J99 (ATCC 700824), isolated from a patient with duodenal ulcer and identified by PCR for *vacA* and *cagA* genes (related to *H. pylori* virulence). The bacteria were cultivate on a tryptic soy agar plate that were incubated for 48 h/37 °C under microaerophilic conditions (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>), in a sealed jar. After incubation, bacteria were harvested in their log-phase with a flame sterilized metal loop and suspended in PBS (Gottesmann et al. 2020b). The agar diffusion test were performed according (Gottesmann et al. 2020a). To labelling bacteria, agar grown *H. pylori* were harvested and resuspended in sterile saline solution pH 9. An OD<sub>550</sub> of 5 per ml (=1.75 × 10<sup>9</sup> CFU/ml) was adjusted. Fluorescein isothiocyanate (FITC) solution (1% w/v in DMSO) were added to the bacteria and the suspension was incubated under shaking (350 rpm) for 30 min/37 °C. The labelling was finished by centrifugation of the suspension (4.725 × g, 5 min). After the excess of FITC were removed, the pellet was suspended in blocking buffer (PBS with 0.2% (w/v) BSA and 0.05% (v/v) Tween 20) for further use.



Potential anti-adhesive effects were evaluated using *in vitro* assay with AGS cells and fluorescent-labelled bacteria by four different protocols. In each protocol it was used labelled bacteria  $OD_{550} = 0.15$ . AGS cells were cultivated in 6-well plates ( $2.5 \times 10^5$  cells/ well, 48 h/37 °C/5% CO<sub>2</sub>). FITC-labelled *H. pylori* were incubated with test solutions for 2 h/37 °C, for the pre-treatment of bacteria. The suspension was centrifuged and washed 3 × to remove unbound material. Bacteria were resuspended in cell culture media and added into 6-well plates with AGS cells, 48 h cultivated, the plates were incubated for 1 h, then trypsinised. Co-incubation of cells and bacteria was performed adding FITC-labelled bacteria and samples, resuspended in cell culture medium, in the AGS cells for 2 h/37 °C. Unbound bacteria were removed by two washing steps using PBS and subsequently trypsinised. Pre-treatment of cells was performed for 2 h/37 °C with test solutions. FITC-labelled bacteria were added and incubated for 1 h/37 °C. Cells were detached by trypsinisation, resuspended in cell culture media and analysed by flow cytometry (FACS Calibur, BD, Heidelberg, Germany). Flow cytometry instrument settings: FSC (Detector): E-1 (Voltage), 3.00 (Amp Gain) Lin (Mode): SSC: 352, 1.00, Lin; FL1: 360, 1.0, Log (Gottesmann et al. 2020a). Anti-adhesive Okra polysaccharides from *Abelmoschus esculentus* were used as positive control and it was prepared according Gottesmann et al. (2020b).

Samples separation was performed on a Waters Acquity UPLC H-class system, using a Waters Acquity UPLC BEH200 SEC 1.7 µm 4.6 × 150 mm column at 50 °C with an injection volume of 2 µl. The gradient consisted of A: acetonitrile:formic acid (98:2, v/v) and B: methanol:water:formic acid (86:12:2, v/v) was designed as follows: 0-6.18 min, 0-35% B; 6.18-7.75 min 35-40% B; 7.75-9.00 min at 40% B; 9.00-10.50 min 40-100% B; 10.5-13 min at 100% B; 13-15 min 100-0% B; 15-18 min at 0% B. Flow rate: 1 ml/min. Fluorescence detection:  $\lambda_{ex} = 280$  nm,  $\lambda_{em} = 316$  nm.

For LC-qTOF-MS analysis, samples concentration was 10 mg/ ml in water, using a Dionex Acclaim RSLC 120 C-18 column (2.1 × 100 mm, 2.2 µm) on a Dionex Ultimate 3000 RS LC System (Thermo Fisher), Dionex Ultimate DAD-3000 RS detector ( $\lambda = 200$ –400 nm) and Bruker Daltonics micrOTOF-QII time-of-flight mass spectrometer (Bruker) equipped with an Apollo electrospray ionisation source in positive mode at 3 Hz ( $m/z$  50–1500). using the following instrument settings: nebulizer gas nitrogen, 4 bar; drying gas nitrogen, 9 l/min, 200 °C; capillary voltage -4500 V; end plate offset -500 V; transfer time 100 µs; prepulse storage 6 µs; collision gas nitrogen; collision energy 40 eV; collision RF 130 Vpp. Internal dataset calibration (HPC mode) was performed for each analysis using the mass spectrum of a 10 mM solution of sodium formiate in 50% isopropanol that was infused during LC equilibration using a divert valve equipped with a 20 µl sample loop. The gradient used was A: water:formic acid 0.1% and B: acetonitrile:formic acid 0.1%; 0-0.4 min 95% A, 0.4-9.9 min 0% A, 9.9-15 min 0% A, 15-15.1 min 95% A, 15.1-20 min 95% A. Flow rate: 0.4 ml/min 2 µl injected. Data were analysed using Bruker DataAnalysis 4.1 SP5.

Numerical data were presented as means  $\pm$  standard deviation (SD). Number of repetitions individual assays were different and were given in the description of each of them. Student's t-test or Two-way ANOVA with Bonferroni *post-test* were performed considering values of  $p \leq 0.05$  as statistically significant.

## Results and Discussion

On agar disk diffusion assay we were able to identify that no concentration (2000-1  $\mu\text{g/ml}$ ) of any extract (CE2 or CE5) and its fractions inhibit *H. pylori* growth in 72 h, while amoxicillin (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibit (Figure S1).

The AGS cell viability in 24 h assay shows that the CE2 and CE5 reduced the cell viability from 250-1000  $\mu\text{g/ml}$ , being the CE2 reducing more pronounced (Figure S2a). In 48 h the cell viability was reduced from 250  $\mu\text{g/ml}$  for CE2 and 100  $\mu\text{g/ml}$  for CE5 (Figure S2b). AQF2 decrease the cell viability from 1  $\mu\text{g/ml}$  in 24 h (Figure S3a) while in 48 h the cell viability reduction initiates in 500  $\mu\text{g/ml}$  (Figure S3b). EAF2 reduce the cell viability significantly from 100  $\mu\text{g/ml}$  and 75  $\mu\text{g/ml}$  in 24 h (Figure S3a) and 48 h (Figure S3b), respectively. AQF5 reduce the cell viability significantly from 250  $\mu\text{g/ml}$  in 24 h (Figure S4a) and from 100  $\mu\text{g/ml}$  in 48 h (Figure S4b). However, EAF5 reduce the cell viability significantly from 100  $\mu\text{g/ml}$  and 50  $\mu\text{g/ml}$  in 24 h and 48 h, respectively (Figure S4a and S4b).

To guarantee which extracts and fractions concentrations would be used in the adhesion assay, it was performed the cell viability assay in 2 h. This assay showed us that even the highest concentration tested (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) for crude extract and fractions can be used in the cell viability assay, without causing any loss to the AGS cells (Figure S5). To ensure that the tested substances did not quench fluorescent light emitted by FITC-labelled *H. pylori* used in the adhesion assay, the quenching assay were performed. No significant quenching effects were observed for CE2 and AQF5 until 1000  $\mu\text{g/ml}$ . CE5 and all other fractions showed only a slight reduction in fluorescence intensity for 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

Significant inhibition of the adhesion by about 20 to 40% was observed for CE2 when pre-treated bacteria were used (Figure S6a). The ethyl acetate soluble compounds from EAF2 did not show significant effects concerning the bacterial adhesion, while the fraction AQF2 inhibited the attachment of *H. pylori* to AGS cells by about 30% (Figure S6a).

Much stronger effects in bacteria adhesion were observed for the hydroacetic extract CE5, which reduced the bacterial adhesion by up to 70% with estimated  $\text{IC}_{50}$  of 615.2  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 6b). The effect was depended on the CE5-concentration (1000-250  $\mu\text{g/ml}$ ). This effect was predominantly attributable to EAF5, which exerts inhibition rates up to 80%. The AQF5 inhibited the bacteria attachment by about 30 to 40% (Figure S6b).

Although EAF5 showed better results in inhibiting bacterial adhesion, we followed the study with the AQF5, as it has affected less the AGS cells viability. To evaluate if the host cells

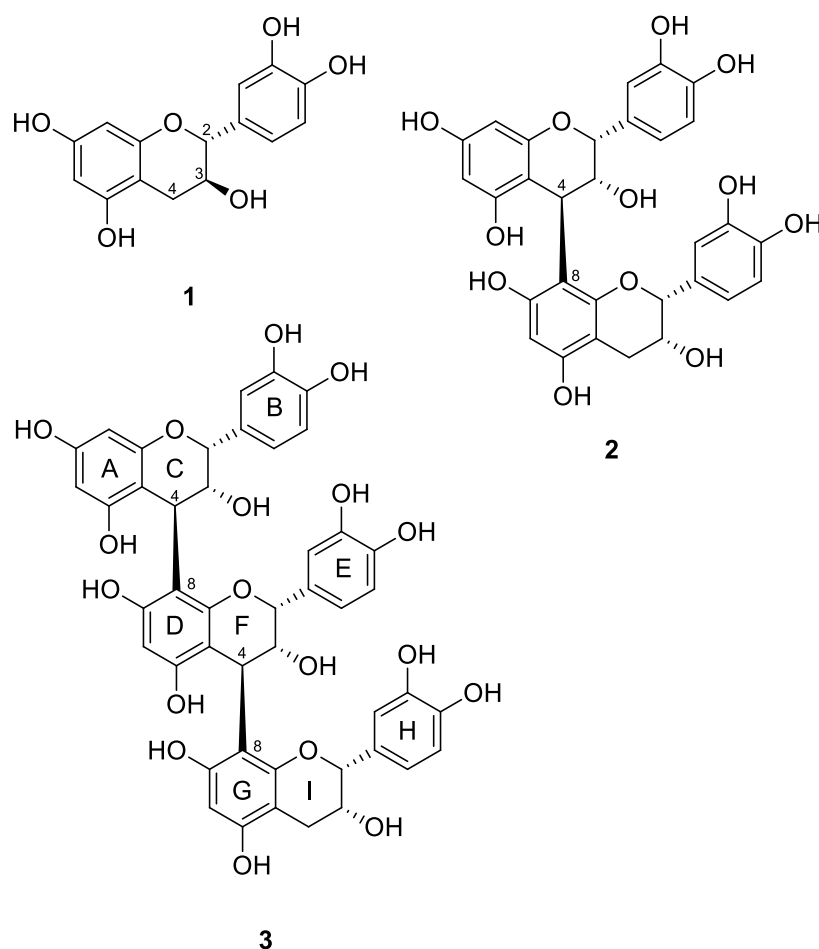
get influenced by the fraction, different treatment protocols were performed (Figure S7). When pre-treating AGS cells for 2 h with AQF5 (1000-100  $\mu\text{g/ml}$ ) the bacterial adhesion decreased significantly, with concentration-dependent inhibition rates from 50 to 80% and a calculated  $\text{IC}_{50}$  of 110.3  $\mu\text{g/ml}$ . An even stronger inhibition of bacterial adhesion was observed after incubating pre-treated host cells (2 h) with pre-treated *H. pylori* (1 h) for 1 h ( $\text{IC}_{50}$  87.2  $\mu\text{g/ml}$ ). From these data, it can be deduced that the inhibitory activity of AQF5 is related to both interaction partners, *H. pylori* as well as host cells. Co-incubation of bacteria, AGS cells, and AQF5 together for 2 h also showed significant inhibition of the bacterial adhesion ( $\text{IC}_{50}$  481  $\mu\text{g/ml}$ ), but the inhibitory activity was significantly lower compared to the inhibition rates found in previous described treatment protocols.

From this, it can be deduced that during co-incubation the bacteria can attach quickly to the host cells, despite the inhibition of the outer membrane proteins of *H. pylori* by AQF5, separated incubation of bacteria and host cells with the fraction and subsequent mixing leads to a slower interaction of the surface receptors on the cell outer membranes. It is possible that the receptor blocking is a slower process compared to the bacterial adhesion to the host cells, which can be observed already in the above treatment. This phenomenon might be due to the presence of tannin-like compounds in AQF5, that are known to interact with prolin-rich domains of proteins (Shimada 2006) and this interaction and the following denaturing effects needs probably some time. This could explain the above-described discrepancy between the two incubation protocols.

For a preliminary characterization of the active fractions, TLC and LC-MS investigations were performed (Figure S8 and S9). TLC of EAF2 and EAF5 indicated the presence of monomeric flavan-3-ols (catechin/epicatechin), dimeric PAC ( $R_f$  similar to procyanidin B2) and trimeric PAC ( $R_f$  similar to procyanidin C1). To obtain a closer insight into the PAC distribution of the extracts, an UHPLC analysis was performed with fluorescence detection on diol stationary phase. These methods exert specificity for the separation and detection of oligomeric PAC according to the respective degree of polymerization (DP) (Symma et al. 2020).

Two standards were chromatographed as reference solutions. The first standard contained a mixture of catechin (**1**) (representing a monomeric flavan-3-ol), procyanidin B2 (**2**) (representing a PAC with DP2), and procyanidin C1 (**3**) (representing PACs with DP3) (Figure S10a). A second standard solution contained a homologues series of defined DP clusters of procyanidins with DP 5 to 11 and higher DP polymers, isolated and characterized from *Tilia* species (Symma et al. 2020) (Figure S10b). This standard was used to eliminate the possibility of having in the aqueous fractions (AQF2 and AQF5) oligomers or even polymers, initially indicated in the TLC. EAF2 and EAF5 showed very similar elution profiles (Figure S10c and S10e), with flavan-3-ols, dimeric PAC and little amounts of a trimeric PAC. Even with the similarity of the fractions profile, the activity of this fractions is different, and it could be because of compounds concentration. In addition, AQF2 and AQF5 had similarity (Figure S10d and S10f), indicating the

presence of low oligomeric PAC. From the elution characteristics it was deduced that different hydroxylated flavan-3-ols formed the respective oligomers, *e.g.*, (*epi*)catechin and (*epi*)gallocatechin.



For further evaluation of these findings, +ESI-LC/MS analyses of AQF2 and AQF5 were performed (Figure S9) and gave insight in the composition of both fractions (Tables S1 and S2). For AQF2, 17 compounds making 68% of the total peak area were tentatively identified or characterized. For AQF5, 19 compounds making 73% of the total peak area were tentatively identified or characterized. The profiles of the two samples were very similar with a Jaccard coefficient of 0.61 and a similarity index of 0.92.

Glycosides of kaempferol, quercetin, and a methylated quercetin were tentatively identified based on UV spectra, accurate masses, and isotope patterns; fragmentation patterns allowed characterizing the sugar chains but gave no further information on the respective aglycone. Triglycosides of quercetin and kaempferol were the main constituents of AQF2 and AQF5. Their tetraglycosides and a triglycoside of a methylated quercetin appeared in smaller amounts. All triglycoside chains consisted of one hexose and two distal desoxyhexoses, the tetraglycoside chains of two hexoses followed by two distal hexoses.

As expected from the previous TLC- and HPLC analyses and in accordance to previous reports (Souza et al. 2008; Pessuto et al. 2009), (*epi*)catechin was found besides smaller amounts of di- and trimeric PAC. Protonated dimeric PAC were found at  $m/z$  563, 579, and 595, which indicates the presence of afzelechin, catechin, gallocatechin, or their respective epimers. This finding is mostly based on the accurate masses and isotope patterns. A daughter ion of  $m/z$  563 at  $m/z$  273 is a diagnostically important product of the quinone methide cleavage and suggests that  $m/z$  563 is a propelargonidin. Other MS<sup>2</sup> data of PAC dimers were sketchy and did not allow an in-depth analysis. The signal of a protonated molecule at  $m/z$  867 was tentatively identified as PAC trimer; its sketchy MS<sup>2</sup> data give no indication for building blocks other than (*epi*)catechin.

Further on, the peak of a sodiated molecule at  $m/z$  429 with apparent MS<sup>1</sup> fragment ions at  $m/z$  173, 191, 209, 227, and 389 fits ilicifolinoside C. Two more compounds resembled its structure in being hexosides of a C<sub>13</sub> skeleton, suggesting the presence of additional ionone glycosides. Based on the data obtained by the presented investigations hydroethanolic and hydroacetic extracts from the leaves of *M. ilicifolia*, characterised by the presence of oligomeric PAC, exert strong anti-adhesive activity against *H. pylori*. It is known that some polyphenols as (-)-epicatechin, kaempferol, gallic acid and catechin can inhibit *H. pylori* growth, but the mechanism is not clear (Escandón et al. 2016).

While the extract does not influence the bacterial proliferation, interaction between the pathogen and the host cells are influenced, leading to a strongly decreased bacterial adhesion and therefore infection of the host cell. It is hypothesised that the tannin-like PAC from *M. ilicifolia* might be responsible for the interaction and inhibition of outer membrane proteins of *H. pylori*, responsible for the recognition and attachment to the stomach cells, similar as it has been shown for tannin-enriched extracts from *Perlargonium* (Wittschier et al. 2007a; Wittschier et al. 2007b). Due to the better activity of AQP5 when in contact with cells, we can suggest the use of *M. ilicifolia* as a prophylactic measure of *H. pylori* infection, due to its action on mucosal cells and preventing the adhesion of the bacteria to the cells.

### **Funding**

Financial support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq Grant #401490/2014-9).

### **Authors Contribution**

MNP, RGI and FPS prepared the extracts, MNP and MG performed experiments for *H. pylori* testing, JS, NS, and MNP performed analytical investigation, MNP wrote the first draft of MS, AH mentored the work on analytics and *H. pylori* testing at University of Münster, Germany, AH revised the MS, JCPM mentored the study.

### Acknowledgements

The authors thank to and also scholarship from Split Fellowship Program conceded to MNP to support her stay as visiting Ph.D. student in Münster, Germany (Grant #200174/2018-5).

### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

- Chierrito D, Villas-Boas CB, Tonin FS, Fernandez-Llimos F, Sanches ACC, Mello JCP (2019) Using cell cultures for the investigation of treatments for attention deficit hyperactivity disorder: A systematic review. *Curr Neuropharmacol* 17:916-925. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190409143155>
- Curado MP, de Oliveira MM, de Araújo Fagundes M (2019) Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Latin America and the Caribbean populations: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 60:141-148. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.04.003>
- Escandón RA, Del Campo M, López-Solis R, Obrequé-Slier E, Toledo H (2016). Antibacterial effect of kaempferol and (-)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. *Eur Food Res Technol* 242:1495-1502. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2650-z>
- Ghasemian A, Fattahi A, Shokouhi Mostafavi SK, Almarzoqi AH, Memariani M, Ben Braiek O, Yassine HM, Mostafavi NSS, Ahmed MM, Mirforoghi SA (2019) Herbal medicine as an auspicious therapeutic approach for the eradication of *Helicobacter pylori* infection: A concise review. *J Cell Physiol* 234:16847-16860. <https://doi.org/10.1002/jcp.28363>
- Gottesmann M, Goycoolea FM, Steinbacher T, Menogni T, Hensel A (2020a) Smart drug delivery against *Helicobacter pylori*: pectin-coated, mucoadhesive liposomes with anti-adhesive activity and antibiotic cargo. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:5943-5957. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10647-3>
- Gottesmann M, Paraskevopoulou V, Mohammed A, Falcone FH, Hensel A (2020b) BabA and LPS inhibitors against *Helicobacter pylori*: pectins and pectin-like rhamnogalacturonans as adhesion blockers. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:351-363. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10234-1>
- Lu MC, Chiu HF, Lin CP, Shen YC, Venkatakrisnan K, Wang CK (2018) Anti-*Helicobacter pylori* effect of various extracts of *Ixeris chinensis* on inflammatory markers in human gastric epithelial AGS cells. *J Herb Med* 11:60-70. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.08.002>

- Malfertheiner P, Megraud F, O'morain C, Gisbert J, Kuipers E, Axon A, Bazzoli F, Gasbarrini A, Atherton J, Graham DY (2017) Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut* 66:6-30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- Mossi A, Mazutti M, Paroul N, Corazza M, Dariva C, Cansian R, Oliveira J (2009) Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. *Ex Reiss. Braz J Biol* 69:339-345. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000200015>
- Ngnameko CR, Njyou FN, Fowora M, Neng FBS, Fewou PM, Smith SI (2019) Inhibitory effect of medicinal plants from Cameroon on the growth and adhesion of *Helicobacter pylori*. *Eur J Integr Med* 30:100957. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2019.100957>
- Ohsaki A, Imai Y, Naruse M, Ayabe S, Komiyama K, Takashima J (2004) Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. *J Nat Prod* 67:469-471. <https://doi.org/10.1021/np030379d>
- Pessuto MB, Costa IC, Souza AB, Nicoli FM, Petereit F, Luftmann H, Mello JCP (2009) Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. *ex Reiss. Quim Nova* 32:412-416. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200027>
- Peña-González MC, Muñoz-Cázares N, Peña-Rodríguez LM (2020) Natural inhibitors of quorum-sensing factors: a novel strategy to control pathogenic bacteria. *Rev Bras Farmacogn* 30:743–755. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00112-7>
- Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E (2018) Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. *Gastroenterol* 155:1372-1382.e17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>.
- Shimada T (2006) Salivary proteins as a defense against dietary tannins. *J Chem Ecol* 32:1149-1163. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9077-0>
- Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP (2018) Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 10:239. <https://doi.org/10.2147/cmar.s149619>
- Smith SM, O'Morain C, McNamara D (2019) *Helicobacter pylori* resistance to current therapies. *Curr Opin Gastroenterol* 35:6-13. <https://doi.org/10.1097/mog.0000000000000497>
- Souza-Formigoni MLO, Oliveira MGM, Monteiro MG, da Silveira-Filho NG, Braz S, Carlini E (1991) Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *J Ethnopharmacol* 34:21-27. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90185-g](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90185-g)
- Symma N, Sendker J, Petereit F, Hensel A (2020) Multistep analysis of Diol-LC-ESI-HRMS data reveals proanthocyanidin composition of complex plant extracts (PAComics). *J Agric Food Chem* 68:8040-8049. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02826>

- Tabach R, Duarte-Almeida JM, Carlini E (2017) Pharmacological and toxicological study of *Maytenus ilicifolia* leaf extract Part II—clinical study (phase I). *Phytother Res* 31:921-926. <https://doi.org/10.1002/ptr.5816>
- Vieitez I, Maceiras L, Jachmanián I, Alborés S (2018) Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *J Supercrit Fluids* 133:58-64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>
- Wittschier N, Faller G, Hensel A (2007a) An extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) inhibits in situ adhesion of *Helicobacter pylori* to human stomach. *Phytomedicine* 14:285-288. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.12.008>
- Wittschier N, Lengsfeld C, Vortheims S, Stratmann U, Ernst J, Verspohl E, Hensel A (2007b) Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *J Pharm Pharmacol* 59:777-786. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.6.0004>
- Wonfor R, Natoli M, Parveen I, Beckman M, Nash R, Nash D (2017) Anti-inflammatory properties of an extract of *M. ilicifolia* in the human intestinal epithelial Caco-2 cell line. *J Ethnopharmacol* 209:283-287. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.006>
- Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller W, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, Derakhshan M (2018) Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 47:868-876. <https://doi.org/10.1111/apt.14561>



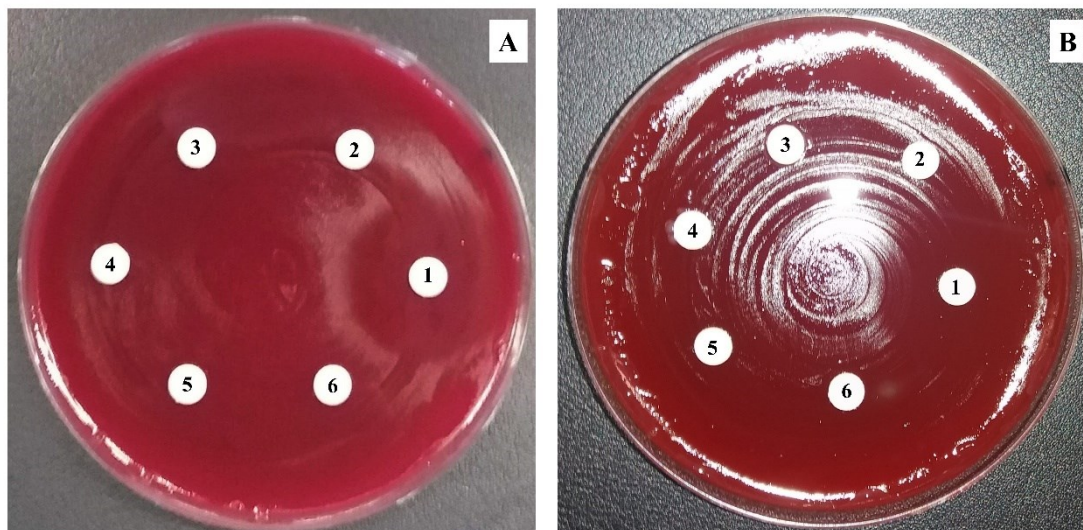
**Supplementary Information*****Anti-Adhesive Activity of *Maytenus ilicifolia* Against *Helicobacter pylori****

Mariana Nascimento de Paula<sup>1,2</sup>, Maren Kelm<sup>2</sup>, Nico Symma<sup>2</sup>, Raquel Garcia Isolani<sup>1</sup>, Fernanda Pilatti da Silva<sup>1</sup>, Jandirk Sendker<sup>2</sup>, Andreas Hensel<sup>2</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>1</sup>

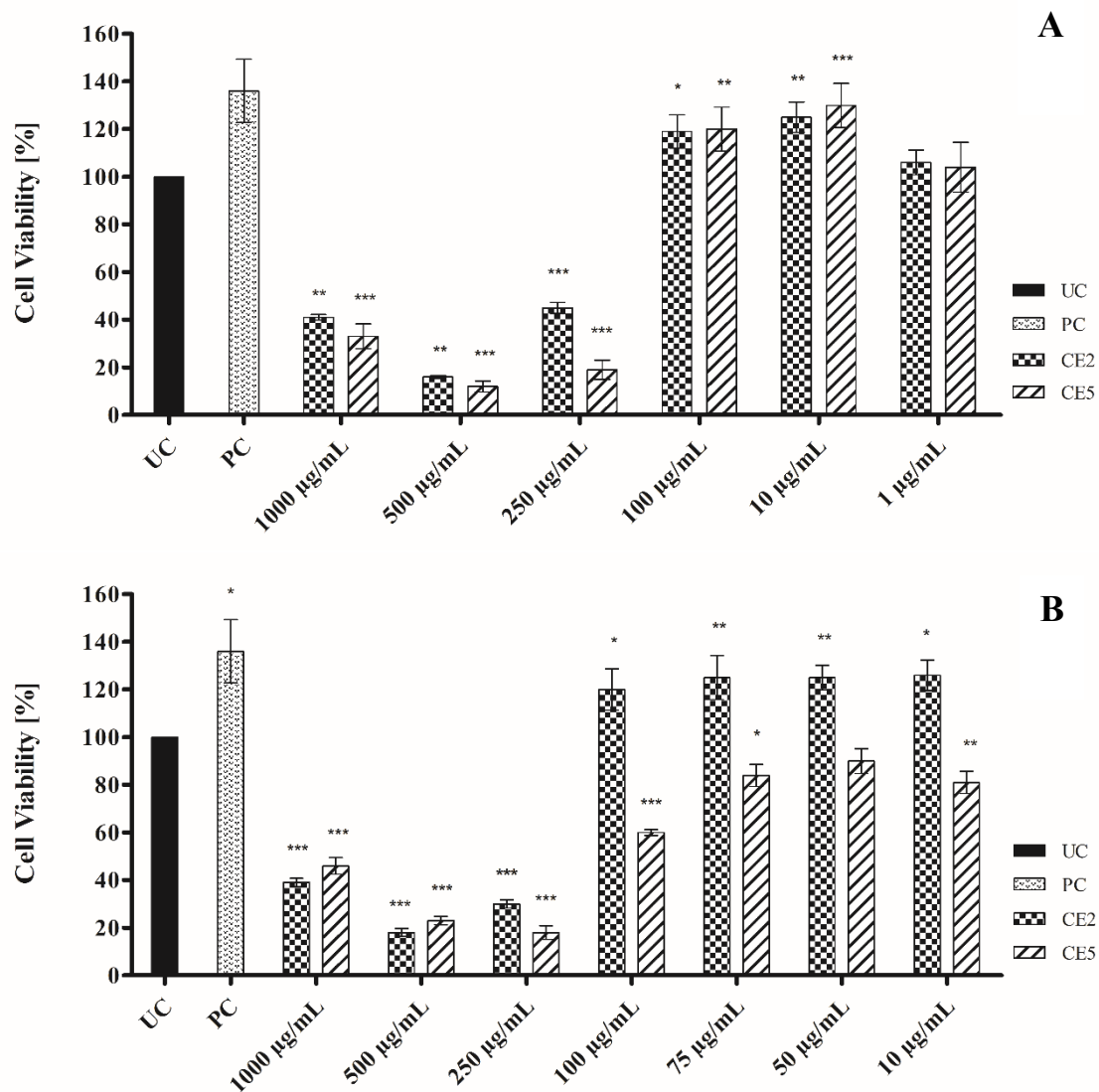
<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

<sup>2</sup>Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Corrensstraße 48, D-48149, Münster, Germany

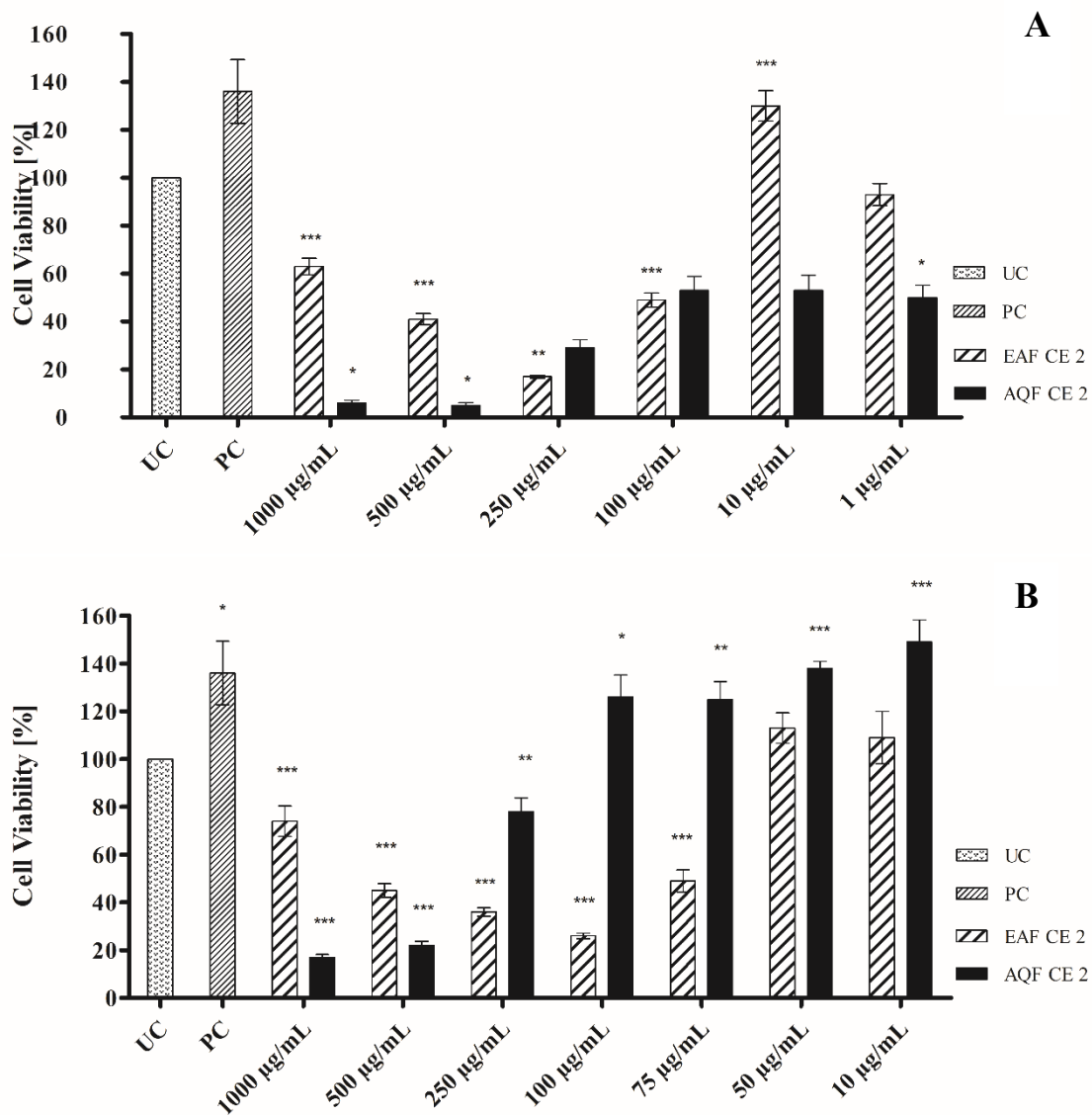
**Corresponding author:** João Carlos Palazzo de Mello, mello@uem.br



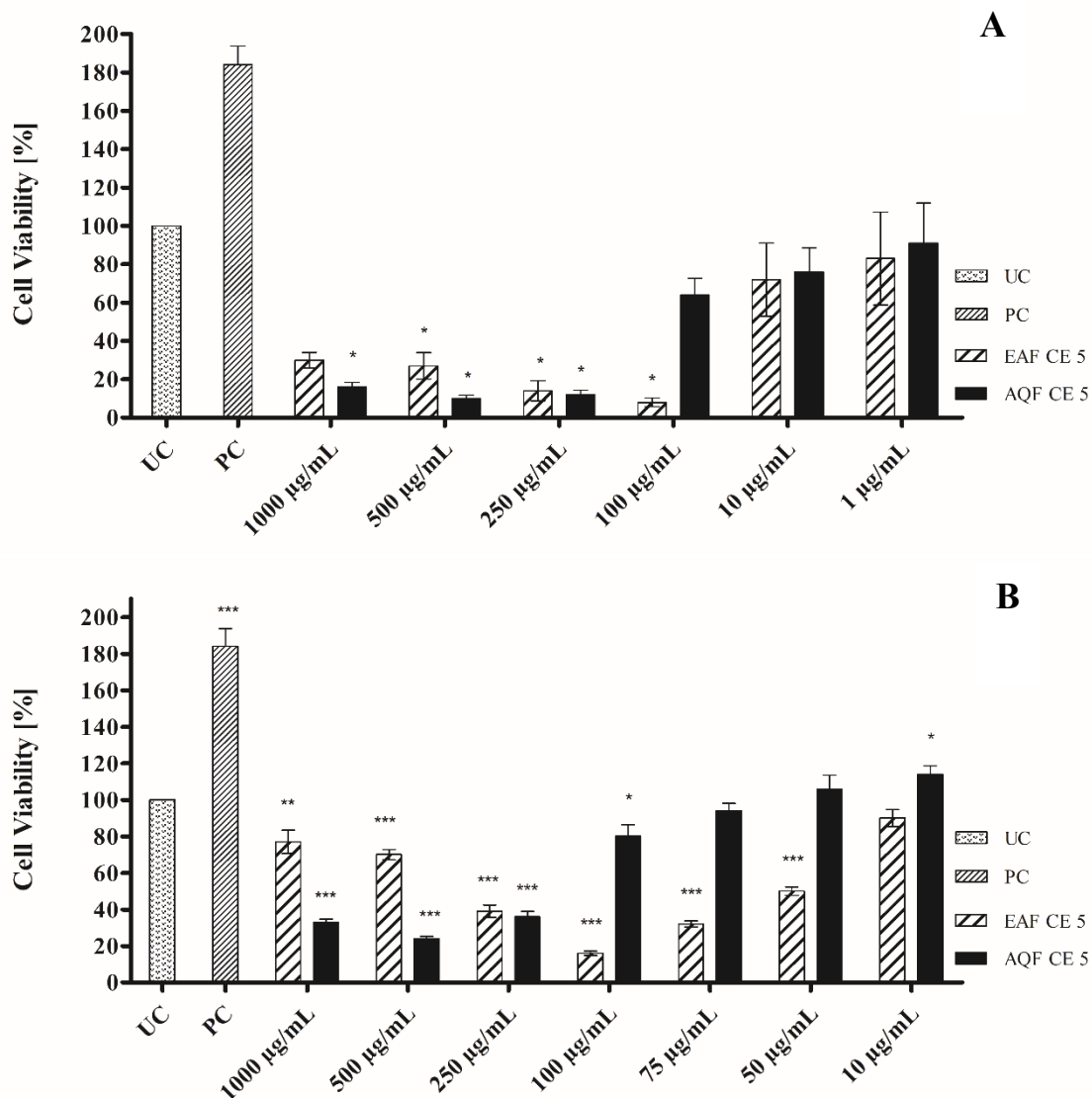
**Figure S1:** Agar diffusion test of crude extracts and fractions from *Maytenus ilicifolia* against *H. pylori* J99. **A**= CE2 (Crude extract ethanol:water; 1:1, v/v); **B**= CE5 (Crude extract acetone:water; 7:3, v/v); **1**: Positive control, amoxicillin, 2.5 µg/ml; **2**: Negative control, PBS; **3**: Sample solution 2000 µg/ml; **4**: Sample solution 1500 µg/ml; **5**: Sample solution 1000 µg/ml; **6**: Sample solution 500 µg/ml.



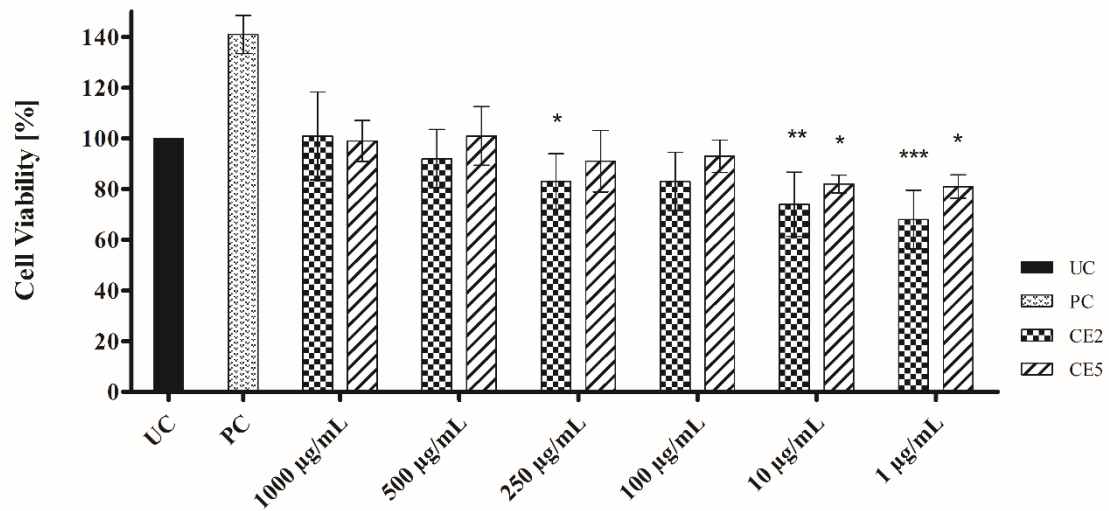
**Figure S2** Influence of CE2 and CE5 from the leaves of *M. ilicifolia* on the cell viability of AGS cells, as determined by MTT assay after 24 h and 48 h of incubation (A and B, respectively). UC: untreated control; PC: positive control, AGS medium, supplemented with FCS 10 %. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments with  $n = 6$  technical replicates each. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , compared to the untreated control.



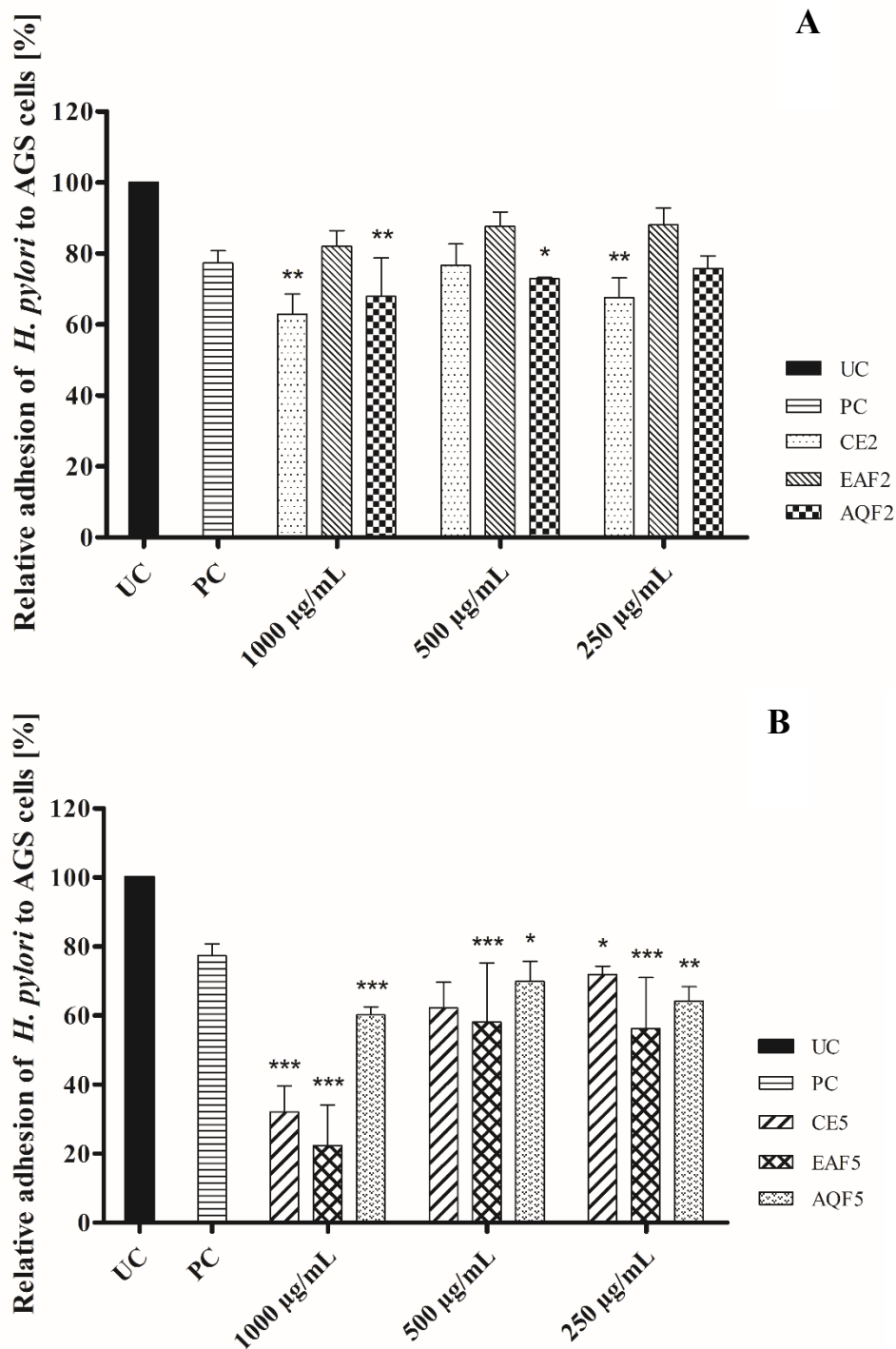
**Figure S3** Influence of EAF2 and AQF 2 from the leaves of *M. ilicifolia* on the cell viability of AGS cells, as determined by MTT assay after 24 h and 48 h of incubation (A and B, respectively). UC: untreated control; PC: positive control, AGS medium, supplemented with FCS 10 %. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments with  $n = 6$  technical replicates each. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , compared to the untreated control.



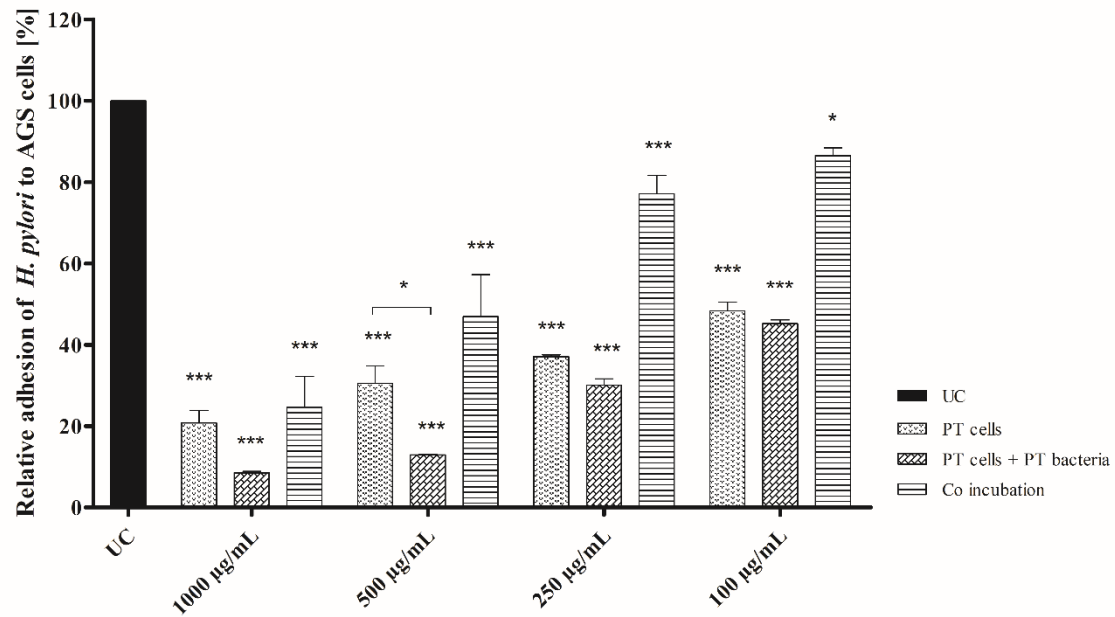
**Figure S4** Influence of EAF5 and AQF5 from the leaves of *M. ilicifolia* on the cell viability of AGS cells, as determined by MTT assay after 24 h and 48 h of incubation (A and B, respectively). UC: untreated control; PC: positive control, AGS medium, supplemented with FCS 10 %. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments with  $n = 6$  technical replicates each. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , compared to the untreated control.



**Figure S5** Influence of CE2 and CE5 from the leaves of *M. ilicifolia* on the cell viability of AGS cells, as determined by MTT assay after 2 h of incubation. UC: untreated control; PC: positive control, AGS medium, supplemented with FCS 10 %. Values are mean  $\pm$  SD from three independent experiments with  $n = 6$  technical replicates each. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ , compared to the untreated control.

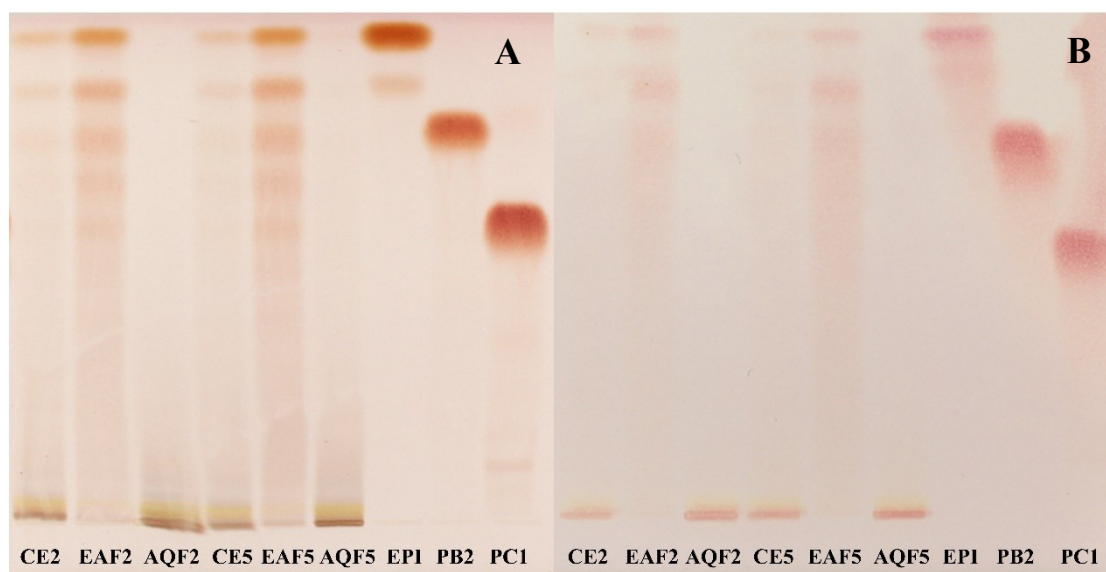


**Figure S6** Relative adhesion (% , related to the untreated control, UC) of FITC-labelled *H. pylori* J99 to AGS cells. A: bacteria, pre-treated with extract CE2 and subfractions EAF2 and AQF2; B: bacteria, pre-treated with extract CE5 and subfractions EAF5 and AQF5 in concentrations from 1000 to 250 µg/ml. Positive control (PC): Okra fresh extract, 1000 µg/ml. Values are mean ± SD from three independent experiments with two technical replicates each. \*\*\*: p < 0.001, \*\*: p < 0.01, \*: p < 0.05, compared to the untreated control.

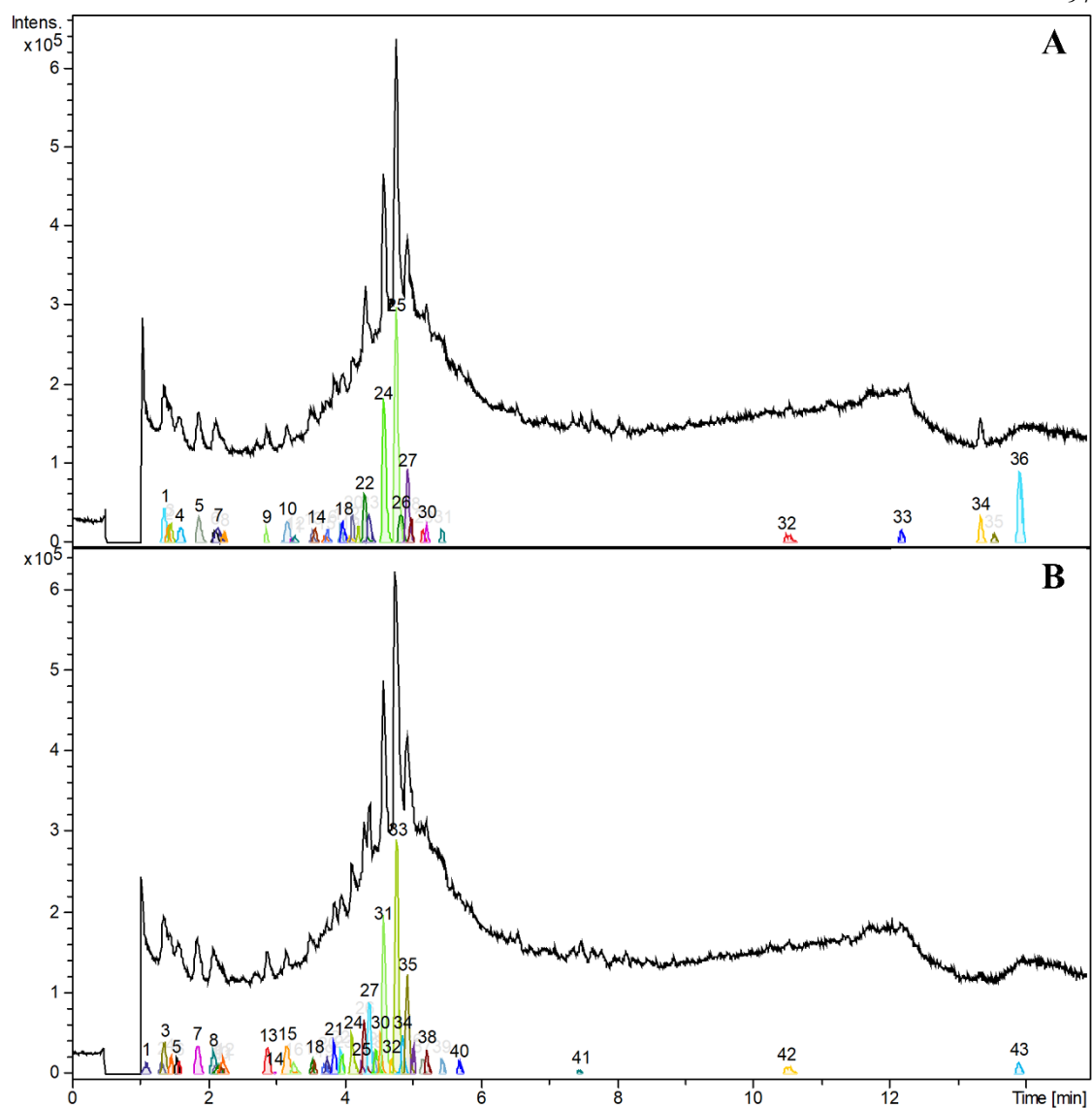


**Figure S7** Influence of AQP5 on the relative adhesion (% related to the untreated control UC) of FITC-labelled *H. pylori* J99 to AGS cells by different treatment protocols: PT cells: pre-treatment of AGS cells; PT AGS cells + PT bacteria: pre-treatment of AGS cells, and separately pre-treatment of bacteria, followed by combining both suspensions; Co-incubation: cells, bacteria, test solution are incubated together at the same time. Values are mean  $\pm$  SD, from three independent experiments with 2 technical replicates each. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*:  $p < 0.05$ , compared to the untreated control.

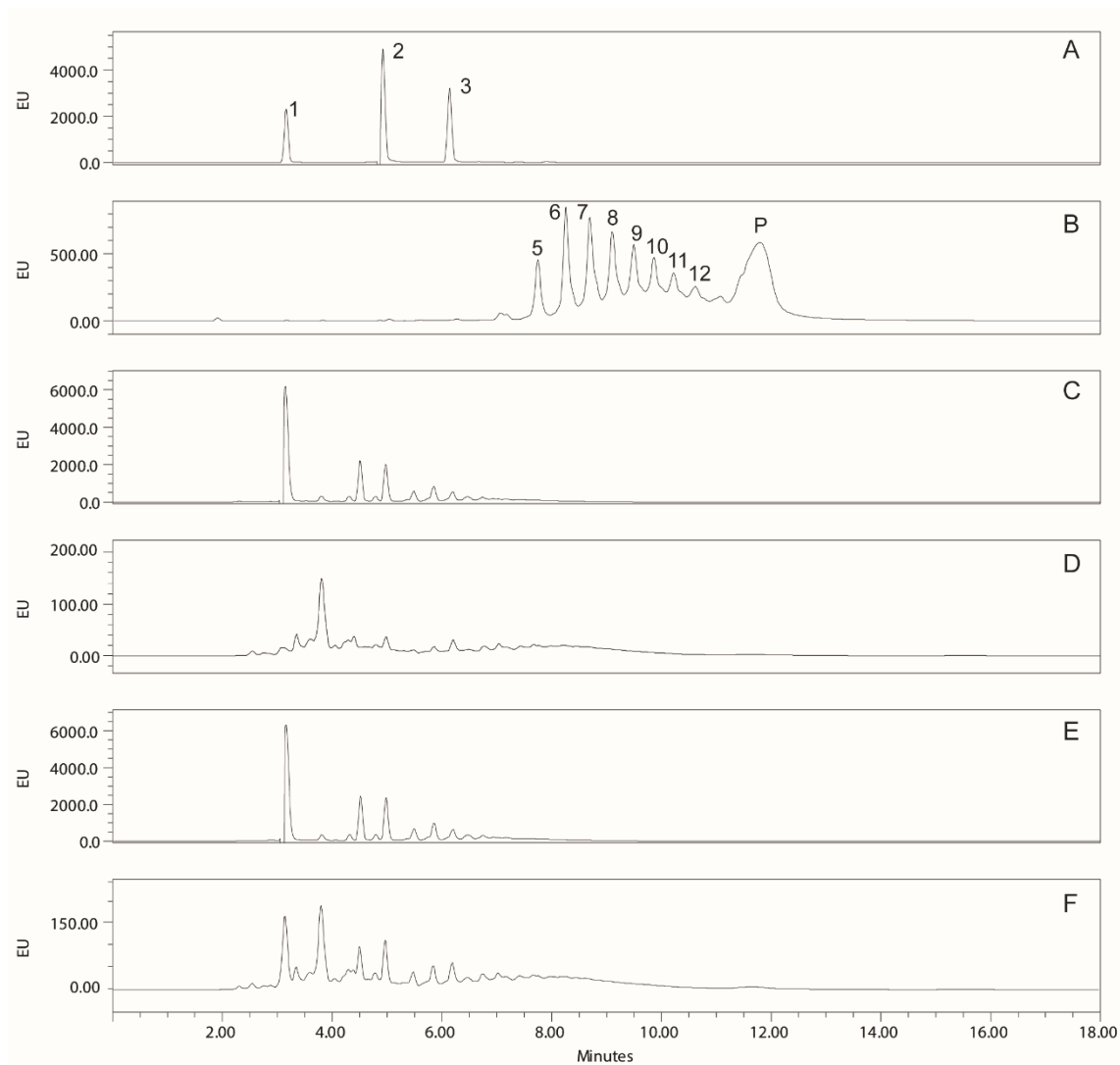




**Figure S8:** Thin-layer chromatography of the different extracts and fractions obtained from *Maytenus ilicifolia*. Chromatographic conditions: stationary phase: silica gel 60 F254; mobile phase: ethyl acetate:formic acid:water (90:5:5; v/v); detection **A**: anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; **B**: Vanillin-HCl.



**Figure S9:** Total ion chromatogram (TIC) of **A:** AQF2 and **B:** AQF5 and elution profile of dissected compounds.



**Figure S10:** UHPLC-FD chromatograms ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$ ) of *M. ilicifolia* extracts and fractions on diol stationary phase. **A:** Procyanidin standard I (catechin **1** + procyanidin B2 **2** + procyanidin C1 **3**); **B:** Procyanidin standard II (DP 5 to 12 (numbers indicate the respective DP) + polymer hump P); **C:** EAF2 (Ethyl-acetate fraction - crude extract ethanol:water; 1:1, v/v). **D:** AQF2 (Aqueous fraction - crude extract ethanol:water; 1:1, v/v); **E:** EAF5 (Ethyl acetate fraction - crude extract acetone:water; 7:3, v/v); **F:** AQF5 (Aqueous fraction - crude extract acetone:water; 7:3, v/v).

**Table S1:** LC-qTOF-MS peak characteristics as obtained by detect Dissect chromatogram (Supplementary Figure S3A) of *Maytenus ilicifolia* extract AQF2. Peaks were assigned to known constituents of the genus *Maytenus* as denominated in the references. Assignment of stereoisomers is based on published data. Assignments without references are based on the *de novo* interpretation of MS, MS<sup>2</sup> and UV-spectra. Hex: hexose, dhex: deoxyhexose.

Peak No	tr/min	<i>m/z</i>	fragment <i>m/z</i>	Ion formula <sup>a</sup>	Tentative compound identity <sup>b</sup>	References
3	1.45	166.0877	120.0817	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	phenylalanine	Interpretation
4	1.59	355.1010	171.0664	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	hexoside of C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Interpretation
5	1.86	369.1180	167.0626	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	hexoside of C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	Interpretation
6	2.1	429.2128	173.1331, 191.1445, 209.1556, 227.1621, 389.2173	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	ilicifolinoside C	(Zhu et al., 1998)
8	2.23	383.0977	199.0624	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	hexoside of C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Interpretation
9	2.86	205.0987	188.0721	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tryptophane	Interpretation
12	3.27	579.1544	289.0725, 427.1127	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	dimeric procyanidine of (epi)catechin, B-type	(Pessuto et al., 2009; Souza et al., 2008)
13	3.53	919.2738	129.0550, 303.0543, 465.1066, 611.1461, 627.1427, 773.2145	C <sub>39</sub> H <sub>51</sub> O <sub>25</sub>	quercetin tetrasaccharide (-hex-hex-dhex-dhex)	(Fonseca et al., 2007; Sannomiya et al., 1998; Vilegas et al., 1999)
15	3.72	595.1447	127.0399, 273.0759, 431.1538	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	dimeric proanthocyanidine of (epi)catechin and (epi)gallocatechin, B-type	(Pessuto et al., 2009; Souza et al., 2008)
16	3.75	903.2756	287.0601, 449.1223, 611.1612, 757.2170	C <sub>39</sub> H <sub>51</sub> O <sub>24</sub>	kaempferol tetrasaccharide (-hex-hex-dhex-dhex)	(Fonseca et al., 2007)

17	3.95	401.1792	153.1247, 217.1455	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	hexoside of C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Interpretation
20	4.12	579.1529	127.0380, 139.0366, 163.0414, 287.0543, 409.0817	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	dimeric procyanidine of (epi)catechin, B-type	(Pessuto et al., 2009; Souza et al., 2008)
22	4.29	389.2162	107.0857, 121.0993, 133.1004, 151.1131, 173.1295, 191.1407, 209.1610, 227.1648	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>8</sub>	hexoside of C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>	Interpretation
23	4.36	291.0857	123.0440, 139.0388	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	(epi)catechin	(mzCloud, 2021)
24	4.58	757.2172	303.0495, 449.1052, 465.1009, 611.1601	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>20</sub>	quercetin trisaccharide (-hex-dhex-dhex)	(Leite et al., 2010; Leite et al., 2001)
25	4.76	741.2239	287.0546, 465.1044, 595.1657	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>19</sub>	kaempferol trisaccharide (-hex-dhex-dhex)	(Leite et al., 2010; Leite et al., 2001)
26	4.83	771.2339	317.0678, 479.1161, 625.1794	C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> O <sub>20</sub>	methylated flavonol trisaccharide (-hex-dhex-dhex)	Interpretation
27	4.94	389.2157	227.1647, 151.1111, 123.0763, 91.0536	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>8</sub>	hexoside of C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>	Interpretation

**Table S2:** LC-qTOF-MS peak characteristics as obtained by detect Dissect chromatogram (Supplementary Figure S3B) of *Maytenus ilicifolia* extract AQF5. Peaks were assigned to known constituents of the genus *Maytenus* as denominated in the references. Assignment of stereoisomers is based on published data Assignments without references are based on the *de novo* interpretation of MS, MS<sup>2</sup> and UV-spectra. Hex: hexose, dhex: deoxyhexose.

Peak No	tr/min	m/z	fragment m/z	Ion formula <sup>a</sup>	Tentative compound identity <sup>b</sup>	References
4	1.45	166.0857	120.0801	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	phenylalanine	Interpretation
7	1.84	369.1149	167.0697, 243.1575	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	hexoside of C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	Interpretation
8	2.08	429.2061	191.1415, 209.1523, 276.2054, 389.2126	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	ilicifolinoside C	(Zhu et al., 1998)
12	2.24	383.0935	155.0689, 287.0757	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	hexoside of C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Interpretation
13	2.87	205.0960	188.0695	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tryptophane	Interpretation
16	3.26	579.1480	1270364, 139.0381, 163, 287.0497, 409.0844, 427.1026	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	dimeric procyanidine of (epi)catechin, B-type	(Pessuto et al., 2009; Souza et al., 2008)
17	3.53	919.2663	303.0464, 465.1030, 627.1580	C <sub>39</sub> H <sub>51</sub> O <sub>25</sub>	quercetin tetrasaccharide (-hex-hex-dhex-dhex)	(Fonseca et al., 2007; Sannomiya et al., 1998; Vilegas et al., 1999)
19	3.70	595.1442	145.0479, 273.0783, 431.1485	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub>	dimeric proanthocyanidine of (epi)catechin and (epi)gallocatechin, B-type	(Pessuto et al., 2009; Souza et al., 2008)
20	3.74	903.2708	287.0527, 449.1069, 757.2126	C <sub>39</sub> H <sub>51</sub> O <sub>24</sub>	kaempferol tetrasaccharide (-hex-hex-dhex-dhex)	(Fonseca et al., 2007)
22	3.94	401.1754	153.1234, 217.1422	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	hexoside of C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Interpretation
24	4.11	579.1471	127.0370, 139.0368, 163.0360, 287.0518, 409.0945	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub>	dimeric procyanidine of (epi)catechin, B-type	(Pessuto et al., 2009; Souza et al., 2008)

26	4.29	389.2153	107.0863, 121.0967, 133.1001, 149.1247, 163.1473, 173.1321, 191.1453, 209.1523, 227.1630	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>8</sub>	hexoside of C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>	Interpretation
27	4.37	291.0842	119.0467, 123.0431, 139.0367, 147.0426, 161.0591	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>	(epi)catechin	(mzCloud, 2021)
29	4.47	867.2087	127.0357, 163.0365, 247.0592, 291.0833, 301.0725, 409.0942, 421.0792, 427.0880, 437.0965	C <sub>45</sub> H <sub>39</sub> O <sub>18</sub>	trimeric proanthocyanidine, B- type	Interpretation
30	4.53	563.1529	107.0477, 119.0473, 123.0423, 139.0387, 147.0417, 151.0331, 167.0309, 179.0345. 231.0623, 275.0558, 287.0526, 393.0873, 409.0826	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>11</sub>	dimeric propelargonidin of (epi)afzelechin and (epi)catechin	Interpretation
31	4.58	757.2134	129.0531, 303.0478, 465.1007, 611.1577	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>20</sub>	quercetin trisaccharide (-hex-dhex-dhex)	(Leite et al., 2001; Leite et al., 2010)
33	4.77	741.2195	287.0532, 449.1044, 595.1615	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>19</sub>	kaempferol trisaccharide (-hex-dhex-dhex)	(Leite et al., 2001; Leite et al., 2010)
34	4.85	771.2315	317.0647, 427.1849, 625.1742	C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> O <sub>20</sub>	methylated flavonol trisaccharide (-hex-dhex-dhex)	Interpretation
35	4.92	389.2153	227.1626	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>8</sub>	hexoside of C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>	Interpretation

## References

- Fonseca APND, Silva GDF, Carvalho JJ, Salazar GDCM, Duarte LP, Silva RP, Jorge RM, Tagliati CA, Zani CL, Alves TMA (2007) Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Quim Nova* 30(4):842-847. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400016>.
- Leite JPV, Braga FC, Romussi G, Persoli RM, Tabach R, Carlini EA, Oliveira AB (2010) Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. *J Braz Chem Soc* 21(2):248-254. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532010000200009>.
- Leite JPV, Rastrelli L, Romussi G, Oliveira AB, Vilegas JH, Vilegas W, Pizza C (2001) Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J Agric Food Chem* 49(8):3796-3801. <https://doi.org/10.1021/jf010294n>.
- mzCloud, Advanced Mass Spectral Database - 2013-2021. Epicatechin - mzCloud Advanced Mass Spectral Database. <https://www.mzcloud.org/DataViewer#Creference23#T53#c#10587>. (accessed 13 March 2021).
- Pessuto MB, Costa IC, Souza AB, Nicoli FM, Petereit F, Luftmann H, Mello JCP (2009) Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Quim Nova* 32:412-416. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200027>.
- Sannomiya M, Vilegas W, Rastrelli L, Pizza C (1998) A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry* 49(1):237-239. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00842-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00842-X).
- Souza LM, Cipriani TR, Iacomini M, Gorin PA, Sasaki GL (2008) HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J Pharm Biom Anal* 47(1):59-67. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.008>.
- Vilegas W, Sanommiya M, Rastrelli L, Pizza C (1999) Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *J Agric Food Chem* 47(2):403-406. <https://doi.org/10.1021/jf980114i>.
- Zhu N, Sharapin N, Zhang J (1998) Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry* 47(2):265-268. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00562-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00562-1).



## 5 Conclusão

Os extratos de *M. ilicifolia* não influenciaram a proliferação de *H. pylori in vitro*, porém influenciaram na interação entre a bactéria e as células humanas, resultando em uma diminuição considerável da adesão bacteriana, com conseqüente diminuição da infecção celular.

É possível que os compostos responsáveis pela interação e inibição das proteínas de membrana externa da bactéria sejam as proantocianidinas, por elas reconhecerem e se ligarem às células do estômago.

Levando em consideração que a fração de *M. ilicifolia* de melhor atividade foi a fração aquosa 5 (AQF5), podemos sugerir estudos mais profundos demonstrando a ação desses extratos na bactéria, indicando as proteínas alvo desses extratos., considerando sua ação sobre as células da mucosa impossibilitando a ligação da bactéria, permitindo a indicação do uso desse planta como medida profilática contra a infecção bacteriana.

**Referências\***

- Ahmed, M., Fong, H., Soejarto, D., Dobberstein, R., Waller, D., Moreno-Azorero, R., 1981. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography A* 213, 340-344.
- American Journal of Managed Care, 2021. *Helicobacter pylori* Diagnosis and Treatment Guidelines. Supplements and Featured Publications, 6-10.
- Alvarenga, N., Canela, N., Gómez, R., Yaluff, G., Maldonado, M., 2008. Leishmanicidal activity of *Maytenus ilicifolia* roots. *Fitoterapia* 79, 381-383.
- Amaral, F.M.d., Braga, J.M.A., Guimarães, L.D., Valverde, A.L., Anholeti, M.C., de Paiva, S.R., Joffily, A., 2022. Chemical constituents and antioxidant activity of leaves and stems extracts of *Monteverdia communis* (Celastraceae). *Biointerface Research in Applied Chemistry* 12, 2340-2352.
- Amieva, M.R., El-Omar, E.M., 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134, 306-323.
- Araújo Júnior, R.F.d., Oliveira, A.L.C.d.S.L., Pessoa, J.B., Garcia, V.B., Guerra, G.C.B., Soares, L.A.L., de Souza, T.P., Petrovick, P.R., de Araújo, A.A., 2013. *Maytenus ilicifolia* dry extract protects normal cells, induces apoptosis and regulates Bcl-2 in human cancer cells. *Experimental Biology and Medicine* 238, 1251-1258.
- Atanasov, A.G., Zotchev, S.B., Dirsch, V.M., Supuran, C.T., 2021. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug discovery* 20, 200-216.
- Athaydes, B.R., Tosta, C., Carminati, R.Z., Kuster, R.M., Kitagawa, R.R., Gonçalves, R.d.C.R., 2022. Avocado (*Persea americana* Mill.) seeds compounds affect *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma cells growth. *Journal of Functional Foods* 99, 105352.
- Awaad, A.S., Al-Rifai, A.A., El-Meligy, R.M., Alafeefy, A.M., Zain, M.E.J.P.R., 2015. New activities for isolated compounds from *Convolvulus austro-aegyptiacus* as anti-ulcerogenic, anti-*Helicobacter pylori* and their mimic synthesis using bio-guided fractionation. *Phytotherapy Research* 29, 1311-1316.
- Aware, C.B., Patil, D.N., Suryawanshi, S.S., Mali, P.R., Rane, M.R., Gurav, R.G., Jadhav, J.P., 2022. Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. *South African Journal of Botany* 151, 512-528.
- Axon, A., 2014. *Helicobacter pylori* and public health. *Helicobacter* 19, 68-73.
- Ayoub, I.M., Abdel-Aziz, M.M., Elhady, S.S., Bagalagel, A.A., Malatani, R.T., Elkady, W.M., 2022. Valorization of *Pimenta racemosa* Essential Oils and Extracts: GC-MS and LC-MS Phytochemical Profiling and Evaluation of *Helicobacter pylori* Inhibitory Activity. *Molecules* 27, 7965.

- Ayres, M.P., Clausen, T.P., MacLean, S.F., Redman, A.M., Reichardt, P.B., 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78, 1696-1712.
- Badke, M.R., Cogo, S.B., Ilha, A.G., Heisler, E.V., Schimith, M.D., Sacramento, H.T.d., 2019. Panorama brasileiro dos serviços de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista de Enfermagem da UFSM* 9, e64.
- Baggio, C.H., Freitas, C.S., de Martini Otofujii, G., Cipriani, T.R., de Souza, L.M., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Marques, M.C.A., Mesia-Vela, S., 2007. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and formation of nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 433-440.
- Baggio, C.H., Freitas, C.S., Mayer, B., Dos Santos, A.C., Twardowschy, A., Potrich, F.B., Cipriani, T.R., de Souza, L.M., Sasaki, G.L., Iacomini, M., 2009. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 385-391.
- Baggio, C.H., Freitas, C.S., Twardowschy, A., dos Santos, A.C., Mayer, B., Potrich, F.B., Cipriani, T.R., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Marques, M.C.A., 2012. *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* 67, 405-410.
- Battestin, V., Matsuda, L.K., Macedo, G.A., 2004. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. *Alimentos e Nutrição* 15, 63-72.
- Biral, L., Lombardi, J.A., 2020. Celastraceae, Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Biral, L., Simmons, M.P., Smidt, E.C., Tembrock, L.R., Bolson, M., Archer, R.H., Lombardi, J.A., 2017. Systematics of New World *Maytenus* (Celastraceae) and a New Delimitation of the Genus. *Systematic Botany* 42, 680-693.
- Bonsor, D.A., Sundberg, E.J., 2019. Roles of adhesion to epithelial cells in gastric colonization by *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori in Human Diseases* 11, 57-75.
- Borges, A.S., Minozzo, B.R., Santos, H., Santa Ardisson, J., Rodrigues, R.P., Romão, W., de Souza Borges, W., Gonçalves, R.d.C.R., Beltrame, F.L., Kitagawa, R.R., 2020. *Plectranthus barbatus* Andrews as anti-*Helicobacter pylori* agent with activity against adenocarcinoma gastric cells. *Industrial Crops and Products* 146, 112207.
- Brasil, 2006. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências., in: Poder Executivo. Decreto Nº 5.813. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 2.
- Brasil, 2016. Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, in: Ministério da Saúde, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica (Ed.). Ministério da Saúde, Brasília, DF.

- Brasil, 2022. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais RENAME 2022, in: Ministério da Saúde, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (Ed.). Ministério da Saúde, Brasília, DF.
- Farmacopeia Brasileira, 2022. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), v.2.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- Bruni, R., Rossi, D., Muzzoli, M., Romagnoli, C., Paganetto, G., Besco, E., Choquecillo, F., Peralta, K., Lora, W.S., Sacchetti, G., 2006. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. *Fitoterapia* 77, 538-545.
- Buffa Filho, W., Corsino, J., Bolzani, V.d.S., Furlan, M., Pereira, A.M.S., França, S.C., 2002a. Quantitative determination of cytotoxic Friedo-nor-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical Biochemical Techniques* 13, 75-78.
- Buffa Filho, W., Pereira, A.M.S., França, S.d.C., Furlan, M., 2002b. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. *Eclética Química* 27, 403-416.
- Calixto, J.B., 2019. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91.
- Cansian, R., Kubiak, G., Borsatti, L., Mielniczki-Pereira, A., Roman, S., Paroul, N., Schwanz, M., Manfredini, V., Mossi, A., 2015. Antioxidant and genotoxic properties of *Maytenus dasyclada*: a comparative study in relation to *Maytenus* reference species. *Brazilian Journal of Biology* 75, 471-476.
- Carlini, E., 1988. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) e outras, Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) e outras, pp. 87-87.
- Carvalho-Okano, R.d., 1992. Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol.(CELASTRACEAE) do Brasil extra-amazônico. 1992, 253 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Castillo-Juarez, I., Gonzalez, V., Jaime-Aguilar, H., Martinez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 402-405.
- Castro, M.R., Figueiredo, F.F., 2019. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. *Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde* 15, 56.

- Chang, J.Y., Shim, K.-N., Tae, C.H., Lee, K.E., Lee, J., Lee, K.H., Moon, C.M., Kim, S.-E., Jung, H.-K., Jung, S.-A., 2017. Triple therapy versus sequential therapy for the first-line *Helicobacter pylori* eradication. *BMC Gastroenterology* 17, 16.
- Charitos, I.A., D'Agostino, D., Topi, S., Bottalico, L., 2021. 40 years of *Helicobacter pylori*: a revolution in biomedical thought. *Gastroenterology Insights* 12, 111-135.
- Chavez, H., Estevez-Braun, A., Ravelo, A.G., Gonzalez, A.G., 1999. New phenolic and quinone-methide triterpenes from *Maytenus amazonica*. *Journal of Natural Products* 62, 434-436.
- Chopra, B., Dhingra, A.K., 2021. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytotherapy Research* 35, 4660-4702.
- Chowdhury, A., Sarkar, J., Chakraborti, T., Pramanik, P.K., Chakraborti, S., 2016. Protective role of epigallocatechin-3-gallate in health and disease: A perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 78, 50-59.
- Chukwujekwu, J.C., Van Staden, J., 2016. In vitro antibacterial activity of *Combretum edwardsii*, *Combretum krausii*, and *Maytenus nemorosa* and their synergistic effects in combination with antibiotics. *Frontiers in Pharmacology* 7, 208.
- Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., de Souza, L.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marques, M.C., Gorin, P.A., Sassaki, G.L., Iacomini, M., 2006. A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* Leaves with anti-ulcer protective effects. *Journal of Natural Products* 69, 1018-1021.
- Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., de Souza, L.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marques, M.C., Gorin, P.A., Sassaki, G.L., Iacomini, M., 2008. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. *Carbohydrate Polymers* 74, 274-278.
- Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., de Souza, L.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marques, M.C.A., Gorin, P.A., Sassaki, G.L., Iacomini, M., 2009. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Carbohydrate Polymers* 78, 361-363.
- Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., Gorin, P.A., Iacomini, M., 2004. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Journal of natural products* 67, 703-706.
- Cogo, L.L., Monteiro, C.L.B., Miguel, M.D., Miguel, O.G., Cunico, M.M., Ribeiro, M.L., Camargo, E.R.d., Kussen, G.M.B., Nogueira, K.d.S., Costa, L.M.D., 2010. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 304-309.
- Coppede, J.S., Pina, E.S., Paz, T.A., Fachin, A.L., Marins, M.A., Bertoni, B.W., França, S.C., Pereira, A.M.S., 2014. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118, 33-43.

- Cordeiro, P.J., Vilegas, J.H., Lanças, F.M., 1999. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (" espinheira santa"). Journal of the Brazilian Chemical Society 10, 523-526.
- Corsino, J., da Silva Bolzani, V., Pereira, A.M.S., França, S.C., Furlan, M., 1998. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. Phytochemistry 48, 137-140.
- Costa, A.F., 1994. Farmacognosia, 5. ed. ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Costa, P.M., Ferreira, P.M.P., da Silva Bolzani, V., Furlan, M., Macedo, V.A.d.F.F., Corsino, J., de Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Pessoa, C., 2008. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. Toxicology in vitro 22, 854-863.
- Crestani, S., Rattmann, Y.D., Cipriani, T.R., de Souza, L.M., Iacomini, M., Kassuya, C.A., Marques, M.C., da Silva-Santos, J.E., 2009. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. Vascular Pharmacology 51, 57-63.
- Cunha-Laura, A.L., Auharek, S.A., Oliveira, R.J., Siqueira, J.M., Vieira, M.C., Leite, V.S., Portugal, L.C., 2014. Effects of *Maytenus ilicifolia* on reproduction and embryo-fetal development in Wistar rats. Genetics and Molecular Research 13, 3711-3720.
- Curado, M.P., de Oliveira, M.M., de Araújo Fagundes, M., 2019. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Latin America and the Caribbean populations: A systematic review and meta-analysis. Cancer Epidemiology 60, 141-148.
- Curti, V., Capelli, E., Boschi, F., Nabavi, S.F., Bongiorno, A.I., Habtemariam, S., Nabavi, S.M., Daglia, M., 2014. 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 58, 1776-1784.
- D'Andrea, G., 2015. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? Fitoterapia 106, 256-271.
- da Rocha, L.P.B., de Oliveira Alves, J.V., da Silva Aguiar, I.F., da Silva, F.H., da Silva, R.L., de Arruda, L.G., do Nascimento Filho, E.J., da Rocha Barbosa, B.V.D., de Amorim, L.C., da Silva, P.M.J.R., Society, 2021. Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. Journal of Research, Society and Development 10, e44101018282-e44101018282.
- da Silva, M.S., de Sousa, D.P., de Medeiros, V.M., Folly, M.A., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Alkaloid, flavonoids, and pentacyclic triterpenoids of *Maytenus obtusifolia* Mart. Biochemical Systematics and Ecology 36, 500-503.
- de Carvalho Meirelles, G., Bianchi, S.E., Siqueira, I.R., Bassani, V.L., 2022. Phytochemistry and Pharmaceutical Technology Studies on *Monteverdia ilicifolia* (*Maytenus ilicifolia*): a Traditionally Used Medicinal Plant. Revista Brasileira de Farmacognosia 32, 859-870.

- de Oliveira, D.M., de Fátima Silva, G.D., Duarte, L.P., Vieira Filho, S.A., 2006. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 661-665.
- Deng, Y.-T., Liang, G., Shi, Y., Li, H.-L., Zhang, J., Mao, X.-M., Fu, Q.-R., Peng, W.-X., Chen, Q.-X., Shen, D.-Y., 2016. Condensed tannins from *Ficus altissima* leaves: structural, antioxidant, and antityrosinase properties. *Process Biochemistry* 51, 1092-1099.
- Dias, K.S., Marques, M.S., Menezes, I.A., Santos, T.C., Silva, A.B., Estevam, C.S., Sant'Ana, A.E., Pizza, C., Antonioli, Â.R., Marçal, R.M., 2007. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark. *Fitoterapia* 78, 460-464.
- Dos Santos, V.A., Leite, K.M., da Costa Siqueira, M., Regasini, L.O., Martinez, I., Nogueira, C.T., Galuppo, M.K., Stolf, B.S., Pereira, A.M.S., Cicarelli, R., 2013. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules* 18, 1053-1062.
- Ecker, A., Loss, C.G., Adefegha, S.A., Boligon, A.A., Roman, S.S., 2017. Safety evaluation of supratherapeutic dose of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek extracts on fertility and neurobehavioral status of male and pregnant rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 90, 160-169.
- El-Omar, E.M., Oien, K., El-Nujumi, A., Gillen, D., Wirz, A., Dahill, S., Williams, C., Ardill, J., McColl, K., 1997. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology* 113, 15-24.
- El-Omar, E.M., Penman, I.D., Ardill, J.E., Chittajallu, R.S., Howie, C., McColl, K.E., 1995. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109, 681-691.
- Elhefni, N., Ebada, S.S., Abdel-Aziz, M.M., Marwan, E.-S.M., El-Sharkawy, S., El-Neketi, M., 2023. Promising anti-*Helicobacter pylori* and anti-inflammatory metabolites from unused parts of *Phoenix dactylifera* CV 'Zaghloul': *in vitro* and *in silico* study. *Pharmaceutical Biology* 61, 657-665.
- Elraey, M., Elgamal, A., Gaara, A.H., 2022. Quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucouronide butyl ester from *Vitis vinifera* leaves of potent anti-*Helicobacter pylori* activity and impact of its combination with clarithromycin. *Egyptian Journal of Chemistry* 65, 609-615.
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G.V., Tresoldi, I., Modesti, A., Bei, R., 2015. *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* 16, 9236-9282.
- Farhadkhani, M., Nikaeen, M., Hassanzadeh, A., Nikmanesh, B., 2019. Potential transmission sources of *Helicobacter pylori* infection: detection of *H. pylori* in various environmental samples. *Journal of Environmental Health Science Engineering* 17, 129-134.

- Feng, L., Wen, M.-Y., Zhu, Y.-J., Men, R.-T., Yang, L., 2016. Sequential therapy or standard triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: an updated systematic review. *American Journal of Therapeutics* 23, e880-e893.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136, E359-E386.
- Fernández de la Torre, A., Nogueiras Lima, C., Romeu Carballo, C., Roberto Palacios, J., Naranjo Chamizo, E., Marbot Ramada, R., Urquiola Cruz, A., 2010. Estudio fitoquímico preliminar y actividad fungicida de corteza de *Maytenus urquiolae* Mory (Celastraceae). *Fitosanidad* 14, 247-252.
- Figueiredo, P.T., Silva, E.W., Cordeiro, L.V., Barros, R.P., Lima, E., Scotti, M.T., da Silva, M.S., Tavares, J.F., Costa, V.C.d.O., 2021. Lupanes and friedelanes, the first chemical constituents of the aerial parts of *Maytenus erythroxylon* Reissek. *Phytochemistry Letters* 45, 19-24.
- Figuroa-Espinoza, M.C., Zafimahova, A., Alvarado, P.G.M., Dubreucq, E., Poncet-Legrand, C.J.F.c., 2015. Grape seed and apple tannins: emulsifying and antioxidant properties. *Food Chemistry* 178, 38-44.
- Fitzgerald, M., Heinrich, M., Booker, A., 2020. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Frontiers in Pharmacology* 10, 1480.
- Ford, A.C., Yuan, Y., Moayyedi, P.J.G., 2020. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer: systematic review and meta-analysis. *Gut* 69, 2113-2121.
- Fyhrquist, P., Laakso, I., Marco, S.G., Julkunen-Tiitto, R., Hiltunen, R., 2014. 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* 90, 1-16.
- Gatta, L., Vakil, N., Vaira, D., Scarpignato, C., 2013. Global eradication rates for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of sequential therapy. *Bmj* 347, f4587.
- Gomes, J.V.D., Borges, A.S., Athaydes, B.R., Gomes-Copeland, K.K.P., Silveira, D., Magalhães, P.O., Gonçalves, R.d.C.R., Kitagawa, R.R., Fonseca-Bazzo, Y.M., Jamal, C.M., 2022. Anti-*Helicobacter pylori* potential, antioxidant capacity, and anti-inflammatory activity of *Xylopiia sericea* A. St.-Hil.(Annonaceae) leaves. *Phytomedicine Plus* 2, 100214.
- Gonzalez, F., Portela, T., Stipp, E., Di Stasi, L., 2001. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 41-47.
- Gracia, A., Miranda, J., Fernández-Quintela, A., Eseberri, I., Garcia-Lacarte, M., Milagro, F.I., Martínez, J.A., Aguirre, L., Portillo, M.P., 2016. Involvement of miR-539-5p in the inhibition of de novo lipogenesis induced by resveratrol in white adipose tissue. *Food & Function* 7, 1680-1688.



- Grootaert, C., Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Van Camp, J., 2015. Cell systems to investigate the impact of polyphenols on cardiovascular health. *Nutrients* 7, 9229-9255.
- Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., Petzold, G., 2022. Plant-based polyphenols: Anti-*Helicobacter pylori* effect and improvement of gut microbiota. *Antioxidants* 11, 109.
- Gupta, V., Sharma, M., 2012. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of methanolic extracts of *Maytenus emarginata*. *Omics: a Journal of Integrative Biology* 16, 257-262.
- Gutiérrez, F., Estévez-Braun, A., Ravelo, Á.G., Astudillo, L., Zárate, R., 2007. Terpenoids from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products* 70, 1049-1052.
- Helicobacter, Group, C.C., 2001. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 49, 347-353.
- Hernandes, C., Miguita, L., de Sales, R.O., Silva, E.d.P., Mendonça, P.O.R.d., Lorencini da Silva, B., Klingbeil, M.d.F.G., Mathor, M.B., Rangel, E.B., Marti, L.C., 2020. Anticancer activities of the quinone-methide triterpenes maytenin and 22- $\beta$ -hydroxymaytenin obtained from cultivated *Maytenus ilicifolia* roots associated with down-regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p. *Molecules* 25, 760.
- Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., Seberg, O., 2011. Flowering Plants: A concise pictorial guide. Royal Botanic Garden, Kew.
- Hooi, J.K., Lai, W.Y., Ng, W.K., Suen, M.M., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W., Wu, J.C., 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*.
- Hu, Y., Zhu, Y., Lu, N.-H.J.C.m.j., 2020. Recent progress in *Helicobacter pylori* treatment. *Chinese Medical Journal* 133, 335.
- Hunt, R., Xiao, S., Megraud, F., Leon-Barua, R., Bazzoli, F., Van der Merwe, S., Vaz Coelho, L., Fock, M., Fedail, S., Cohen, H., 2011. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 20, 299-304.
- Hussain, Z., Katas, H., Amin, M.C.I.M., Kumolosasi, E., Buang, F., Sahudin, S., 2013. 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* 444, 109-119.
- IARC, 1994. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, in: Humans, (Ed.), Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- INCA, 2017. Tipos de câncer - Estômago. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro - RJ.
- Itokawa, H., Shirota, O., Ikuta, H., Morita, H., Takeya, K., Iitaka, Y., 1991. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry* 30, 3713-3716.

- Itokawa, H., Shirota, O., Morita, H., Takeya, K., Iitaka, Y., 1994. Cangorins FJ, five additional oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products* 57, 460-470.
- Itokawa, H., Shirota, O., Morita, H., Takeya, K., Tomioka, N., Itai, A., 1990. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *Tetrahedron Letters* 31, 6881-6882.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H., 2017. Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmmed Pharmacology* 7, 1-7.
- Jaradat, N.A., Zaid, A.N., Abuzant, A., Khalaf, S., Abu-Hassan, N.J.E.J.o.I.M., 2017. Phytochemical and biological properties of four *Astragalus* species commonly used in traditional Palestinian medicine. *European Journal of Integrative Medicine* 9, 1-8.
- Jeong, S.Y., Na, M.W., Park, E.C., Kim, J.-C., Kang, D.-M., Hamishehkar, H., Ahn, M.-J., Kim, J.K., Kim, K.H., 2022. Labdane-type Diterpenes from *Pinus eldarica* Needles and Their Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *ACS Omega* 7, 29502-29507.
- Ji, Y.H., Shi, Y.M., Hei, Q.W., Sun, J.M., Yang, X.F., Wu, T., Sun, D.L., Qi, Y.X., 2023. Evaluation of guidelines for diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 28, e12937.
- Joly, A.B., 1998. *Introdução à taxonomia vegetal*, 12. ed. ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- Jorge, R., Leite, J., Oliveira, A., Tagliati, C., 2004. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 93-100.
- Kao, C.-Y., Sheu, B.-S., Wu, J.-J., 2016. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal* 39, 14-23.
- Kennedy, M.L., Cortés-Selva, F., Pérez-Victoria, J.M., Jiménez, I.A., González, A.G., Muñoz, O.M., Gamarro, F., Castanys, S., Ravelo, A.G., 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *Journal of Medicinal Chemistry* 44, 4668-4676.
- Kloucek, P., Svobodova, B., Polesny, Z., Langrova, I., Smrcek, S., Kokoska, L., 2007. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 427-429.
- Kocsmár, É., Buzás, G.M., Szirtes, I., Kocsmár, I., Kramer, Z., Szijártó, A., Fadgyas-Freyler, P., Szénás, K., Rügge, M., Fassan, M.J.N.c., 2021. Primary and secondary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and mathematical modeling of the role of macrolides. *Nature* 12, 1-12.
- Kreis, W., Munkert, J., Pádua, R.M., 2017. Biossíntese de metabólitos primários e secundários, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Mello, J.C.P.d., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.),

- Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Editora Artmed, Porto Alegre, pp. 147-166.
- Kubota, S., Kurihara, T., Mochimaru, H., Satofuka, S., Noda, K., Ozawa, Y., Oike, Y., Ishida, S., Tsubota, K., 2009. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50, 3512-3519.
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 449-490.
- Leite, J.P.V., Braga, F.C., Romussi, G., Persoli, R.M., Tabach, R., Carlini, E.A., Oliveira, A.B., 2010. Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21, 248-254.
- Leite, J.P.V., Rastrelli, L., Romussi, G., Oliveira, A.B., Vilegas, J.H., Vilegas, W., Pizza, C., 2001. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 3796-3801.
- Leme, T.d.S.V., Prando, T.B.L., Gasparotto, F.M., De Souza, P., Crestani, S., De Souza, L.M., Cipriani, T.R., Lourenço, E.L.B., Junior, A.G., 2013. Role of prostaglandin/cAMP pathway in the diuretic and hypotensive effects of purified fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 150, 154-161.
- Li, Y., Choi, H., Leung, K., Jiang, F., Graham, D.Y., Leung, W.K., 2023. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection between 1980 and 2022: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology Hepatology*.
- Liou, J.-M., Chen, C.-C., Chen, M.-J., Chen, C.-C., Chang, C.-Y., Fang, Y.-J., Lee, J.Y., Hsu, S.-J., Luo, J.-C., Chang, W.-H., 2013. Sequential versus triple therapy for the first-line treatment of *Helicobacter pylori*: a multicentre, open-label, randomised trial. *The Lancet* 381, 205-213.
- Longhi, R.A., 1995. Livro das Árvores: Árvores e arvoretas do Sul. L&PM Editores, Porto Alegre, RS.
- Maina, M.B., Maina, G.S., Muriithi, N.J., Kiambi, M.J., Umar, A., Mwonjoria, J.K., Mutero, N.G., Juma, K.K., Njoroge, A.W., Mburu, D., 2015. Antinociceptive properties of dichloromethane: methanolic leaf extracts of *Caesalpinia volkensii* and *Maytenus obscura* in animal models. *Journal of Pain & Relief*.
- Maixner, F., Thorell, K., Granehall, L., Linz, B., Moodley, Y., Rattei, T., Engstrand, L., Zink, A., 2019. *Helicobacter pylori* in ancient human remains. *World Journal of Gastroenterology* 25, 6289.

- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'morain, C., Gisbert, J., Kuipers, E., Axon, A., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D.Y., 2017. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut* 66, 6-30.
- Manyi-Loh, C.E., Clarke, A.M., Ndip, R.N., 2012. Detection of phytoconstituents in column fractions of n-hexane extract of *Goldcrest honey* exhibiting anti-*Helicobacter pylori* activity. *Archives of Medical Research* 43, 197-204.
- Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., Clifford, G.M., 2020. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health* 8, e180-e190.
- Martins, M.V., Estevam, C.d.S., Santos, A.L., Dias, A.S., Cupertino-da-Silva, Y.K., Araújo-Júnior, J.X., Miranda, A.L.P., Barreiro, E.J., Pizza, C., Piacente, S., 2012. Antinociceptive effects of an extract, fraction and an isolated compound of the stem bark of *Maytenus rigida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22, 598-603.
- Mazzolin, L.P., Nasser, A.L., Moraes, T.M., Santos, R.C., Nishijima, C.M., Santos, F.V., Varanda, E.A., Bauab, T.M., da Rocha, L.R., Di Stasi, L.C., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2010. *Qualea parviflora* Mart.: an integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 508-514.
- McNulty, C.A., 2023. The first 5 years of *Helicobacter pylori* research—With an emphasis on the United Kingdom. *Helicobacter*, e12982.
- Messing, J., Niehues, M., Shevtsova, A., Borén, T., Hensel, A.J.M., 2014. Antiadhesive properties of arabinogalactan protein from *Ribes nigrum* seeds against bacterial adhesion of *Helicobacter pylori*. *Molecules* 19, 3696-3717.
- Montaz, S., Hussein, A.A., Ostad, S.N., Abdollahi, M., Lall, d.N., 2013. Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenus procumbens*. *Food Chemical Toxicology* 51, 38-45.
- Monache, F., Pomponi, M., Marini-Bettolo, G., D'Albuquerque, I., Goncalves de Lima, O., 1976. A methylated catechin and proanthocyanidins from the Celastraceae. *Phytochemistry (UK)*.
- Montanari, T., Bevilacqua, E., 2002. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. *Contraception* 65, 171-175.
- Morey, A.T., Souza, F.C.d., Santos, J.P., Pereira, C.A., Cardoso, J.D., Almeida, R.S.d., Costa, M.A., Mello, J.C.d., Nakamura, C., Pinge-Filho, P., 2016. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17, 365-375.
- Mossi, A., Cansian, R., Leontiev-Orlov, O., Zanin, E., Oliveira, C., Cechet, M., Carvalho, A., Echeverrigaray, S., 2007. Intra and inter populational genetic variability in *Maytenus*

- ilicifolia* Mart. ex Reiss. 1861, through RAPD markers. Brazilian Journal of Biology 67, 957-961.
- Mossi, A.J., Cansian, R.L., Carvalho, A.Z., Dariva, C., Oliveira, J.V., Mazutti, M., Irajá Filho, N., Echeverrigaray, S., 2004. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO<sub>2</sub>. Fitoterapia 75, 168-178.
- Mossi, A.J., Mazutti, M.A., Cansian, R.L., Oliveira, D.d., Oliveira, J.V.d., Dallago, R., Leontiev-Orlov, O., Treichel, H., Echeverrigaray, S., Nascimento Filho, I.d., 2010. Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. Química Nova 33, 1067-1070.
- Moura, F.B.R., Ferreira, B.A., Deconte, S.R., Landim, B.C., Justino, A.B., de Aro, A.A., Espindola, F.S., Rodrigues, R.A.F., Ribeiro, D.L., de Assis Araújo, F.J.J.o.T., Medicine, C., 2021. Wound healing activity of the hydroethanolic extract of the leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis. Journal of Traditional and Complementary Medicine 11, 446-456.
- Muñoz, O., Penaloza, A., Gonzalez, A.G., Ravelo, A.G., Bazzocchi, I.L., Alvarenga, N.L., 1996. The Celastraceae from Latin America Chemistry and Biological Activity. Studies in Natural Products Chemistry 18, 739-783.
- Naasani, I., Oh-Hashi, F., Oh-Hara, T., Feng, W.Y., Johnston, J., Chan, K., Tsuruo, T., 2003. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer Research 63, 824-830.
- Nasim, N., Sandeep, I.S., Mohanty, S., 2022. Plant-derived natural products for drug discovery: Current approaches and prospects. The Nucleus 65, 399-411.
- Nguyen, H., Herrmann, F., König, S., Goycoolea, F., Hensel, A., 2022. Structural characterization of the carbohydrate and protein part of arabinogalactan protein from *Basella alba* stem and antiadhesive activity of polysaccharides from *B. alba* against *Helicobacter pylori*. Fitoterapia 157, 105132.
- Nishizawa, K., Nakata, I., Kishida, A., Ayer, W.A., Browne, L.M., 1990. Some biologically active tannins of *Nuphar variegatum*. Phytochemistry 29, 2491-2494.
- Nontakham, J., Charoenram, N., Upamai, W., Taweechoitipatr, M., Suksamrarn, S.J.A.o.p.r., 2014. Anti-*Helicobacter pylori* xanthenes of *Garcinia fusca*. Archives of Pharmacal Research 37, 972-977.
- Nunes, A.T., Albuquerque, U.P., 2018. South American biodiversity and its potential in medicinal and aromatic plants. Medicinal Aromatic Plants of South America: Brazil 3-15.
- Núñez, M.J., Guadaño, A., Jiménez, I.A., Ravelo, A.G., González-Coloma, A., Bazzocchi, I.L., 2004. Insecticidal Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus chiapensis*. Journal of Natural Products 67, 14-18.
- O'Connor, A., Furuta, T., Gisbert, J.P., O'Morain, C.J.H., 2020. Review–Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2020. Helicobacter 25, e12743.

- Ohsaki, A., Imai, Y., Naruse, M., Ayabe, S., Komiyama, K., Takashima, J., 2004. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products* 67, 469-471.
- Oliveira, M.G.M., Monteiro, M.G., Macaúbas, C., Barbosa, V.P., Carlini, E., 1991. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology* 34, 29-41.
- Orabi, K.Y., Al-Qasoumi, S.I., El-Olemy, M.M., Mossa, J.S., Muhammad, I., 2001. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. *Phytochemistry* 58, 475-480.
- Ottemann, K.M., Lowenthal, A.C., 2002. *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infection and Immunity* 70, 1984-1990.
- Paz, T.A., dos Santos, V.A., Inácio, M.C., Dias, N.B., Palma, M.S., Pereira, A.M.S., Furlan, M., 2017. Proteome profiling reveals insights into secondary metabolism in *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) cell cultures producing quinonemethide triterpenes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 130, 405-416.
- Pedroso, R.d.S., Andrade, G., Pires, R.H., 2021. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis: Revista de Saúde Coletiva* 31.
- Pereira, A., Januário, A., Queiroz, M., Biondo, R., França, S., 2005. Evaluation of *Maytenus aquifolia* Mart. and *Maytenus ilicifolia* Mart. chemotypes for tannins, total phenols and triterpenes. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 8, 13-17.
- Périco, L.L., Rodrigues, V.P., de Almeida, L.F.R., Fortuna-Perez, A.P., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2018. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. Medicinal aromatic plants of South America: Brazil 323-335.
- Perleberg, T.D., Lia Barbieri, R., Paim Mariot, M., Ebeling da Silva, T., Mendonça Vitória, J., da Silva Silva, P., de Sousa Corrêa de Magalhães, R., 2021. Reproductive biology of espinheira-santa (*Monteverdia ilicifolia*, Celastraceae). *Revista Ciência e Natura* 43.
- Pessuto, M.B., 2006. Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p. 104.
- Pessuto, M.B., Costa, I.C.d., Souza, A.B.d., Nicoli, F.M., Petereit, F., Luftmann, H., Mello, J.C.P., 2009. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova* 32, 412-416.
- Poser, G.L.V., 2017. A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Mello, J.C.P.d., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Editora Artmed, Porto Alegre, RS, pp. 23-28.
- Poser, G.L.V., Mentz, L.A., 2007. Diversidade biológica e sistemas de classificação, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.d., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.),

- Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6. ed. ed. Editora da UFRGS; Editora da UFSC, Porto Alegre; Florianópolis.
- Queiroga, C.L., Silva, G.F., Dias, P.C., Possenti, A., de Carvalho, J.E., 2000. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 $\beta$ -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 72, 465-468.
- Ramírez, V.M.G., Santacruz, C.M.A.G., González, D.M.M., Nakayama, H.D., Ferreira, F., Franco, G., Keim, L., Núñez, H., 2020. Actividad antibacteriana *in vitro* de *Maytenus ilicifolia* Martius sobre *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. *Investigaciones y Estudios-UNA* 11, 34-46.
- Rattmann, Y.D., Cipriani, T.R., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Rieck, L., Marques, M.C., da Silva-Santos, J.E., 2006. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 328-335.
- Rodrigues, C.G., Ferreira, P.R.B., Mendes, C.S.O., Junior, R.R., Valerio, H.M., Brandi, I.V., de Oliveira, D.A., 2014. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw.(Myrtaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 8, 1095-1100.
- Rong, Q., Xu, M., Dong, Q., Zhang, Y., Li, Y., Ye, G., Zhao, L.J.B.c., medicine, a., 2016. *In vitro* and *in vivo* bactericidal activity of *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep. var. *craveniana* (SY Hu) Lo and its main effective component, palmatine, against porcine *Helicobacter pylori*. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 16, 1-8.
- Rozza, A.L., de Mello Moraes, T., Kushima, H., Nunes, D.S., Hiruma-Lima, C.A., Pellizzon, C.H., 2011. Involvement of glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide, vasoactive intestinal peptide, and heat-shock protein-70 in the gastroprotective mechanism of *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) essential oil. *Journal of Medicinal Food* 14, 1011-1017.
- Sadik, C.D., Sies, H., Schewe, T., 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology* 65, 773-781.
- Saleem, A., Husheem, M., Härkönen, P., Pihlaja, K., 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 327-336.
- Salehi, B., Sharopov, F., Martorell, M., Rajkovic, J., Ademiluyi, A.O., Sharifi-Rad, M., Fokou, P.V.T., Martins, N., Iriti, M., Sharifi-Rad, J., 2018. Phytochemicals in *Helicobacter pylori* infections: What are we doing now? *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2361.
- Santiago, M.B., Leandro, L.F., Rosa, R.B., Silva, M.V., Teixeira, S.C., Servato, J.P.S., Ambrósio, S.R., Veneziani, R.C.S., Aldana-Mejía, J.A., Bastos, J.K., 2022. Brazilian red propolis presents promising anti-*H. pylori* activity in *in vitro* and *in vivo* assays with the ability to modulate the immune response. *Molecules* 27, 7310.

- Santos, M.L.C., de Brito, B.B., da Silva, F.A.F., Sampaio, M.M., Marques, H.S., Oliveira, N., de Magalhães Queiroz, D.M., de Melo, F.F., 2020. *Helicobacter pylori* infection: Beyond gastric manifestations. *Journal of World Journal of Gastroenterology* 26, 4076.
- Santos, S.d.C., Mello, J.C.P.d., 2007. Taninos, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.d., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS; Editora da UFSC, Porto Alegre; Florianópolis, pp. 615-656.
- Santos, V.A.d.F.F.M.d., Leite, K.M., da Costa Siqueira, M., Regasini, L.O., Martinez, I., Nogueira, C.T., Galuppo, M.K., Stolf, B.S., Pereira, A.M.S., Cicarelli, R.M., 2013. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules* 18, 1053-1062.
- Santos, V.A.d.F.F.M.d., Pereira dos Santos, D., Castro-Gamboa, I., Zanoni, M.V.B., Furlan, M., 2010. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules* 15, 6956-6973.
- Santos, V.A.d.F.F.M.d., Regasini, L.O., Nogueira, C.u.R., Passerini, G.D., Martinez, I., Bolzani, V.S., Graminha, M.r.A., Cicarelli, R.M., Furlan, M., 2012. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products* 75, 991-995.
- Savoldi, A., Carrara, E., Graham, D.Y., Conti, M., Tacconelli, E., 2018. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. *Gastroenterology* 155, 1372-1382. e1317.
- Sayed, A.M.E., Omar, F.A., Emam, M.M.A.-A., Farag, M.A., 2022. UPLC-MS/MS and GC-MS based metabolites profiling of *Moringa oleifera* seed with its anti-*Helicobacter pylori* and anti-inflammatory activities. *Natural Product Research* 36, 6433-6438.
- Schaneberg, B.T., Green, D.K., Sneden, A.T., 2001. Dihydroagarofuran Sesquiterpene Alkaloids from *Maytenus putterlickoides*. *Journal of Natural Products* 64, 624-626.
- Schindler, M.S.Z., Calisto, J.F.F., Marins, K., Regginato, A., Mezzomo, H., Zanatta, A.P., Radunz, A.L., Mariot, M.P., Dal Magro, J., Zanatta, L., 2021. Characterization of the chemical profile and the effects of ethanolic extracts of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek on glucose metabolism in normal hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 276, 114173.
- Schwarzer, A., Bontems, P., Urruzuno, P., Kalach, N., Iwanczak, B., Roma-Giannikou, E., Sykora, J., Kindermann, A., Casswall, T., Cadranel, S., 2016. Sequential Therapy for *Helicobacter pylori* Infection in Treatment-naïve Children. *Helicobacter* 21, 106-113.
- Shirota, O., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., 1997. Revised structures of cangorosins, triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of natural products* 60, 111-115.



- Shirota, O., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., Iitaka, Y., 1994. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *Journal of Natural Products* 57, 1675-1681.
- Simmons, M.P., 2004. Celastraceae, in: Kubitzki, K. (Ed.), Families and genera of vascular plants: Flowering plants, Dicotyledons: Celestrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemanha, pp. 29-37; 48.
- Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G.J.A., Maciejewski, R., Polkowski, W.P., 2018. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management and Research* 10, 239.
- Sjomina, O., Pavlova, J., Niv, Y., Leja, M., 2018. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 23, e12514.
- Sosa, A.C.A., Mariani, M.L., Vega, A.E., Penissi, A.B., 2022. Extra virgin olive oil inhibits *Helicobacter pylori* growth *in vitro* and the development of mice gastric mucosa lesions *in vivo*. *Frontiers in Microbiology* 13, 961597.
- Sousa, C., Ferreira, R., Azevedo, N.F., Oleastro, M., Azeredo, J., Figueiredo, C., Melo, L.D.J.C., 2022. *Helicobacter pylori* infection: From standard to alternative treatment strategies. *Critical reviews in microbiology* 48, 376-396.
- Souza-Formigoni, M.L.O., Oliveira, M.G.M., Monteiro, M.G., da Silveira-Filho, N.G., Braz, S., Carlini, E., 1991. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology* 34, 21-27.
- Souza, L.M., Cipriani, T.R., Iacomini, M., Gorin, P.A., Sasaki, G.L., 2008a. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 59-67.
- Souza, L.M., Cipriani, T.R., Sant'Ana, C.F., Iacomini, M., Gorin, P.A., Sasaki, G.L., 2009. Heart-cutting two-dimensional (size exclusion× reversed phase) liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography A* 1216, 99-105.
- Souza, L.M., Cipriani, T.R., Serrato, R.V., da Costa, D.E., Iacomini, M., Gorin, P.A., Sasaki, G.L., 2008b. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1207, 101-109.
- Souza, V.C., Lorenzi, H., 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum.
- Stehmann, J.R., Sobral, M., 2017. Biodiversidade no Brasil. Simões, CMO; Schenkel, EP; Mello, JCP, 1-10.
- Šterbenc, A., Jarc, E., Poljak, M., Homan, M., 2019. *Helicobacter pylori* virulence genes. *World Journal of Gastroenterology* 25, 4870.

- Stolarczyk, M., Piwowarski, J.P., Granica, S., Stefańska, J., Naruszewicz, M., Kiss, A.K., 2013. 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* 27, 1842-1848.
- Süntar, I., 2020. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Journal of Phytochemistry Reviews* 19, 1199-1209.
- Tabach, R., Duarte-Almeida, J.M., Carlini, E., 2017a. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract Part II—Clinical Study (Phase I). *Phytotherapy Research* 31, 921-926.
- Tabach, R., Duarte-Almeida, J.M., Carlini, E.A., 2017b. Pharmacological and toxicological study of *Maytenus ilicifolia* leaf extract. part I—preclinical studies. *Phytotherapy Research* 31, 915-920.
- Tabach, R., Oliveira, W.P.d., 2003. 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* 58, 573-576.
- Thiesen, L.C., da Silva, L.M., Santin, J.R., Bresolin, T.M.B., de Andrade, S.F., de Medeiros Amorim, C., Merlin, L., de Freitas, R.A., Niero, R., Netz, D.J.A., 2017. Hepatoprotective effect of *Maytenus robusta* Reiss extract on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in mice and HepG2 cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 86, 93-100.
- Thöle, C., Brandt, S., Ahmed, N., Hensel, A., 2015. Acetylated rhamnogalacturonans from immature fruits of *Abelmoschus esculentus* inhibit the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells by interaction with outer membrane proteins. *Molecules* 20, 16770-16787.
- Thung, I., Aramin, H., Vavinskaya, V., Gupta, S., Park, J., Crowe, S., Valasek, M., 2016. the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 43, 514-533.
- Tiberti, L.A., Yariwake, J.H., Ndjoko, K., Hostettmann, K., 2007. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *Journal of Chromatography B* 846, 378-384.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65, 87-108.
- Trabulsi, L.R., Alterthum, F., 2015. *Microbiologia*, 6 ed. ed. Atheneu, São Paulo.
- Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246.
- Tshibangu-Kabamba, E., Yamaoka, Y., 2021. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance—from biology to clinical implications. *Journal of Nature Reviews Gastroenterology Hepatology* 18, 613-629.

- Varga, M.G., Butt, J., Blot, W.J., Le Marchand, L., Haiman, C.A., Chen, Y., Wassertheil-Smoller, S., Tinker, L.F., Peek Jr, R.M., Potter, J.D., 2020. Racial differences in *Helicobacter pylori* CagA sero-prevalence in a consortium of adult cohorts in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 29, 2084-2092.
- Velloso, J., Khalil, N., Formenton, V., Ximenes, V., Fonseca, L., Furlan, M., Brunetti, I.L., Oliveira, O., 2006. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. *Fitoterapia* 77, 243-244.
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., Alborés, S., 2018. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids* 133, 58-64.
- Vilegas, J.H.Y., Lanças, F., Antoniosi Filho, N., 1995. High temperature capillary GC analysis of phytopreparations of “espíneira santa”(*Maytenus ilicifolia* M. and *Maytenus aquifolium* M.—Celastraceae), a Brazilian antiulcer plant. *Chromatographia* 40, 341-344.
- Vistuba, J.P., Piovezan, M., Pizzolatti, M.G., Rebelo, A.M., Azevedo, M.S., Vitali, L., Costa, A.C.O., Micke, G.A., 2013. Increasing the instrumental throughput of gas chromatography method using multiple injections in a single experimental run: Application in determination of friedelan-3-ol and friedelin in *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography A* 1274, 159-164.
- Weli, A.M., Al-Burtamani, R.S., Al-Azzawi, M.S., Akhtar, M.S., Said, S.A., 2019. Research article antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of *Maytenus dhofarensis* growing in Oman. *Journal of Applied Sciences* 19, 229-234.
- Wessler, S., 2016. Emerging Novel Virulence Factors of *Helicobacter pylori*, in: Backert, S., Yamaoka, Y. (Eds.), *Helicobacter pylori* Research: From Bench to Bedside. Springer Japan, Tokyo, pp. 165-188.
- WFO, 2023. Celastraceae R.Br., World Flora Online, Published on the Internet.
- WHO, 1978. World Health Assembly n° 31 - Medicinal plants. World Health Organisation Press, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2017. Cancer, World Health Organisation - Media Center. World Health Organization.
- Wibowo, M., Wang, Q., Holst, J., White, J.M., Hofmann, A., Davis, R.A., 2018. Dihydro- $\beta$ -agarofurans from the roots of the Australian endemic rainforest tree *Maytenus bilocularis* act as leucine transport inhibitors. *Phytochemistry* 148, 71-77.
- Widelski, J., Okińczyk, P., Suśniak, K., Malm, A., Bozhadze, A., Jokhadze, M., Korona-Główniak, I., 2023. Correlation between chemical profile of Georgian propolis extracts and their activity against *Helicobacter pylori*. *Molecules* 28, 1374.
- Wonfor, R., Natoli, M., Parveen, I., Beckman, M., Nash, R., Nash, D., 2017. Anti-inflammatory properties of an extract of *M. ilicifolia* in the human intestinal epithelial Caco-2 cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 209, 283-287.

- Wroblewski, L.E., Peek, R.M., Wilson, K.T., 2010. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 713-739.
- Wu, W., Yang, Y., Sun, G., 2012. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. *Gastroenterology Research and Practice* 2012.
- Xavier, H.S., D'angelo, L.C.A., 1996. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* Mart.(Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 5, 20-28.
- Xu, M., Zhou, J., Heng, D., Su, X., Onakpa, M.M., Bai, Y., Duan, J.-A., Che, C.-T., Bi, H., Zhao, M., 2022. Quinone Derivatives as Promising Anti-*Helicobacter pylori* Agents from Aerial Parts of *Mitracarpus hirtus*. *Journal of Natural Products* 85, 1029-1038.
- Yahya, R., Al-Rajhi, A.M., Alzaid, S.Z., Al Abboud, M.A., Almuhayawi, M.S., Al Jaouni, S.K., Selim, S., Ismail, K.S., Abdelghany, T.M., 2022. Molecular docking and efficacy of *Aloe vera* gel based on chitosan nanoparticles against *Helicobacter pylori* and its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Polymers* 14, 2994.
- Yamaoka, Y., 2018. How to eliminate gastric cancer-related death worldwide? *Journal of Nature Reviews Clinical Oncology* 15, 407-408.
- Yang, H., Guan, L., Hu, B., 2022. Detection and treatment of *Helicobacter pylori*: problems and advances. *Gastroenterology Research and Practice* 2022.
- Yang, W.-H., Deng, Y.-T., Kuo, M.Y.-P., Liu, C.-M., Chang, H.-H., Chang, J.Z.-C., 2013. 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* 39, 1407-1412.
- Yu, D., An, F., He, X., Cao, X., 2015. Curcumin inhibits the proliferation and invasion of human osteosarcoma cell line MG-63 by regulating miR-138. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8, 14946.
- Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., Derakhshan, M., 2018. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 47, 868-876.
- Zhu, N., Sharapin, N., Zhang, J., 1998. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry* 47, 265-268.

## Apêndice A - Desenvolvimento de metodologia analítica para separação de extratos semipurificados contendo substâncias de alto peso molecular

Proantocianidinas ou taninos condensados são oligômeros naturais complexos e polímeros formados por unidades flavan-3-ol. Esses compostos apresentam uma estrutura diversificada devido às possíveis diferenças no: grau de polimerização, ligações entre as unidades flavan, estereoquímica, hidroxilação e o padrão de substituição. A elucidação estrutural de proantocianidinas é um desafio devido à complexidade dos oligômeros e polímeros (Santos-Buelga and Scalbert, 2000; Neilson et al., 2016; Rauf et al., 2019; Luca et al., 2020; Symma et al., 2020).

Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) é uma alternativa de separação para compostos polares. Esse tipo de cromatografia é uma variante da cromatografia líquida em fase normal, sendo a fase estacionária da HILIC polar, enquanto a fase móvel empregada é mais semelhante àquelas usadas em cromatografia líquida em fase reversa. Esse tipo de cromatografia tem sido usado para separação de ácidos orgânicos, drogas básicas, substâncias neutras e carregadas, carboidratos, peptídeos e produtos farmacêuticos polares. Normalmente a fase estacionária é constituída de sílica gel modificada com diversos grupos funcionais polares como grupo amino, amida e diol. Colunas com sílica-DIOL são usadas comumente para separação de proteínas (Buszewski and Noga, 2012; Symma et al., 2020).

Foi realizado o desenvolvimento de método cromatográfico utilizando a cromatografia líquida de interação hidrofóbica (HILIC-DIOL) com misturas complexas de proantocianidinas obtidas de extratos semipurificados de plantas da flora brasileira.

### **Materiais e Métodos:**

#### **Preparo das amostras**

Foram utilizadas frações aquosas, obtidas a partir da partição acetato de etila: água dos extratos brutos de: *M. ilicifolia*, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. (barbatimão), *Trichilia catigua* A.Juss. (catuaba), *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (baicuru) e *Guazuma ulmifolia* Lam. (mutamba). As amostras foram solubilizadas em metanol: água (50:50, v/v).

#### **Metodologia UHPLC**

A metodologia foi desenvolvida em UHPLC Thermo® Ultimate 3000 equipado com detector de arranjo foto diodo (PDA), software controlador (Chromeleon 7), amostrador automático com loop de 20 µl (injeção parcial). Foi utilizado um sistema de fases gradiente sendo a fase A: acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1%; e a fase B: metanol: água (88:12, v/v)

acidificada com ácido fórmico 0,1%. Foi usada uma coluna YMC Triart Diol-HILIC;150 x 3.0 mm; 1.9  $\mu$ m. Para o sistema inicial foi usada uma temperatura de forno de 35,0 °C, uma vazão da fase móvel de 0,6 mL/min, e o seguinte gradiente: 0-6.18 min, 0-35% B; 6.18-7.75 min 35-40% B; 7.75-9.00 min 40% B; 9.00-10.50 min 40-100% B; 10.5-13 min 100% B; 13-15 min 100-0% B; 15-18 min 0% B (gradiente 1). Essa metodologia foi sofrendo adaptações ao decorrer do trabalho.

### **Metodologia UHPLC/MS-MS**

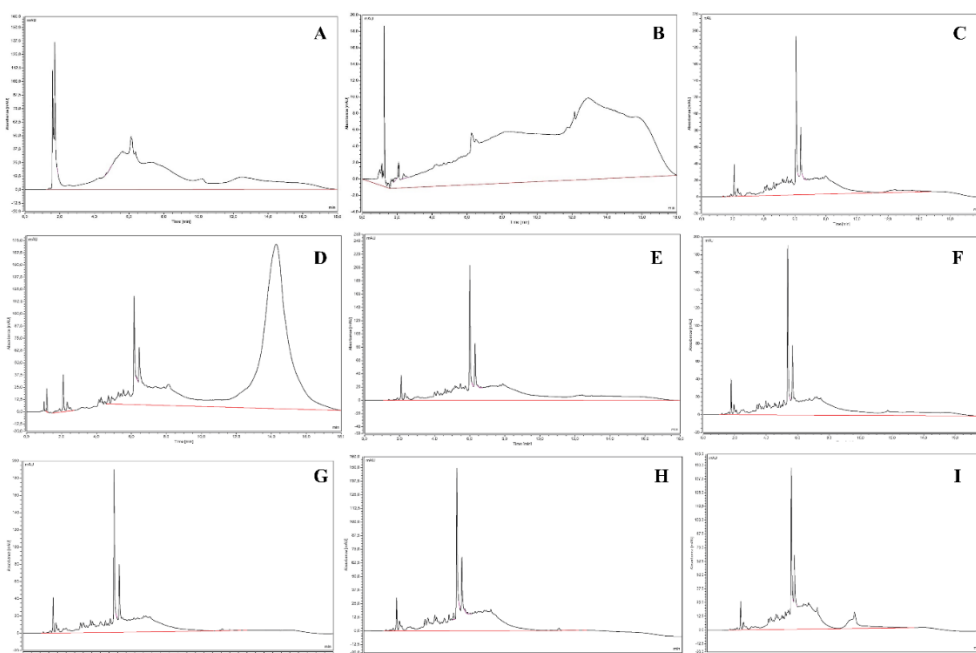
Cada amostra foi injetada no volume de 5  $\mu$ L e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna YMC Triart Diol-HILIC;150 x 3.0 mm; 1.9  $\mu$ m, a um fluxo de 0,3 mL/ min. Para a fase móvel, utilizaram-se fase A (acetonitrila com ácido fórmico a 0,5%) e fase B (metanol: água 88:12 v/v; com ácido fórmico a 0,5%), empregando-se o seguinte sistema gradiente de eluição: 0-6.18 min, 0-35% B; 6.18-7.75 min 35-40% B; 7.75-9.00 min 40% B; 9.00-10.50 min 40-100% B; 10.5-13 min 100% B; 13-15 min 100-0% B; 15-18 min 0% B, na temperatura de 45 °C. O instrumento foi calibrado usando uma solução de formato de sódio (10 mmol/L; isopropanol: água; 1:1; v/v) contendo 50  $\mu$ L de ácido fórmico concentrado. A fonte de ionização foi operada no modo de ionização positivo e negativo, e ajustada para 4500 V, com uma extremidade potencial da placa de -500 V. Os parâmetros de gás de secagem foram ajustados para 8 L/min a 200 °C, com uma pressão do gás de nebulização de 4 bar. Os dados foram obtidos na faixa de m/z 50 a 1500 com uma taxa de aquisição de 5 Hz. Os 5 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (AutoMS/MS). Os dados foram adquiridos pelo software Hystar Application versão 3.2 e Otof Control (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha).

### **Resultados:**

Para o desenvolvimento da metodologia foi usado como referência o artigo publicado por Paula et al (2021) e Symma et al (2020) que utilizou um sistema Waters Acquity UPLC H-class, coluna Waters Acquity UPLC BEH200 SEC 1.7  $\mu$ m 4.6  $\times$  150 mm sendo a fase móvel A: acetonitrila: ácido fórmico (98:2, v/v) e B: metanol: água: ácido fórmico (86:12:2, v/v). Vazão da fase móvel: 1 ml/min. Detecção por fluorescência  $\lambda_{ex}$  = 280 nm,  $\lambda_{em}$  = 316 nm, injeção da amostra 2  $\mu$ l a 10 mg/mL.

Para o desenvolvimento da metodologia foi usada a coluna YMC Triart Diol-HILIC;150 x 3.0 mm; 1.9  $\mu$ m. Apesar da semelhança entre as colunas foi necessário fazer algumas adaptações na metodologia, devido às limitações da coluna. Foi usado inicialmente uma vazão de 0,6

mL/min, temperatura de 35,0 °C, com as fases móveis acidificadas com ácido fórmico a 0,1%, 2 µl da amostra foi injetada em uma concentração de 1 mg/mL (Figura 1A).



**Figura 1.** YMC –Triart Diol-HILIC 1.9 µm 4.6x150 mm, 280 nm. Fração aquosa de *Monteverdia ilicifolia*. **A:** A: acetonitrila 0.1% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.1% ácido fórmico, 35.0 °C, injeção da amostra: 2 µL, concentração da amostra 1 mg/ml, vazão 0.6 ml/min; **B:** A: acetonitrila 0.1% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.1% ácido fórmico, 35.0 °C, injeção da amostra: 20 µL, concentração da amostra 1 mg/ml, vazão 0.6 ml/min; **C:** A: acetonitrila 0.5% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.5% ácido fórmico, 35.0 °C, injeção da amostra: 20 µL, concentração da amostra 10 mg/ml, vazão 0.6 ml/min; **D:** A: acetonitrila 0.5% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.5% ácido fórmico, 40.0 °C, injeção da amostra: 20 µL, concentração da amostra 10 mg/ml, vazão 0.6 ml/min; **E:** A: acetonitrila 0.5% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.5% ácido fórmico, 45.0 °C, injeção da amostra: 20 µL, concentração da amostra 10 mg/ml, vazão 0.6 ml/min; **F, G, H e I:** A: acetonitrila 0.5% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.5% ácido fórmico, 40.0 °C, injeção da amostra: 20 µL, concentração da amostra 10 mg/ml, vazão 0.7 ml/min.

Foi feita a injeção de 20 µl da amostra em uma concentração de 1 mg/mL, nas condições: vazão de 0,6 mL/min, temperatura de 35.0 °C, com as fases móveis acidificadas com ácido fórmico a 0,1%, (Figura 1B). Por não obter uma melhora do perfil cromatográfico foram feitas algumas alterações como: aumento da concentração da amostra, e aumento do pH das fases móveis, acidificando-as com 0,5% de ácido fórmico. Testou-se ainda uma variação de temperatura (35.0, 40.0 e 45.0 °C) (Figura 1C, 1D e 1E).

Para tentar melhorar a separação dos picos foi feita uma alteração na vazão da fase móvel para 0,7 ml/min (Figura 1F). em seguida foi realizada uma alteração no gradiente (2): 0-6.18 min, 0-35% B; 6.18-7.75 min 35-40% B; 7.75-9.00 min 40% B; 9.00-10.50 min 40-100% B; 10.50-13.00 min 100% B; 13.00-15.00 min 100-0% B; 15.00-18.00 min 0% B. (Figura 1G).

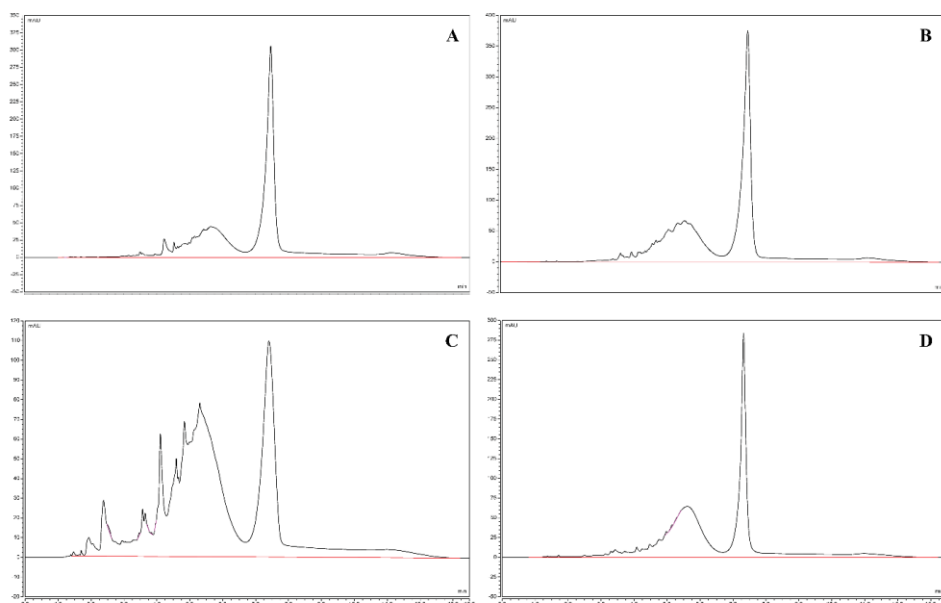
Uma nova tentativa de melhora na separação dos picos foi feita, por meio da alteração no gradiente (3): 0-5.00 min, 0-35% B; 5.00-6.57 min 35-40% B; 6.57-7.82 min 40% B; 7.82-9.32 min 40-100% B; 9.32-11.82 min 100% B; 11.82-13.82 min 100-0% B; 13.82-16.82 min 0% B. (Figura 1H).

Outra alteração foi realizada a fim de melhorar a separação, gradiente (4): 0-3.50 min, 0-40% B; 3.50-4.50 min 40-20% B; 4.50-5.50 min 20-100% B; 5.50-8.50 min 100% B; 8.50-10.50 min 100-0% B; 10.50-13.50 min 0% B (Figura 1I).

O gradiente descrito acima (4) (Figura 1I) resultou na melhor separação da amostra de *M. ilicifolia*, portanto esse método foi adaptado para uma vazão de 0,3 mL/min para ser utilizado na espectrometria de massas, já que o equipamento não suporta vazão da fase móvel superior a 0,3 mL/min.

Para a metodologia de UHPLC/MS-MS foi usado o gradiente 0-3.50 min, 0-40% B; 5.50-4.50 min 40-20% B; 4.50-5.50 min 20-100% B; 5.50-8.50 min 100% B; 8.50-10.50 min 100-0% B; 10.50-13.50 min 0% B, sendo a fase A: acetonitrila 0.5% ácido fórmico, fase B: metanol: água (86:12, v/v) 0.5% ácido fórmico, injeção da amostra: 20 µL, concentração da amostra 10 mg/ml, vazão 0.3 ml/min. O método precisa ser aperfeiçoado, pois da forma com que foi desenvolvido até o momento não ofereceu os dados necessários para caracterização dos compostos presentes na amostra.

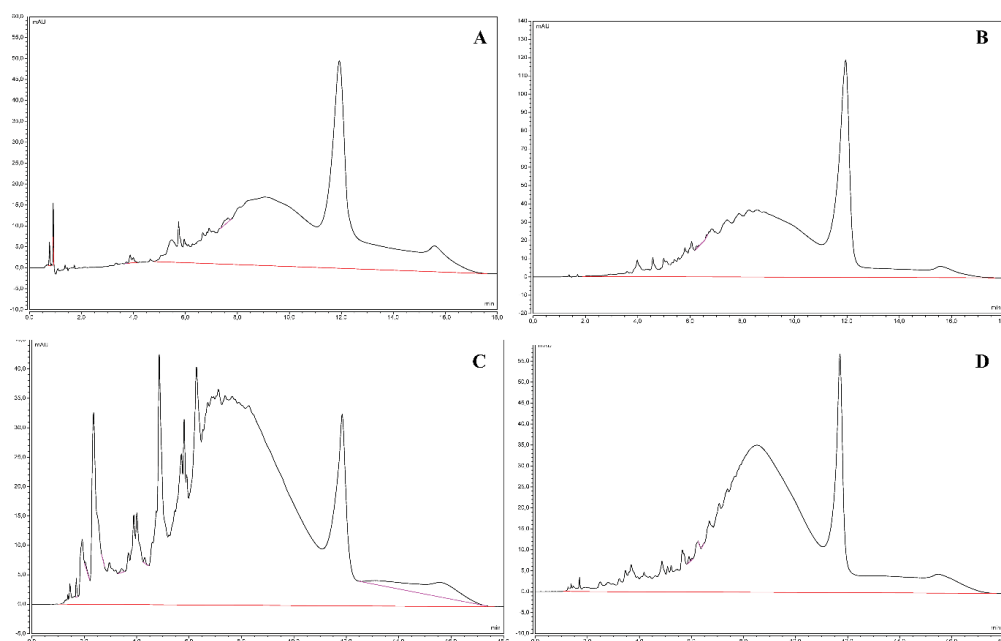
As frações aquosas do baicuru, barbatimão, catuaba e mutamba foram analisadas usando o gradiente (1) e o gradiente (4), a fim de verificar se o gradiente estabelecido pela literatura ou o gradiente desenvolvido para *M. ilicifolia* ofereceria um bom perfil de separação (Figura 2 e 3).



**Figura 2.** YMC –Triart Diol-HILIC 1.9 µm 4.6x150 mm, 40.0 °C, 280 nm, A: acetonitrila 0.1% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.1% ácido fórmico. A: acetonitrila 0.5% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.5%



ácido fórmico, injeção da amostra: 20  $\mu$ L, concentração da amostra 10 mg/ml, vazão 0.7 ml/min, Gradiente (1). (A): *L. brasiliense*; (B): *S. adstringens*; (C): *T. catigua*; (D): *G. ulmifolia*.



**Figura 3.** YMC –Triart Diol-HILIC 1.9  $\mu$ m 4.6x150 mm, 40.0  $^{\circ}$ C, 280 nm, A: acetonitrila 0.1% ácido fórmico, B: metanol: água (86:12, v/v) 0.1% ácido fórmico, C: acetonitrila 0.5% ácido fórmico, D: metanol: água (86:12, v/v) 0.5% ácido fórmico, injeção da amostra: 20  $\mu$ L, concentração da amostra 10 mg/ml, vazão 0.7 ml/min, Gradiente (4). (A): *L. brasiliense*; (B): *S. adstringens*; (C): *T. catigua*; (D): *G. ulmifolia*.

**Conclusão**

A metodologia de UHPLC foi desenvolvida com base em artigos já publicados, utilizando uma coluna HILIC, permitindo a separação dos compostos das frações aquosas testadas, que são frações que são ricas em proantocianidinas. As metodologias tanto de UHPLC quanto de UHPLC-MS/MS precisam de ajustes a fim de melhorar a separação das substâncias.

**Referências\***

- Buszewski, B., Noga, S.J., 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402, 231-247.
- Luca, S.V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoai, A.C., Trifan, A., 2020. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Clinical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, 626-659.
- Neilson, A.P., O'Keefe, S.F., Bolling, B.W., 2016. High-molecular-weight proanthocyanidins in foods: Overcoming analytical challenges in pursuit of novel dietary bioactive components. *Annual Review of Food Science and Technology* 7, 43-64.
- Rauf, A., Imran, M., Abu-Izneid, T., Patel, S., Pan, X., Naz, S., Silva, A.S., Saeed, F., Suleria, H.A.R., 2019. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 116, 108999.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1094-1117.
- Symma, N., Sendker, J., Petereit, F., Hensel, A., 2020. Multistep analysis of Diol-LC-ESI-HRMS data reveals proanthocyanidin composition of complex plant extracts (PAComics). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 8040-8049.

\*Referências bibliográficas formatadas segundo as normas da Revista Brasileira de Farmacognosia