

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

NÍVEA CRISTINA VIEIRA NEVES

***CAMPOMANESIA LINEATIFOLIA* RUIZ & PAV.: CARACTERIZAÇÃO  
FITOQUÍMICA, ESTUDOS MECANÍSTICOS DA ATIVIDADE  
GASTROPROTETORA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-  
*HELICOBACTER PYLORI***

Belo Horizonte

2021

NÍVEA CRISTINA VIEIRA NEVES

***Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav.: caracterização fitoquímica, estudos  
mecanísticos da atividade gastroprotetora e avaliação da atividade anti-  
*Helicobacter pylori***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho  
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Belo Horizonte

2021

N511c Neves, Nívea Cristina Vieira.  
*Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav.: caracterização fitoquímica, estudos mecanísticos da atividade gastroprotetora e avaliação da atividade *anti-Helicobacter pylori* / Nívea Cristina Vieira Neves. – 2021. 218 f. : il.

Orientadora: Rachel Oliveira Castilho.  
Coorientador: Marcelo Vidigal Caliari.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Estômago – Úlcera – Teses. 2. Úlcera gástrica – Teses. 3. Inflamação – Teses. 3. *Helicobacter pylori* – Teses. 4. Plantas medicinais – Teses. 5. Química vegetal – Teses. I. Castilho, Rachel Oliveira. II. Caliari, Marcelo Vidigal. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### FOLHA DE APROVAÇÃO

*"Campomanesia lineatifolia Ruiz & Pav.: caracterização fitoquímica, estudos mecanísticos da atividade gastroprotetora e avaliação da atividade anti-H. pylori"*

**NÍVEA CRISTINA VIEIRA NEVES**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza  
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Fábio de Sousa Menezes Boylan  
Trinity College

Prof. Dr. Renes de Resende Machado  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho - Orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 13 de setembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Vidigal Caliari, Professor do Magistério Superior**, em 13/09/2021, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Dias Fernandes, Usuário Externo**, em 13/09/2021, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Fabio de Sousa Menezes Boylan, Usuário Externo**, em 13/09/2021, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Bianco de Souza, Usuário Externo**, em 14/09/2021, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Oliveira Castilho, Professora do Magistério Superior**, em 14/09/2021, às 19:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0951187** e o código CRC **6BA8C7F2**.

---

*Aos meus maiores amores, Luciano, Flavinha e Pedro.*

*Sem vocês, essa conquista não teria sido possível.*

*É por vocês que sonho construir um mundo melhor!*

## AGRADECIMENTOS

À professora Rachel Castilho, que me recebeu de braços abertos (literalmente) e que me despertou a paixão pelo mundo maravilhoso das PICs. Obrigada por tanto, professora, sem seu apoio e energia este trabalho não seria possível. Minha gratidão a esses quatro anos de trabalho.

Ao professor Marcelo Caliar, por aceitar a co-orientação do trabalho e por se dedicar integralmente aos ensinamentos dos estudos morfométricos e histopatológicos. Quanto aprendido!

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida para meu doutoramento sanduíche na Irlanda, que me proporcionou experiências acadêmicas, científicas e culturais como nunca imaginei ser possível.

Ao professor Fabio Boylan, pelo acolhimento, orientação e amizade ao longo do ano em que estive na Irlanda. Você é inspiração máxima de profissional e exemplo de ser humano. Que privilégio ter te conhecido!

Aos professores Niko Radulović, da *Faculty of Sciences and Mathematics - Department of Chemistry - University of Niš, Serbia* e Wirginia Kukula-Koch, *Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, Poland* pelas colaborações nas identificações das substâncias químicas na planta.

À professora Sinéad Smith pelo entusiasmo e colaboração nos ensaios *in vitro* da atividade anti-*Helicobacter pylori*.

Em especial, agradeço ao Laboratório de Farmacognosia e Homeopatia, nosso GnosiaH, pelo suporte e exemplo de equipe. Vamos em frente!

Às “Jus” da minha vida, Juliana Almeida e Juliana Amorim, e, minha querida Letícia. Não tenho palavras para descrever tamanha amizade e carinho que tenho por vocês. Vocês me deram às mãos e caminharam comigo quando mais precisei.

À minha querida filha científica, Morgana Melo, que foi minha grande parceira em todos os momentos. Às longas noites de experimentos, aos bate-papos intermináveis, à companhia, à amizade, ao carinho, à cumplicidade. O que seria de mim sem você? Esse é o fruto do nosso trabalho em equipe e de toda dedicação. O meu muito obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais pela formação acadêmica e apoio.

Aos professores colaboradores deste trabalho e seus respectivos alunos, profa Lirlândia e Bella, prof. Renes e Alysson e Prof. Carlos Tagliati e Larissa. Aos colaboradores do laboratório de Zoopatologia do ICB/UFMG, Ruth e Fabrício, agradeço as colaborações nos estudos morfométricos e histológicos.

E, por fim, agradeço imensamente aos meus familiares, que souberam entender todas as minhas ausências ao longo dessa jornada. Mamãe Izaura, minha maior inspiração de mulher batalhadora e guerreira; minha sogra Lúcia Helena, por todo apoio de sempre. Ao Luciano, meu grande parceiro e amor de toda uma vida, e aos meus petitzinhos que são a minha maior riqueza, Flavinha e Pedro. Vocês me fazem uma pessoa melhor!

*Quebra, quebra gabirola*  
*Quero ver quebrar*  
*Quebra lá, que eu quebro cá*  
*Quero ver quebrar*  
*(Folclore)*

## RESUMO

*Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. (Myrtaceae) é uma espécie nativa comestível encontrada na Floresta Amazônica, comumente conhecida como gabioba. No Brasil, espécies de *Campomanesia* são frequentemente usadas na medicina tradicional para distúrbios gastrointestinais. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram elevado teor de fenóis e alta atividade antioxidante para o extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*, sugerindo relação de sua utilização etnofarmacológica como antidiarreico, antiúlcera gástrica e cicatrizante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a fitoquímica, a atividade gastroprotetora, anti-inflamatória e anti-*Helicobacter pylori* de *C. lineatifolia* e contribuir para sua padronização químico-biológica. Para isso, foi desenvolvido método extrativo otimizado para obtenção de extrato enriquecido em fenólicos e método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência para avaliação qualitativa e quantitativa desse extrato. Na sequência, utilizou-se a cromatografia em contracorrente de alta velocidade e métodos espectroscópicos para isolar e caracterizar as substâncias químicas presentes no extrato otimizado. Análise por cromatografia gasosa-espectro de massas foi utilizada para identificação das substâncias químicas presentes no óleo essencial. Para avaliação das atividades gastroprotetora, anti-inflamatória e anti-*H. pylori*, foram realizados ensaios *in vivo* em modelos experimentais de úlcera gástrica e ensaios *in vitro*. Os resultados do planejamento extrativo permitiram selecionar o extrato etanólico obtido por sistema de refluxo como aquele enriquecido em fenólicos. Análises obtidas por cromatografia líquida-espectro de massas e ressonância magnética nuclear em  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  permitiram identificar 15 substâncias químicas no extrato etanólico otimizado, das quais 12 delas são inéditas para a espécie, sendo os flavonoides quercitrina e miricitrina as substâncias majoritárias, e a quercitrina selecionada como marcador para o desenvolvimento do método analítico. Já no óleo essencial, foram identificadas 8 substâncias químicas, representando um total de 98,09%, sendo o 3-hexen-1-ol (46,15%) e o  $\alpha$ -cadinol (20,35%) os constituintes majoritários. Ensaio *in vivo* em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol demonstrou que o extrato protegeu o estômago de camundongos, nas doses de 100 e 250 mg/Kg, e promoveu um aumento do muco gástrico. No modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina, os animais tratados com o extrato apresentaram redução das citocinas inflamatórias CXCL-1 e IL-6, além da inibição da via do NF- $\kappa$ B no tecido gástrico. Ensaio *in vitro* em células THP-1 estimuladas por LPS mostraram que o extrato e substâncias isoladas, quercitrina e miricitrina, foram capazes de reduzir TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B. Ensaio *in vitro* de atividade anti-*H. pylori* demonstraram que o extrato etanólico foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de cepas comerciais (MIC 0,49  $\mu\text{g/mL}$ ) e clínicas (MIC 125-250  $\mu\text{g/mL}$ ). Ainda, o óleo essencial também apresentou atividade anti-*H. pylori*, na menor concentração testada (MIC 0,6%) em cepas comerciais e isolados clínicos. Como conclusão, o extrato de *C. lineatifolia* foi otimizado e padronizado quimicamente e os ensaios *in vitro* e *in vivo*, sugerem uma relação mecanística da gastroproteção à atividade anti-inflamatória e estimuladora de muco protetor mucosal, além da atividade antibacteriana anti-*H. pylori*. Isto abre perspectivas para um fitoterápico como nova opção terapêutica para pacientes com úlcera gástrica, tendo em vista que os protocolos atuais de manejo clínico não contam com fármacos que apresentem estas atividades farmacológicas em associação.

**Palavras-chave:** *Campomanesia lineatifolia*; úlcera gástrica; atividade anti-inflamatória; *Helicobacter pylori*.

## ABSTRACT

*Campomanesia lineatifolia* Ruiz and Pav. (Myrtaceae) is an edible native species found in the Amazon Rainforest, popularly known as gabioba. In Brazil, *Campomanesia* species are traditionally used for medicinal purposes such as gastrointestinal disorders. Previous studies conducted by our research group demonstrated high phenolic content and high antioxidant activity for *C. lineatifolia* ethanolic extract, suggesting a relation with its ethnopharmacological use as antidiarrheal, gastric ulcer and healing. The objective of this study was to evaluate the phytochemistry, gastroprotective, anti-inflammatory, and anti-*Helicobacter pylori* activities of *C. lineatifolia*, and to contribute to its chemical-biological standardization. For this, an optimized extractive method was developed to obtain a phenolic-enriched extract, and an analytical method by ultra-performance liquid chromatography for qualitative and quantitative evaluation. Next, high-speed countercurrent chromatography and spectroscopic methods were respectively used to isolate and characterize chemical compounds in optimized extract. Gas chromatography-mass spectrometry analysis was used to identify the chemicals present in the essential oil. To evaluate the gastroprotective, anti-inflammatory and anti-*H. pylori* activities, *in vivo* assays were performed in experimental gastric ulcer models, and *in vitro* assays. Results of the extractive planning allowed selecting the ethanolic extract obtained by reflux system as the one enriched in phenolics. Analyzes obtained by liquid chromatography-mass spectrum and nuclear magnetic resonance in  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  allowed the identification of 15 chemical compounds in the optimized ethanolic extract, of which 12 were new for the species, with the flavonoids quercitrin and myricitrin being the major substances, thus being quercitrin selected as a marker for the development of the analytical method. In the essential oil analysis, 8 chemicals were identified, representing a total of 98.09%, with 3-hexen-1-ol (46.15%) and  $\alpha$ -cadinol (20.35%) being the major constituents. *In vivo* assay in ethanol-induced ulcer model demonstrated that the extract protected the stomach of mice, at doses of 100 and 250 mg/Kg, and promoted an increase in gastric mucus. In indomethacin-induced ulcer model, mice treated with the extract showed a reduction of the inflammatory cytokines CXCL-1 and IL-6, and inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in gastric tissue. *In vitro* assays in LPS-stimulated THP-1 cells showed that the extract and isolated compounds, quercitrin and myricitrin, were able to reduce TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B. *In vitro* anti-*H. pylori* activity assays showed that the ethanolic extract was able to inhibit bacterial growth of commercial (0.49  $\mu\text{g/mL}$ ) and clinical (125-250  $\mu\text{g/mL}$ ) strains. Furthermore, the essential oil also showed anti-*H. pylori* activity at the lowest concentration tested (0.6%) in commercial and clinical isolated strains. In conclusion, the *C. lineatifolia* extract was chemically optimized and standardized, and the *in vitro* and *in vivo* assays suggest a mechanistic relationship between gastroprotection and anti-inflammatory activity, and mucosal protective mucus stimulator, in addition to anti-*H. pylori* activity. This opens perspectives for an herbal medicine as new therapeutic option for patients with gastric ulcers, considering that current clinical management protocols do not include drugs that have these pharmacological activities in association.

**Keywords:** *Campomanesia lineatifolia*. Gastric ulcer. Antiinflammatory activity. *Helicobacter pylori*.

## LISTA DE FIGURAS

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1 -</b>  | Representação esquemática da inibição da síntese de prostaglandinas pelos AINES.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 29  |
| <b>Figura 2 -</b>  | Diagrama esquemático para o mecanismo de indução das complicações gastrointestinais pelos AINES.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 30  |
| <b>Figura 3 -</b>  | Reação inflamatória e iniciação das respostas imunes.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 33  |
| <b>Figura 4 -</b>  | Produção de citocinas pelas células do epitélio gástrico durante infecção por <i>Helicobacter pylori</i> .....                                                                                                                                                                                                                                             | 34  |
| <b>Figura 5 -</b>  | Diagrama representativo da lesão gástrica induzida pelo etanol.....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 36  |
| <b>Figura 6 -</b>  | Algumas substâncias químicas isoladas de espécies de <i>Campomanesia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 41  |
| <b>Figura 7 -</b>  | <i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz & Pav. 1) Tronco e folhas; 2) Flores; 3) Formação do fruto; 4) Frutos; 5) Frutos em diferentes estágios de maturidade; 6) Frutos maduros para consumo.....                                                                                                                                                           | 44  |
| <b>Figura 8 -</b>  | Fluxograma dos métodos extrativos por maceração (por ultrassom ou agitação eletromagnética) e por sistema de refluxo da droga vegetal de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                            | 58  |
| <b>Figura 9 -</b>  | Fluxograma da partição líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico obtido por maceração por banho de ultrassom da droga vegetal de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                    | 60  |
| <b>Figura 10 -</b> | Fluxograma da partição líquido-líquido com acetato de etila do extrato etanólico obtido por maceração por banho de ultrassom da droga vegetal de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                    | 61  |
| <b>Figura 11 -</b> | Fluxograma da extração sólido-líquido com acetato de etila do extrato etanólico obtido por maceração em banho de ultrassom da droga vegetal de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                      | 62  |
| <b>Figura 12 -</b> | Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, em 210 nm, para os extratos obtidos com os diferentes solventes utilizados na extração da droga vegetal de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                | 69  |
| <b>Figura 13 -</b> | Espectros no UV dos picos majoritários A, B e C obtidos nos cromatogramas em CLAE-FR., dos extratos de <i>Campomanesia lineatifolia</i> com diferentes solventes e misturas de solventes.....                                                                                                                                                              | 74  |
| <b>Figura 14 -</b> | Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>Campomanesia lineatifolia</i> obtido por CLUE, em comprimento de onda de 210 nm.....                                                                                                                                                                                                                      | 81  |
| <b>Figura 15 -</b> | Características estruturais das flavonas e flavonóis e seus respectivos grupos benzoíla e cinamoíla.....                                                                                                                                                                                                                                                   | 82  |
| <b>Figura 16 -</b> | Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>Campomanesia lineatifolia</i> obtido por CLUE, em comprimento de onda de 270 nm.....                                                                                                                                                                                                                      | 82  |
| <b>Figura 17 -</b> | Perfis cromatográficos dos extratos e fração otimizados de <i>Campomanesia lineatifolia</i> , obtidos por CLUE, em comprimento de onda de 270 nm.....                                                                                                                                                                                                      | 83  |
| <b>Figura 18 -</b> | Cromatogramas obtidos por CLUE-UV/DAD (335 nm) para o extrato etanólico de <i>Campomanesia lineatifolia</i> , nas condições cromatográficas A, B e C.....                                                                                                                                                                                                  | 97  |
| <b>Figura 19 -</b> | Cromatogramas obtidos por CLUE-UV/DAD (335 nm) para o extrato etanólico de <i>Campomanesia lineatifolia</i> , nas condições cromatográficas D, E, F e G.....                                                                                                                                                                                               | 99  |
| <b>Figura 20 -</b> | Cromatogramas obtidos por CLUE-UV/DAD (335 nm) para o extrato etanólico de <i>Campomanesia lineatifolia</i> , nas condições cromatográficas H, I, J e K.....                                                                                                                                                                                               | 100 |
| <b>Figura 21 -</b> | Espectros no UV comparados do extrato etanólico obtido por Barbosa (2009) (A), extratos etanólicos obtidos por maceração auxiliada por ultrassom (US) e por sistema contínuo de refluxo (R) de <i>Campomanesia lineatifolia</i> , em CLAE (B) e CLUE (C) (270 nm), respectivamente e padrões autênticos de catequina e quercitrina, ambos em CLUE (D)..... | 115 |
| <b>Figura 22 -</b> | Estrutura química da catequina (A) e padrão de absorção no ultravioleta-visível (B).....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 115 |
| <b>Figura 23 -</b> | Sobreposição dos cromatogramas (A) e espectros no UV (B) do padrão autêntico de quercitrina, extrato EtOH R etanólico e quercitrina + extrato EtOH R de <i>Campomanesia lineatifolia</i> , em CLUE (335 nm).....                                                                                                                                           | 116 |
| <b>Figura 24 -</b> | Análises preliminares em cromatografia em camada delgada, para o extrato etanólico otimizado de <i>C. lineatifolia</i> . A – G: diferentes misturas de solventes.....                                                                                                                                                                                      | 118 |
| <b>Figura 25 -</b> | Perfil dos constituintes químicos presentes no extrato etanólico otimizado de <i>C. lineatifolia</i> em Cromatografia em Camada Delgada, sob luz ultravioleta.....                                                                                                                                                                                         | 118 |
| <b>Figura 26 -</b> | Análises preliminares em cromatografia em camada delgada, para o extrato etanólico otimizado de <i>C. lineatifolia</i> . A – C: diferentes misturas de solventes.....                                                                                                                                                                                      | 119 |
| <b>Figura 27 -</b> | Perfil cromatográfico por CLAE (280 nm) para o extrato etanólico otimizado de <i>Campomanesia lineatifolia</i> (A) e suas frações polar (B) e apolar (C), obtidas por sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água 1:1:1:1 v/v. Condições cromatográficas vide item 5.2.9.....                                                             | 122 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 28 -</b> | Protocolo de fracionamento seletivo para o extrato etanólico otimizado de <i>Campomanesia lineatifolia</i> por combinação de sistema de solvente HAMAg.....                                                                                                 | 123 |
| <b>Figura 29 -</b> | Perfil das substâncias químicas presentes na fração polar obtida a partir do extrato etanólico otimizado de <i>C. lineatifolia</i> em Cromatografia em Camada Delgada, solubilizado em diferentes misturas de solventes (A – D).....                        | 123 |
| <b>Figura 30 -</b> | Perfil das substâncias químicas presentes na fração apolar obtida a partir do extrato etanólico otimizado de <i>C. lineatifolia</i> em Cromatografia em Camada Delgada, solubilizado em diferentes misturas de solventes (A – D).....                       | 124 |
| <b>Figura 31 -</b> | Cromatografia em camada delgada das 80 frações obtidas em 3 diferentes separações por HSCCC, a partir da fração polar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                     | 125 |
| <b>Figura 32 -</b> | Cromatografia em camada delgada das frações reunidas obtidas por HSCCC, a partir da fração polar do extrato etanólico otimizado EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                      | 126 |
| <b>Figura 33 -</b> | Cromatografia em camada delgada das 50 frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular, em coluna de Sephadex LH-20, a partir da fração E (A e B) e G (C e D) da fração polar do extrato etanólico otimizado EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> ..... | 127 |
| <b>Figura 34 -</b> | Cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia por exclusão molecular, das junções E (E1 a E8) e G (G1 a G5).....                                                                                                                    | 128 |
| <b>Figura 35 -</b> | Substância 5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavonol-3-O-ramnosídeo (quercitrina) isolada do extrato etanólico das folhas de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                   | 128 |
| <b>Figura 36 -</b> | Espectro do íon de segunda geração obtido para o íon precursor da substância E ( <i>m/z</i> 447), obtidos em EM-EM.....                                                                                                                                     | 129 |
| <b>Figura 37 -</b> | Espectro de 1H-RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância E (quercitrina), isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                | 132 |
| <b>Figura 38 -</b> | Expansões do espectro de 1H-RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                  | 133 |
| <b>Figura 39 -</b> | Espectro de 13C-RMN (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                              | 134 |
| <b>Figura 40 -</b> | Espectro DEPT 135° (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                               | 134 |
| <b>Figura 41 -</b> | Mapa de correlação heteronuclear HSQC (1H x 13C) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                         | 135 |
| <b>Figura 42 -</b> | Mapa de correlação heteronuclear HMBC (1H x 13C) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                         | 136 |
| <b>Figura 43 -</b> | Mapa de correlação homonuclear COSY (1H x 1H) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                            | 137 |
| <b>Figura 44 -</b> | Sólido amarelo (substância E, quercitrina) isolado e purificado do extrato etanólico das folhas de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                   | 137 |
| <b>Figura 45 -</b> | Perfil cromatográfico em CLAE (335 nm) para quercitrina isolada (A) a partir da fração polar do extrato etanólico otimizado (B). Condições cromatográficas: vide item 5.2.9.....                                                                            | 138 |
| <b>Figura 46 -</b> | Substância 5,7,3',4',5'-pentahidroxi-flavonol-3-O-ramnosídeo (miricitrina) isolada e identificada no extrato etanólico das folhas de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                 | 138 |
| <b>Figura 47 -</b> | Espectros dos íons de segunda geração obtidos para o íon precursor da substância G4, obtidos em EM-EM.....                                                                                                                                                  | 141 |
| <b>Figura 48 -</b> | Espectro de 1H-RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância G4 (miricitrina), isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                               | 141 |
| <b>Figura 49 -</b> | Expansões do espectro de 1H-RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância G4 (miricitrina), isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                  | 142 |
| <b>Figura 50 -</b> | Espectro de 13C-RMN (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                             | 143 |
| <b>Figura 51 -</b> | Espectro DEPT 135° (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                              | 143 |
| <b>Figura 52 -</b> | Mapa de correlação heteronuclear HSQC (1H x 13C) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                        | 144 |
| <b>Figura 53 -</b> | Mapa de correlação heteronuclear HMBC (1H x 13C) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                        | 144 |
| <b>Figura 54 -</b> | Mapa de correlação homonuclear COSY (1H x 1H) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                           | 145 |
| <b>Figura 55 -</b> | Sólido amarelo-dourado (substância G4, miricitrina) isolado e purificado do extrato etanólico das folhas de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                          | 145 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 56 -</b> | Perfil cromatográfico em CLAE (335 nm) para miricitrina isolada (A) a partir da fração polar do extrato etanólico otimizado (B). Condições cromatográficas: vide item 5.2.9.....                                                                                                                                                                                  | 146 |
| <b>Figura 57 -</b> | Perfil cromatográfico em CLAE (280 nm) das substâncias químicas presentes no chá da droga vegetal (A), extrato etanólico otimizado (B) e fração polar obtida a partir da extração seletiva por sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água 1:1:1:1 v/v (C) de <i>Campomanesia lineatifolia</i> . Condições cromatográficas: vide item 5.2.9..... | 147 |
| <b>Figura 58 -</b> | Cromatografia em camada delgada das 80 frações obtidas em duas diferentes separações por HSCCC, a partir da fração acetato de etila do chá da droga vegetal.....                                                                                                                                                                                                  | 148 |
| <b>Figura 59 -</b> | Cromatografia em camada delgada das 80 frações obtidas em três diferentes separações por HSCCC, a partir da fração apolar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                       | 150 |
| <b>Figura 60 -</b> | Cromatografia em camada delgada das frações reunidas obtidas por HSCCC, a partir da fração apolar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                               | 151 |
| <b>Figura 61 -</b> | Cromatografia em camada delgada das frações reunidas 7 a 10, obtidas por HSCCC, a partir da fração apolar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                       | 152 |
| <b>Figura 62 -</b> | Cromatograma do pico base no modo positivo das frações 8 (A) e 9 (B) da fração apolar da extração seletiva do EtOH R de <i>Campomanesia lineatifolia</i> por sistema de solventes HAMAg em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para condições cromatográficas, vide item 5.2.11.....                                                                        | 152 |
| <b>Figura 63 -</b> | Estruturas químicas das substâncias identificadas na fração 8 obtida a partir da separação por HSCCC da fração apolar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                           | 154 |
| <b>Figura 64 -</b> | Estruturas químicas das substâncias identificadas na fração 9 obtida a partir da separação por HSCCC da fração apolar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                           | 156 |
| <b>Figura 65 -</b> | Cromatografia em camada delgada das substâncias químicas isoladas da fração 10 obtida a partir da fração apolar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                 | 159 |
| <b>Figura 66 -</b> | Estrutura química das $\beta$ -triketonas (A): leptospermona (B) e isoleptospermona (C), identificadas na fração apolar do extrato etanólico otimizado das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                 | 159 |
| <b>Figura 67 -</b> | Cromatografia em camada delgada das cinco frações agrupadas (A), obtidas da fração polar do EtOH R, resultantes da CCC em sistema de solventes Hex-EtOH-H <sub>2</sub> O (4:2:2), em modo de eluição isocrático. (B) Substâncias isoladas das frações C e D, após cromatografia em placa preparativa.....                                                         | 161 |
| <b>Figura 68 -</b> | Cromatografia em camada delgada das três subfrações B1, B2 e B3 agrupadas, obtidas da fração B do extrato EtOH R (fração polar) resultantes da CCC em sistema de solventes EtOAc-H <sub>2</sub> O (1:1), em modo de eluição isocrático.....                                                                                                                       | 162 |
| <b>Figura 69 -</b> | Cromatografia em camada delgada das subfrações resultantes da purificação da subfração B1, obtidas da CCC em sistema de solventes AcOEt- <i>n</i> -BuOH-H <sub>2</sub> O (X:Y:10), em modo gradiente de eluição.....                                                                                                                                              | 162 |
| <b>Figura 70 -</b> | Cromatograma do pico base no modo negativo das subfrações B2 (A) e B3 (B) da fração polar da extração seletiva do EtOH R de <i>Campomanesia lineatifolia</i> por sistema de solventes HAMAg em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para condições cromatográficas, vide item 5.2.11.....                                                                    | 163 |
| <b>Figura 71 -</b> | Estruturas químicas das substâncias identificadas nas frações B2 e B3 obtidas a partir da separação por HSCCC da fração polar do extrato EtOH R de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                   | 165 |
| <b>Figura 72 -</b> | Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de <i>C. lineatifolia</i> , em cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas.....                                                                                                                                                                                                                    | 177 |
| <b>Figura 73 -</b> | Estruturas químicas das substâncias identificadas no óleo essencial de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                               | 178 |
| <b>Figura 74 -</b> | Protocolo de indução da lesão gástrica induzida por etanol em modelo experimental <i>in vivo</i> para extrato etanólico rico em fenólicos de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                               | 188 |
| <b>Figura 75 -</b> | Protocolo de indução da lesão gástrica induzida por indometacina em modelo experimental <i>in vivo</i> para extrato etanólico rico em fenólicos de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                         | 189 |
| <b>Figura 76 -</b> | Imunoblot das proteínas P-I $\kappa$ B $\alpha$ e P-Erk1/2, em diferentes concentrações do extrato etanólico rico em fenólicos de <i>C. lineatifolia</i> . Legenda: U, célula não tratada; LP, lipopolissacarídeo; C1, 62,5 $\mu$ g/mL; C2, 62,5 $\mu$ g/mL e C3, 250 $\mu$ g/mL; Dex, dexametasona.....                                                          | 194 |
| <b>Figura 77 -</b> | Imunoblot da proteína fosforilada P-I $\kappa$ B $\alpha$ no tecido gástrico de modelo de lesão induzida por indometacina, após tratamento com o extrato etanólico rico em fenólicos de <i>C. lineatifolia</i> na dose de 250 mg/Kg. Legenda: BNE, banda não específica.....                                                                                      | 195 |
| <b>Figura 78 -</b> | Fotomicrografia de estômago de camundongo. (A) Grupo controle veículo. Mucosa gástrica de aspecto normal. (B) Grupo etanol. Notar a presença de ampla zona de necrose gástrica (setas). (C) Imagem representativa dos grupos tratados com cimetidina, extrato 50 e 100 mg/Kg. Zona de necrose menor do que a da imagem anterior (setas). (D) Imagem               |     |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|                    | representativa dos grupos tratados com sucralfato e extrato 200 mg/Kg. Pequena área de necrose (seta). Hematoxilina e Eosina. Barra 100 µm.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 197 |
| <b>Figura 79 -</b> | Fotomicrografia de estômago de camundongo. <b>(A)</b> Grupo controle veículo. Mucosa gástrica corada pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) de aspecto normal. <b>(B)</b> Imagem representativa dos grupos etanol e tratado com cimetidina. Notar a redução significativa de áreas PAS <sup>+</sup> (setas). <b>(C)</b> Imagem representativa dos grupos tratados com sucralfato e extrato 50 mg/Kg. Regiões PAS <sup>+</sup> (setas). <b>(D)</b> Imagem representativa dos grupos tratados com extrato 100 e 200 mg/Kg. Observar aumento visível de regiões PAS <sup>+</sup> . Ácido Periódico de Schiff (PAS). Barra 100 µm..... | 198 |
| <b>Figura 80 -</b> | Mecanismo proposto para atividade anti-inflamatória e gastroprotetora do extrato etanólico rico em fenólicos das folhas de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 200 |

## LISTA DE TABELAS

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1 -</b>  | Agentes atualmente aprovados para o manejo das úlceras pépticas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 37  |
| <b>Tabela 2 -</b>  | Substâncias/classes químicas identificadas e/ou isoladas e atividades biológicas de espécies do gênero <i>Campomanesia</i> .....                                                                                                                                                                                                                             | 42  |
| <b>Tabela 3 -</b>  | Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE dos extratos brutos e frações obtidos por diferentes solventes, a partir da droga vegetal de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                             | 63  |
| <b>Tabela 4 -</b>  | Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLUE-DAD dos extratos otimizados ricos em fenólicos selecionados, obtidos da droga vegetal de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                 | 64  |
| <b>Tabela 5 -</b>  | Planejamento experimental proposto para avaliação de diferentes métodos extrativos e solventes/mistura de solventes, na obtenção de extratos enriquecidos em fenólicos, a partir da droga vegetal de folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                  | 86  |
| <b>Tabela 6 -</b>  | Condições cromatográficas (A-P) por CLUE para o desenvolvimento do método analítico para quantificação das substâncias de interesse em extrato etanólico de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                     | 94  |
| <b>Tabela 7 -</b>  | Dados do espectro de <sup>13</sup> C-RMN (125 mHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) e <sup>1</sup> H-RMN (400 mHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) para a substância E, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                   | 130 |
| <b>Tabela 8 -</b>  | Dados do espectro de <sup>13</sup> C-RMN (125 mHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) e <sup>1</sup> H-RMN (400 mHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) para a substância G4, isolada do extrato etanólico das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                  | 139 |
| <b>Tabela 9 -</b>  | Substâncias químicas identificadas a partir da espectrometria de massa por desreplicação utilizando CLAE-ESI-Q-TOF-EM a partir da fração apolar do extrato etanólico otimizado das folhas de <i>C. lineatifolia</i> . Para condições cromatográficas, vide item 5.2.11.....                                                                                  | 153 |
| <b>Tabela 10 -</b> | Descrição das condições cromatográficas em HSCCC e rendimentos de massa das frações obtidas a partir da fração polar do extrato etanólico de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                          | 160 |
| <b>Tabela 11 -</b> | Substâncias químicas identificadas a partir das frações obtidas de HSCCC em sistema de eluição isocrático e gradiente, da fração polar do extrato etanólico otimizado das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                             | 164 |
| <b>Tabela 12 -</b> | Substâncias químicas identificadas no óleo essencial das folhas de <i>C. lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                              | 178 |
| <b>Tabela 13 -</b> | Concentração inibitória mínima (CIM) para as amostras de <i>Campomanesia lineatifolia</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> . Concentrações testadas: extrato etanólico rico em fenólicos (EtOH R), fração polar e fração apolar 1000-0,49 µg/mL; miricitrina e miricitrina+quercitrina 250-0,12 µg/mL; óleo essencial 2,5-0,6% e chá 1:10, 1:50, 1:100..... | 208 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Gráfico 1 -</b>  | Rendimentos extrativos (m/m) dos extratos de <i>Campomanesia lineatifolia</i> obtidos por maceração auxiliada por banho ultrassônico, empregando-se diferentes solventes extratores.....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 66  |
| <b>Gráfico 2 -</b>  | Rendimentos extrativos (m/m) das frações obtidas por extração com extrato etanólico seco de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 67  |
| <b>Gráfico 3 -</b>  | Áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada extrato de <i>Campomanesia lineatifolia</i> com diferentes solventes e mistura de solventes extratores.....                                                                                                                                                                                                                                 | 77  |
| <b>Gráfico 4 -</b>  | Áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada fração de partições realizadas com o extrato etanólico seco de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                       | 78  |
| <b>Gráfico 5 -</b>  | Somatório das áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada extrato de <i>Campomanesia lineatifolia</i> com diferentes solventes e mistura de solventes extratores.....                                                                                                                                                                                                                   | 79  |
| <b>Gráfico 6 -</b>  | Somatório das áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada fração de partições realizadas com o extrato etanólico seco de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                                         | 79  |
| <b>Gráfico 7 -</b>  | Somatório das áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLUE (270 nm), das substâncias flavonoídicas majoritárias selecionadas (1 a 5) para os extratos e fração otimizados de <i>Campomanesia lineatifolia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                | 84  |
| <b>Gráfico 8 -</b>  | Área dos picos das substâncias majoritárias (picos de 1 a 5) de extratos de <i>C. lineatifolia</i> obtidos por CLUE-UV/DAD em diferentes métodos e solventes extrativos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 87  |
| <b>Gráfico 9 -</b>  | Avaliação dos métodos extrativos em extratos de <i>C. lineatifolia</i> , em função da área do cromatograma obtido por CLUE-UV/DAD, para a substância 3 (pico 3).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 87  |
| <b>Gráfico 10 -</b> | Avaliação dos métodos extrativos em extratos de <i>C. lineatifolia</i> , em função da área do cromatograma obtido por CLUE-UV/DAD, para a substância 5 (pico 5).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 88  |
| <b>Gráfico 11 -</b> | Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e pré-tratamento com o extrato etanólico rico em fenólicos de <i>C. lineatifolia</i> em diferentes concentrações (62,5; 125 e 250 µg/mL). Cada barra representa a média ± desvio padrão da média, <i>One-way</i> ANOVA, com pós-teste Tukey, * <i>p</i> <0,05. Legenda: Ctrl, controle (células não tratadas); Dexa, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.....          | 192 |
| <b>Gráfico 12 -</b> | Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos e substâncias isoladas de <i>C. lineatifolia</i> em diferentes concentrações sob a produção de TNF-α em células THP-1 ativadas por LPS. Cada barra representa a média ± desvio padrão da média, <i>One-way</i> ANOVA, com pós-teste Tukey, <i>p</i> <0,05. Legenda: Ctrl/UT, controle (células não tratadas); Dexa, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata..... | 193 |
| <b>Gráfico 13 -</b> | Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos de <i>C. lineatifolia</i> em diferentes concentrações sob a produção de TNF-α em células THP-1 ativadas por LPS. Cada barra representa a média ± desvio padrão da média, <i>One-way</i> ANOVA, com pós-teste Tukey, <i>p</i> <0,05. Legenda: Ctrl/UT, controle (células não tratadas); Dexa, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.....                        | 193 |
| <b>Gráfico 14 -</b> | Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos de <i>C. lineatifolia</i> sob a via de sinalização do NF-κB, para a proteína P-IκBα e P-Erk1/2 em células THP-1 ativadas por LPS. Cada barra representa a média ± desvio padrão da média, <i>One-way</i> ANOVA, com pós-teste Tukey, <i>p</i> <0,05. Legenda: UT, células não tratadas; Dexa, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.....                       | 194 |
| <b>Gráfico 15 -</b> | Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos de <i>C. lineatifolia</i> sob a produção de IL-6 e CXCL-1, em tecido gástrico do modelo de lesão induzida por indometacina. Cada barra representa a média ± erro padrão da média, <i>One-way</i> ANOVA, com pós-teste Newman-Keuls, <i>p</i> <0,05. (*) representa diferença com o grupo controle e (#) representa diferença com o grupo indometacina. Todo o ensaio foi realizado em triplicata...       | 195 |
| <b>Gráfico 16 -</b> | Área de necrose (A) e de muco (B) da mucosa gástrica em modelo de lesão gástrica induzida por etanol, após tratamento com cimetidina, sucralfato e extrato etanólico rico em fenólicos de <i>C. lineatifolia</i> . Cada barra representa a média ± erro padrão da média, <i>One-way</i> ANOVA, com pós-teste Bonferroni, <i>p</i> <0,05. (a-d) letras distintas diferem estatisticamente.....                                                                          | 197 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                       |                                                               |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| AcOEt:                | Acetato de etila                                              |
| ACN:                  | Acetonitrila                                                  |
| AE:                   | Extração por maceração assistida por agitação eletromagnética |
| AINES:                | Anti-inflamatórios não esteroides                             |
| ANOVA:                | Análise de Variância                                          |
| AOAC:                 | <i>Association of Official Analytical Chemists</i>            |
| ARH <sub>2</sub> :    | Antagonistas do receptor H <sub>2</sub>                       |
| AU:                   | Absorbância                                                   |
| BAFF:                 | Fator de ativação de célula B                                 |
| BHI:                  | <i>Brain Heart Infusion</i>                                   |
| BNE:                  | Banda não específica                                          |
| BSA:                  | Albumina bovina sérica                                        |
| CagA:                 | Fator de virulência                                           |
| Cag PAI:              | Ilha de patogenicidade <i>Cag</i>                             |
| CCC:                  | Cromatografia em contracorrente                               |
| CCD:                  | Cromatografia em camada delgada                               |
| CEG:                  | Célula epitelial gástrica                                     |
| CEUA:                 | Comissão de Ética no Uso de Animais                           |
| CG-EM:                | Cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas   |
| CIM:                  | Concentração inibitória mínima                                |
| CLAE:                 | Cromatografia líquida de alta eficiência                      |
| CLUE:                 | Cromatografia líquida de ultra eficiência                     |
| COX-1:                | Ciclooxigenase 1                                              |
| COX-2:                | Ciclooxigenase 2                                              |
| CXC:                  | Família de quimiocinas                                        |
| DAD:                  | Detector de arranjos de diodos                                |
| DMSO:                 | Dimetilsulfóxido                                              |
| DMSO-D <sub>6</sub> : | Dimetilsulfóxido-deuterado                                    |
| DNA:                  | Ácido desoxirribonucleico                                     |
| DTT:                  | Ditiotreitol                                                  |
| ELISA:                | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>                      |
| EM:                   | Espectrometria de massas                                      |
| EM-EM:                | Espectrometria de massas acoplada                             |
| ESI-EM                | Espectrometria de massas com ionização electrospray           |
| EtOH:                 | Etanol                                                        |
| FI:                   | Fase inferior                                                 |
| FS:                   | Fase superior                                                 |
| GL:                   | Gay-Lussac                                                    |
| GM-CSF:               | Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos      |
| GPS:                  | <i>Global Positioning System</i>                              |
| HAMAg:                | Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água                       |
| HE:                   | Hematoxilina e Eosina                                         |
| HETAB:                | Hexadecil-Trimetil Brometo de Amônia                          |
| HSCCC:                | Cromatografia contracorrente de alta velocidade               |
| IBP:                  | Inibidores da bomba de prótons                                |
| ICAM-1:               | Molécula de adesão intracelular-1                             |
| IFN:                  | Interferon                                                    |
| IκB:                  | Inibidor de NF-κB                                             |
| IL-1β:                | Interleucina-1β                                               |
| IL-2:                 | Interleucina-2                                                |
| IL-6:                 | Interleucina-6                                                |

|                    |                                                                                           |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-8:              | Interleucina-8                                                                            |
| IN:                | Instrução Normativa                                                                       |
| LDL:               | Lipoproteína de baixa densidade                                                           |
| LOX:               | Lipoxigenase                                                                              |
| LPS:               | Lipopolissacarídeo                                                                        |
| MeOH:              | Metanol                                                                                   |
| MCP-1:             | Proteína quimiotática de monócitos-1                                                      |
| MIF:               | Fator inibidor de migração                                                                |
| MIR:               | Miricitrina                                                                               |
| MIR/QUE:           | Miricitrina + Quercitrina                                                                 |
| MPO:               | Mieloperoxidase                                                                           |
| MUC:               | Mucinas gástricas                                                                         |
| MTT:               | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazol                                  |
| NF- $\kappa$ B:    | Fator nuclear kappa B                                                                     |
| NO:                | Óxido nítrico                                                                             |
| OE:                | Óleo essencial                                                                            |
| OMS:               | Organização Mundial da Saúde                                                              |
| pH:                | Potencial hidrogeniônico                                                                  |
| PAF:               | Fator ativador de plaquetas                                                               |
| PAS:               | Ácido periódico de Schiff                                                                 |
| PBS:               | Tampão fosfato-salino                                                                     |
| PG:                | Prostaglandina                                                                            |
| PGE <sub>2</sub> : | Prostaglandina E <sub>2</sub>                                                             |
| PLL:               | Partição líquido-líquido                                                                  |
| PMA:               | 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato                                                       |
| PMSF:              | Fluoreto de fenilmetilsulfonil                                                            |
| PNPIC:             | Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares                               |
| PNPMF:             | Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos                      |
| PSL:               | Partição sólido-líquido                                                                   |
| R:                 | Extração por maceração em sistema de refluxo                                              |
| RDC:               | Resolução da Diretoria Colegiada                                                          |
| RENAME:            | Relação Nacional de Medicamentos Essenciais                                               |
| Rf:                | Fator de retenção                                                                         |
| RMN:               | Ressonância Magnética Nuclear                                                             |
| RPM:               | Rotações por minuto                                                                       |
| RPMI:              | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                                                    |
| SGI:               | Sistema gastrointestinal                                                                  |
| SisGen:            | Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado |
| SUS:               | Sistema Único de Saúde                                                                    |
| TMB:               | Tetrametilbenzidina                                                                       |
| TGF:               | Fator de crescimento tumoral                                                              |
| THP-1:             | Linhagem celular de monócito humano                                                       |
| TMS:               | Tetrametilsilano                                                                          |
| TNF- $\alpha$ :    | Fator de necrose tumoral $\alpha$                                                         |
| TWEAK:             | Fator fraco de indução de apoptose semelhante ao TNF                                      |
| UFMG:              | Universidade Federal de Ouro Preto                                                        |
| UP:                | Úlcera Péptica                                                                            |
| US:                | Extração por maceração assistida por banho de ultrassom                                   |
| UV-DAD:            | Ultravioleta acoplado ao detector de arranjos de diodos                                   |
| UV-VIS:            | Espectrofotometria no ultravioleta/visível                                                |
| WHO:               | <i>World Health Organization</i>                                                          |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>                                                                   | <b>23</b> |
| <b>1.1 Introdução.....</b>                                                                                       | <b>23</b> |
| <b>1.2 Objetivos.....</b>                                                                                        | <b>25</b> |
| 1.2.1 Objetivo geral.....                                                                                        | 25        |
| 1.2.2 Objetivos específicos.....                                                                                 | 25        |
| <b>Referências.....</b>                                                                                          | <b>26</b> |
| <b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                    | <b>28</b> |
| <b>2.1 Úlcera péptica.....</b>                                                                                   | <b>28</b> |
| 2.1.1 Definição e prevalência.....                                                                               | 28        |
| 2.1.2 Uso crônico de anti-inflamatórios não esteroides.....                                                      | 28        |
| 2.1.3 Infecção por <i>Helicobacter pylori</i> .....                                                              | 31        |
| 2.1.4 Mecanismos inflamatórios da úlcera péptica.....                                                            | 32        |
| 2.1.5 Tratamento.....                                                                                            | 36        |
| 2.1.6 Medicina Tradicional.....                                                                                  | 38        |
| <b>2.2 A Família Myrtaceae.....</b>                                                                              | <b>39</b> |
| <b>2.3 O Gênero <i>Campomanesia</i>.....</b>                                                                     | <b>40</b> |
| <b>2.4 <i>Campomanesia lineatifolia</i>.....</b>                                                                 | <b>44</b> |
| <b>Referências.....</b>                                                                                          | <b>46</b> |
| <b>CAPÍTULO 3: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS.....</b>                                          | <b>56</b> |
| <b>3.1 Introdução.....</b>                                                                                       | <b>56</b> |
| <b>3.2 Materiais e métodos.....</b>                                                                              | <b>56</b> |
| 3.2.1 Material vegetal.....                                                                                      | 56        |
| 3.2.2 Obtenção dos extratos.....                                                                                 | 57        |
| 3.2.2.1 Extração por maceração em banho de ultrassom.....                                                        | 57        |
| 3.2.2.2 Extração contínua em sistema de refluxo.....                                                             | 58        |
| 3.2.2.3 Extração por maceração em agitação eletromagnética.....                                                  | 59        |
| 3.2.2.4 Extração líquido-líquido a partir do extrato etanólico seco.....                                         | 59        |
| 3.2.2.5 Extração sólido-líquido a partir do extrato etanólico seco.....                                          | 61        |
| 3.2.3 Análise cromatográfica por CLAE/DAD.....                                                                   | 62        |
| 3.2.4 Análise cromatográfica por CLUE/DAD.....                                                                   | 63        |
| 3.2.5 Análise estatística.....                                                                                   | 64        |
| <b>3.3 Resultados e discussão.....</b>                                                                           | <b>65</b> |
| <b>3.4 Conclusões.....</b>                                                                                       | <b>88</b> |
| <b>Referências.....</b>                                                                                          | <b>89</b> |
| <b>CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS NO EXTRATO.....</b> | <b>92</b> |
| <b>4.1 Introdução.....</b>                                                                                       | <b>92</b> |

|            |                                          |            |
|------------|------------------------------------------|------------|
| <b>4.2</b> | <b>Materiais e métodos.....</b>          | <b>93</b>  |
| 4.2.1      | Desenvolvimento do método analítico..... | 93         |
| <b>4.3</b> | <b>Resultados e discussão.....</b>       | <b>95</b>  |
| <b>4.4</b> | <b>Conclusões.....</b>                   | <b>102</b> |
|            | <b>Referências.....</b>                  | <b>102</b> |

## **CAPÍTULO 5: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NO EXTRATO..... 104**

|            |                                                                                                                                                                         |            |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.1</b> | <b>Introdução.....</b>                                                                                                                                                  | <b>104</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Materiais e Métodos.....</b>                                                                                                                                         | <b>105</b> |
| 5.2.1      | Material vegetal e obtenção do extrato bruto                                                                                                                            |            |
| 5.2.2      | Fracionamento do extrato bruto por sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água.....                                                                    | 105        |
| 5.2.3      | Extração por infusão e partição líquido-líquido.....                                                                                                                    | 106        |
| 5.2.4      | Cromatografia em camada delgada.....                                                                                                                                    | 106        |
| 5.2.5      | Cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC).....                                                                                                         | 107        |
| 5.2.6      | Otimização da Cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC) para a fração polar.....                                                                       | 108        |
| 5.2.7      | Cromatografia por exclusão molecular.....                                                                                                                               | 110        |
| 5.2.8      | Cromatografia em camada delgada preparativa.....                                                                                                                        | 110        |
| 5.2.9      | Análises por CLAE do extrato bruto e frações polar e apolar do sistema HAMAg.....                                                                                       | 111        |
| 5.2.10     | Análise por RNM das substâncias isoladas.....                                                                                                                           | 111        |
| 5.2.11     | Análise por CLAE-ESI-Q-TOF-EM.....                                                                                                                                      | 112        |
| 5.2.12     | Ensaio de injeção e coinjeção com padrões.....                                                                                                                          | 113        |
| <b>5.3</b> | <b>Resultados e discussão.....</b>                                                                                                                                      | <b>114</b> |
| 5.3.1      | Identificação dos marcadores selecionados do extrato etanólico por meio de análises cromatográficas, espectroscópicas e ensaios de injeção e coinjeção com padrões..... | 114        |
| 5.3.2      | Isolamento, purificação e identificação das substâncias químicas do extrato EtOH R por meio de análises por CCD, HSCCC, CLAE, RMN e CLAE-ESI-Q-TOF-EM.....              | 117        |
| <b>5.4</b> | <b>Conclusões.....</b>                                                                                                                                                  | <b>166</b> |
|            | <b>Referências.....</b>                                                                                                                                                 | <b>167</b> |

## **CAPÍTULO 6: ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL..... 175**

|            |                                    |            |
|------------|------------------------------------|------------|
| <b>6.1</b> | <b>Introdução.....</b>             | <b>175</b> |
| <b>6.2</b> | <b>Materiais e Métodos.....</b>    | <b>175</b> |
| 6.2.1      | Material vegetal.....              | 175        |
| 6.2.2      | Extração do óleo essencial.....    | 176        |
| 6.2.3      | Análise do óleo essencial.....     | 176        |
| <b>6.3</b> | <b>Resultados e discussão.....</b> | <b>177</b> |
| <b>6.4</b> | <b>Conclusões.....</b>             | <b>180</b> |
|            | <b>Referências.....</b>            | <b>181</b> |

## **CAPÍTULO 7: ESTUDOS MECANÍSTICOS DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*..... 184**

|                                                                                  |                                                                                           |            |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>7.1</b>                                                                       | <b>Introdução.....</b>                                                                    | <b>184</b> |
| <b>7.2</b>                                                                       | <b>Materiais e Métodos.....</b>                                                           | <b>184</b> |
| 7.2.1                                                                            | Ensaio <i>in vitro</i> de inflamação.....                                                 | 184        |
| 7.2.1.1                                                                          | Viabilidade celular.....                                                                  | 184        |
| 7.2.1.2                                                                          | Capacidade inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$ e ativação de NF- $\kappa$ B..... | 185        |
| 7.2.2                                                                            | Ensaio <i>in vivo</i> de inflamação e gastroproteção.....                                 | 187        |
| 7.2.2.1                                                                          | Modelo de lesão gástrica induzida por etanol.....                                         | 187        |
| 7.2.2.2                                                                          | Modelo de lesão gástrica induzida por indometacina.....                                   | 188        |
| 7.2.2.3                                                                          | Necropsia, coleta e processamento do material.....                                        | 190        |
| 7.2.2.4                                                                          | Análise morfológica da área de necrose gástrica e de mucinas PAS <sup>+</sup> .....       | 190        |
| 7.2.2.5                                                                          | Avaliação da capacidade inibitória sobre a produção de IL-6 e CXCL-1.....                 | 191        |
| 7.2.2.6                                                                          | Avaliação da capacidade inibitória sobre a ativação de NF- $\kappa$ B.....                | 191        |
| 7.2.3                                                                            | Análise estatística.....                                                                  | 191        |
| <b>7.3</b>                                                                       | <b>Resultados e discussão.....</b>                                                        | <b>192</b> |
| <b>7.4</b>                                                                       | <b>Conclusões.....</b>                                                                    | <b>201</b> |
|                                                                                  | <b>Referências.....</b>                                                                   | <b>201</b> |
| <br><b>CAPÍTULO 8: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-<i>HELICOBACTER PYLORI</i>...</b> |                                                                                           | <b>205</b> |
| <b>8.1</b>                                                                       | <b>Introdução.....</b>                                                                    | <b>205</b> |
| <b>8.2</b>                                                                       | <b>Materiais e Métodos.....</b>                                                           | <b>205</b> |
| 8.2.1                                                                            | Material vegetal.....                                                                     | 206        |
| 8.2.2                                                                            | Obtenção dos extratos.....                                                                | 206        |
| 8.2.2.1                                                                          | Extrato etanólico otimizado.....                                                          | 206        |
| 8.2.2.2                                                                          | Frações polar e apolar.....                                                               | 206        |
| 8.2.2.3                                                                          | Extrato aquoso (chá).....                                                                 | 206        |
| 8.2.2.4                                                                          | Miricitrina e mistura miricitrina + quercitrina.....                                      | 206        |
| 8.2.3                                                                            | Obtenção do óleo essencial.....                                                           | 207        |
| 8.2.4                                                                            | Atividade <i>anti-Helicobacter pylori</i> .....                                           | 207        |
| 8.2.4.1                                                                          | Cepas e condições de cultivo.....                                                         | 207        |
| 8.2.4.2                                                                          | Teste de suscetibilidade antibacteriana.....                                              | 207        |
| 8.2.5                                                                            | Análises estatísticas.....                                                                | 208        |
| <b>8.3</b>                                                                       | <b>Resultados e discussão.....</b>                                                        | <b>208</b> |
| <b>8.4</b>                                                                       | <b>Conclusões.....</b>                                                                    | <b>212</b> |
|                                                                                  | <b>Referências.....</b>                                                                   | <b>213</b> |
| <br><b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                             |                                                                                           | <b>216</b> |
| <br><b>ANEXO A – PROTOCOLO CEUA/UFMG.....</b>                                    |                                                                                           | <b>218</b> |

---

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

---

### 1.1 Introdução

A úlcera péptica é uma doença crônica caracterizada pelo desequilíbrio entre os fatores que danificam a mucosa e aqueles que a protegem, resultando em lesão da mucosa no trato digestivo superior (NIETO, 2012). Dentre os fatores agressores incluem-se a infecção por *Helicobacter pylori*, secreção de ácido clorídrico e pepsina, uso de fármacos anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), ácidos biliares, isquemia, hipóxia, estresse, fumo e álcool. Por outro lado, a integridade da mucosa é mantida por mecanismos protetores, os quais incluem a secreção de bicarbonato, muco protetor, fluxo sanguíneo mucosal, constante renovação celular via proliferação de células progenitoras, prostaglandinas, óxido nítrico e fatores de crescimento (BANDYOPADHYAY, 2002; LAINE *et al.*, 2008; KLEIN *et al.*, 2010; AWAAD *et al.*, 2013). Esta doença é considerada uma das mais prevalentes no mundo, e algumas de suas complicações estão relacionadas a causas de morbimortalidade (SUNG *et al.*, 2012; ZAPATA-COLINDRES *et al.*, 2006).

Apesar de diversas classes de agentes farmacológicos estarem disponíveis para o tratamento das úlceras pépticas, a maioria apresenta alto custo e reações adversas quando utilizadas em longo prazo (BOAKYE-YIADOM *et al.*, 2021). Dentre essas reações, podem ser citadas a hipergastrinemia, que pode induzir uma hiperplasia nas células enterocromafins e até desfechos com desenvolvimento de câncer e a osteoporose (THOMSON *et al.*, 2010; YANG, 2012; BOYCE *et al.*, 2014). Além disso, o uso crônico destes medicamentos também pode estar relacionado a úlceras recorrentes devido a um mau processo de cicatrização (KANGWAN, 2014). Assim, a busca por alternativas para o controle desta doença vem se tornando de grande importância e, neste cenário, destacam-se as plantas medicinais, as quais exibem benefícios terapêuticos no tratamento de úlceras gástricas, pois podem atuar em diferentes alvos biológicos e apresentam baixa incidência de reações adversas (BI *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 80% da população mundial utiliza, rotineiramente, a medicina tradicional para satisfazer suas necessidades de atenção

primária à saúde, e que grande parte dos tratamentos tradicionais implica no uso de extratos de plantas e seus princípios ativos (VELOZ, *et al.*, 2012). Assim, os produtos naturais podem ser considerados fontes potenciais para novos tratamentos de úlcera.

O Brasil se destaca entre as doze nações que abrigam 70% da biodiversidade do planeta. À importância, de âmbito global, da conservação dessa biodiversidade, soma-se também a sua relevância para a economia do país (BRASIL, 2002 *apud* SILVA *et al.*, 2006). Os medicamentos fitoterápicos representam uma porção significativa do mercado mundial de medicamentos, com crescimento nas vendas de 15% ao ano contra 4% do setor de fármacos sintéticos. No Brasil, eles geram uma receita de aproximadamente US\$ 160 milhões anuais, constituindo um mercado promissor e em franca expansão. Observa-se que grande parte dos fitoterápicos apresenta rentabilidade elevada, desmistificando a justificativa das empresas de se manterem ilegais devido à pouca significância econômica desse mercado (CARVALHO *et al.*, 2011c). Esses dados apontam para uma grande janela de oportunidades para atendimento do mercado interno e, dada à riqueza de nossa biodiversidade, um enorme potencial para o desenvolvimento de novos produtos para a exportação (RODRIGUES, 2016). O reconhecimento de que a pesquisa de plantas medicinais, usadas por populações tradicionais, representa um adequado enfoque para o desenvolvimento de novos fármacos é um grande estímulo para que sejam ampliados os estudos voltados para o tratamento de úlcera gástrica.

Registros do uso tradicional de espécies de *Campomanesia* para disenterias, problemas estomacais, diarreia (PIO CORRÊA, 1952), cistites e uretrites (D'ÁVILLA, 1910), bem como desordens hepáticas (MORAES, 1881), vêm sendo descritos em vários trabalhos. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram um elevado teor de fenóis e alta atividade antioxidante nos extratos das folhas de *C. lineatifolia*, sugerindo a relação de sua utilização etnofarmacológica como antidiarreico, antiúlcera gástrica e cicatrizante (BARBOSA *et al.*, 2009). O mesmo extrato etanólico e a fração acetato de etila de *C. lineatifolia* protegeram a mucosa gástrica de ratos contra lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina, e a investigação de toxicidade aguda mostrou ausência de morte dos ratos e de alterações graves nos comportamentos e sinais clínicos, indicando a segurança oral aguda da espécie (MADALOSSO *et al.* 2012). Em estudo de triagem de plantas medicinais brasileiras em células de monócito humano, THP-1, estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), Henriques *et al.* (2016) demonstraram a atividade anti-TNF- $\alpha$ , *in vitro*, de *C. lineatifolia*. Esses resultados prévios

associados aos relatos do uso popular da espécie *C. lineatifolia* para o tratamento de distúrbios gastrointestinais suportam a continuidade dos estudos e tornam a espécie promissora como alternativa ou adjuvante no tratamento de úlceras gástricas.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo fitoquímico e avaliar a atividade gastroprotetora, anti-inflamatória e antimicrobiana de *Campomanesia lineatifolia*, contribuindo para a padronização químico-biológica para o desenvolvimento de um fitoterápico.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1. Otimizar a obtenção de extratos das folhas de *Campomanesia lineatifolia* ricos em fenólicos;
2. Obter e caracterizar o óleo essencial das folhas de *C. lineatifolia*;
3. Fracionar, isolar e caracterizar os constituintes químicos do extrato otimizado e do chá das folhas por métodos cromatográficos e espectroscópicos;
4. Identificar e selecionar marcadores químicos do extrato otimizado de *C. lineatifolia*;
5. Desenvolver método analítico para quantificação dos marcadores selecionados para a padronização química de *C. lineatifolia*;
6. Quantificar os marcadores majoritários no extrato otimizado de *C. lineatifolia*;
7. Avaliar a atividade antiúlcera gástrica do extrato otimizado de *C. lineatifolia*, em modelo *in vivo* de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina;
8. Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato de *C. lineatifolia* em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*;
9. Avaliar a atividade anti-*Helicobacter pylori* em cepas comerciais e isolados clínicos, do extrato otimizado e do óleo essencial de *C. lineatifolia*;

## Referências

- AWAAD, A.S, EL-MELIGY, RM, SOLIMAN, GA. (2013). Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17, 101–124.
- BANDYOPADHYAY, D, BISWAS, K, BHATTACHARYYA, M, REITER, RJ, BANERJEE, RK. (2002). Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration: protection by melatonin. *Indian Journal of Experimental Biology* 40, 693–705.
- BARBOSA, J. *Campomanesia lineatifolia Ruiz e Pav.*: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2009.
- BI, WP, MAN, HB, MAN, MQ. (2014). Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. *World J Gastroenterol*, 20 (45): 17020-17028.
- BOAKYE-YIADOM M, KUMADOH D, ADASE E, WOODE E (2021). Medicinal Plants with Prospective Benefits in the Management of Peptic Ulcer Diseases in Ghana. *Biomed Res Int*. 5;2021:5574041.
- BOYCE M, DOWEN S, TURNBULL G, VAN DEN BERG F, ZHAO CM, CHEN D, BLACK J. (2014). Effect of netazepide, a gastrin/CCK(2) receptor antagonist, on gastric acid secretion and rabeprazole-induced hypergastrinaemia in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 79: 744–755.
- CARVALHO, ACB. *et al.* (2011). Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. *Braz. J. Pharm. Sci.*, São Paulo, v. 47(3): 467-473.
- D'ÁVILLA, M. C. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul. *Faculdade Livre de Medicina e Pharmacia de Porto Alegre*, Porto Alegre, p. 155, 1910.
- HENRIQUES, BO. *et al.* (2016). In Vitro TNF- $\alpha$  Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron adstringens* in an Acute Arthritis Model. *Evid Based Complement Alternat Med.*, v. 2016, Article ID 9872598, 15 pages.
- KANGWAN N, PARK JM, KIM EH, HAHM KB. (2014). Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5: 40–47, 2014.
- KLEIN JR, LC, GANDOLFI, RB, SANTIN, JR, LEMOS, M, FILHO, VC, FALONI DE ANDRADE, S. (2010). Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 381, 121–126.
- LAINE, L. *et al.* (2008). Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology*, v. 135, p. 41-60.

- MADALOSSO, RC. *et al.* (2012). *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 772-779.
- MORAES, M. Botânica Brasileira: Aplicada à Medicina às Artes e à Indústria (Seguida de um Suplemento de Matéria Médica, Inclusive as Plantas Conhecidas e Aplicadas Pelos Índios em Suas Enfermidades). *Garnier*, Rio de Janeiro, 1881.
- NIETO Y. (2012). Protocolo terapéutico de la úlcera péptica. *Medicine*, 11:179-82.
- PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Imprensa Nacional*, Rio de Janeiro, 1952.
- RODRIGUES, W. (2016). Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. *Interações*, Campo Grande, MS, v. 17, n. 2, p. 267-277.
- SILVA, M. S. *et al.* (2006). Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. *Acta bot. bras.*, v.20, n. 4, p. 815-829.
- SUNG JJ, TSOI KK, MA TK, YUNG MY, LAU JY, CHIU PW. (2012). Causes of mortality in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective cohort study of 10,428 cases. *Journal Gastroenterol* 105:84-89.
- THOMSON AB, SAUVE MD, KASSAM N, KAMITAKAHARA H. (2010). Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World J Gastroenterol* 16: 2323–2330.
- VELOZ, AIR, PERERA, LMS, DORVIGNY, BM. (2012). Tratamientos convencionales y medicina alternativa de la úlcera péptica. *Revista Cubana de Farmacia*, 46(1): 127-137.
- YANG, YX. (2012). Chronic proton pump inhibitor therapy and calcium metabolism. *Curr Gastroenterol Rep* 14: 473–479.
- ZAPATA-COLINDRES, JC, ZEPEDA-GÓMEZ, S, MONTAÑO-LOZA, A, VÁZQUEZ-BALLESTEROS, E, VILLALOBOS, JJ, VALDOVINOS-ANDRACA, F. (2006). The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Canadian Journal of Gastroenterology* 20, 277–280.

---

## CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Úlcera péptica

#### 2.1.1 Definição e prevalência

A classificação de úlcera péptica (UP) é ampla e compreende as úlceras gástricas, duodenais e esofágicas, podendo ser caracterizada clinicamente pela presença de uma ou mais lesões erosivas na mucosa do sistema gastrointestinal (SGI) em consequência da digestão ácido-péptica dos tecidos (MALFERTHEINER *et al.*, 2009). Sua etiologia é multifatorial, incluindo a infecção por *Helicobacter pylori*, uso contínuo ou indiscriminado de AINES, álcool, estresse emocional, dieta inadequada, atingindo um considerável número de pessoas em todo o mundo (JAIN *et al.*, 2007; MUSUMBA *et al.*, 2009).

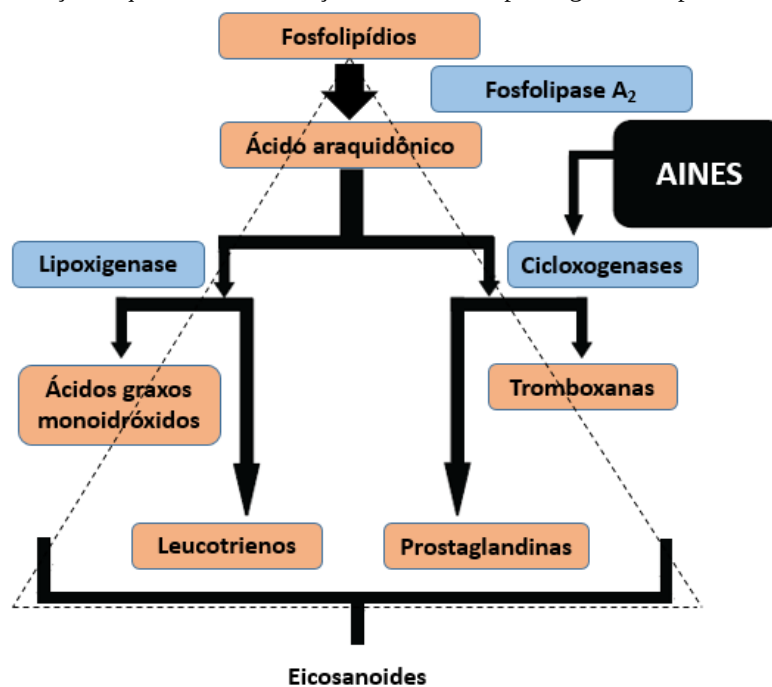
Estima-se que a UP acomete, aproximadamente, 10% da população mundial (PRASAD e FRIEDMAN, 2018) e os indivíduos acometidos podem apresentar uma variedade de sintomas como dispepsia, dor epigástrica, desconforto abdominal, vômitos e sintomas de refluxo. Além disso, a UP é a causa mais comum de condições mais complicadas, como a hemorragia, úlcera perforativa e o desenvolvimento de câncer que, por sua vez, está associada com alta mortalidade e morbidade (BARKUN e LEONTIADIS, 2010). No Brasil, Oliveira *et al.* (2015) demonstraram uma taxa de prevalência da úlcera péptica de 0,2% para homens e 0,1% para mulheres, com mortalidade de 3,0/100 mil habitantes.

#### 2.1.2 Uso crônico de anti-inflamatórios não esteroides

Os AINES estão entre os agentes mais utilizados na prática médica para o tratamento da dor e inflamação, em pacientes com dor inflamatória aguda (cefaleia, dor pós-operatória e fraturas ortopédicas) e dor crônica (artrite reumatóide, osteoartrite e gota) (CASTELLSAGUE *et al.*, 2012; MCCARBERG & GIBOFSKY, 2012). Aproximadamente 70% das pessoas com 65 anos ou mais utilizam AINES pelo menos uma vez por semana, e metade deles tomam, pelo menos, sete doses por semana (FINE, 2013).

Apesar do amplo uso dos AINES no último século, seu mecanismo de ação (**FIGURA 1**) somente foi elucidado em 1971, através das observações de Vane, o qual demonstrou que a capacidade dos AINES de suprimir a inflamação baseava-se principalmente na sua capacidade em inibir as enzimas cicloxigenases (COX) (VANE, 1971).

**FIGURA 1** – Representação esquemática da inibição da síntese de prostaglandinas pelos AINES.

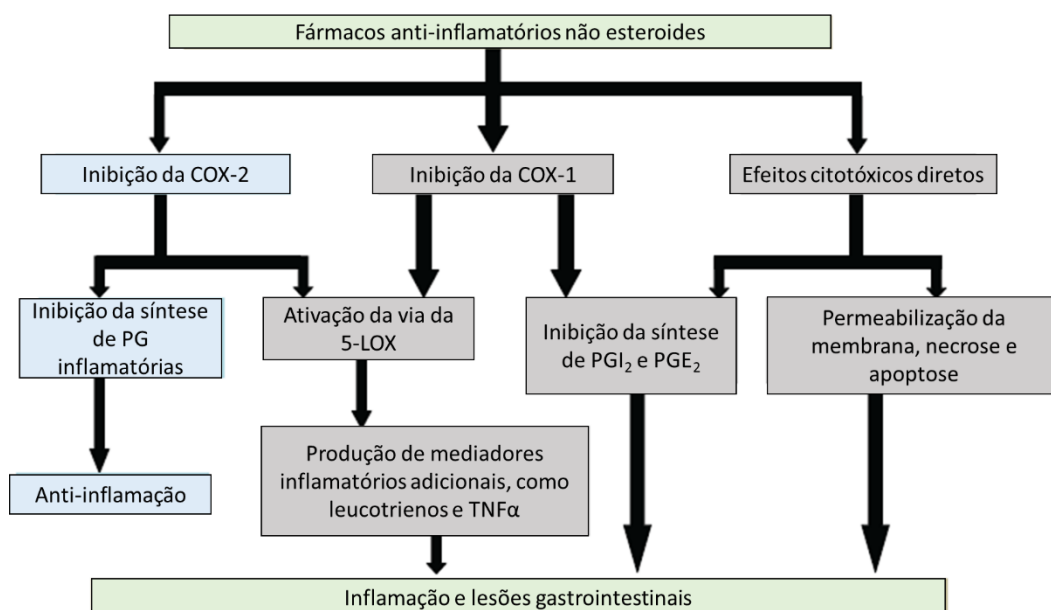


Legenda: AINES: anti-inflamatório não esteroide

Fonte: Adaptado de Sinha *et al.*, 2013, p. 3.

Há três mecanismos principais pelos quais os AINES induzem às complicações gastrointestinais (**FIGURA 2**): (i) inibição da enzima cicloxigenase-1 (COX-1) e das prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>); (ii) permeabilização da membrana (efeito citotóxico direto nas células da mucosa gástrica) e (iii) produção de mediadores inflamatórios adicionais (SINHA *et al.*, 2013).

**FIGURA 2** – Diagrama esquemático para o mecanismo de indução da inflamação e lesões gastrointestinais pelos AINES.



Legenda: AINES: anti-inflamatório não esteroide; COX-1: cicloxigenase 1; COX-2: cicloxigenase 2; LOX: lipoxigenase; PG: prostaglandinas; TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa.

Fonte: Adaptado de Sinha *et al.*, 2013, p. 3.

No presente, as enzimas COX ocorrem em três isoformas – COX-1, COX-2 e COX-3. COX-1 e COX-2 exibem quase 60% de similaridade, enquanto a COX-3, é uma isoenzima derivada do gene da COX-1 (SHARMA *et al.*, 2019). A COX-1 é constitutivamente expressa no estômago e é responsável pela proteção normal fisiológica da mucosa gástrica. Ela também é responsável pela síntese de prostaglandinas PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, as quais protegem o revestimento gástrico da secreção ácida, mantém o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e produzem bicarbonato (GUDIS e SAKAMOTO, 2005; KONTUREK *et al.*, 2004). A outra isoforma, COX-2, não é expressa constitutivamente no SGI e é induzida por dano celular, por várias citocinas pró-inflamatórias e por fatores derivados de tumores (SEIBERT *et al.*, 1994; SEIBERT e MASFERRER, 1994). A COX-3 é expressa no córtex cerebral e coração e está relacionada aos efeitos analgésico e antitérmico observados para os anti-inflamatórios não esteroidais analgésicos (*i.e.*, paracetamol e dipirona), os quais apresentam efeitos mínimos na COX-1 e COX-2 e baixa atividade anti-inflamatória, com efeitos adversos gastrointestinais e renais mínimos (PRZYBYŁA, SZYCHOWSKI & GMIŃSKI, 2020). Dado o amplo papel que as prostaglandinas desempenham na fisiologia, não é surpreendente que a supressão sistêmica da síntese de PG através da inibição da COX possa levar a efeitos secundários indesejados. Em particular, indivíduos que usam AINES por períodos prolongados podem apresentar efeitos adversos gastrointestinais, que incluem irritação e ulceração do epitélio gástrico, além de efeitos sobre

outros sistemas fisiológicos. Segundo estudos observacionais, o risco de complicações no SGI superior é aproximadamente quatro vezes maior em usuários de AINES quando comparado a pacientes que não fizeram uso dessa classe de medicamentos (HERNANDEZ-DIAZ e RODRIGUEZ, 2002). A análise dos resultados de quatro estudos prospectivos em pacientes com artrite que faziam uso de AINES revelou incidência anual de efeitos adversos relacionados ao SGI de 2,7% a 4,5% (SILVERSTEIN e GEIS, 1996; BOMBARDIER *et al.*, 2000; SILVERSTEIN *et al.*, 2000; SCHNITZER *et al.*, 2004).

Os AINES também têm um efeito direto nas células da mucosa gástrica, que ocorre pelo contato do AINE no lúmen e o epitélio mucosal, após a ingestão oral ou a excreção biliar desses fármacos. Ainda, a interação dos AINES com fosfolipídios da bicamada leva a aumento da permeabilidade da membrana, o que pode levar ao rompimento da barreira epitelial. Além disso, os AINES promovem o desacoplamento da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, com consequente redução dos níveis de ATP e aumento do cálcio intracelular, podendo induzir necrose e apoptose das células da mucosa gástrica (BJARNASON *et al.*, 2018).

Em adição, a inibição da síntese de PGs pelos AINES leva a uma ativação indireta da via da lipoxigenase, justificado pelo excesso de substrato disponível, e um aumento na síntese de leucotrienos. Os leucotrienos causam inflamação e isquemia tecidual, levando a um prejuízo da mucosa gástrica (MCCAFFERTY *et al.*, 1995; ANDREWS *et al.*, 1994). Junto disso, há também um aumento na produção de mediadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  (SANTUCCI *et al.*, 1994). Isso ainda leva à oclusão dos microvasos gástricos e, consequentemente, a uma redução do fluxo sanguíneo local e liberação de espécies reativas de oxigênio. Esses radicais livres reagem com os ácidos graxos poli-insaturados da mucosa, acarretando uma peroxidação lipídica e dano tecidual (WALLACE, 1997).

### 2.1.3 Infecção por *Helicobacter pylori*

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma das infecções crônicas bacterianas mais comuns na população, afetando, aproximadamente, 4,4 bilhões de pessoas mundialmente. No Brasil, a prevalência de *H. pylori* na população saudável é estimada em 71,2 %, e mais de 147 milhões de pessoas vivem com a bactéria (HOOI *et al.*, 2017).

Apesar de a rota detalhada de transmissão ainda permanecer incerta, as rotas oral-oral e fecal-oral durante a infância são as hipóteses mais plausíveis de transmissão entre os seres humanos (GOH *et al.*, 2011). *H. pylori* é a única bactéria que pode persistir por décadas no ambiente ácido estomacal, onde pode danificar a mucosa e alterar o padrão da liberação hormonal (JÚNIOR *et al.*, 2016), afetando, dessa forma, a fisiologia gástrica, representando o fator de risco mais significativo para tumores malignos gástricos (WANG *et al.*, 2014).

Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados desenvolvem lesões gástricas severas, como a úlcera péptica, e 1-3% progridem para o câncer gástrico, com baixa taxa de sobrevivência, em torno de 5 anos (CIRAK *et al.*, 2007). Estudos têm indicado que a infecção por *H. pylori* induz inflamação por vários mecanismos, entre eles o contato direto com as células epiteliais, a estimulação e a liberação de citocinas. Pacientes infectados pelo *H. pylori* apresentam altos níveis de expressão e produção de interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (EL-OMAR *et al.*, 2000; ISRAEL & PEEK, 2001; SEPÚLVEDA, 2001). Além disso, neutrófilos ativados geram espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio, que podem induzir danos oxidativos no DNA e danos às células epiteliais, as quais incluem peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, levando a alterações do *turnover* celular (ISRAEL & PEEK, 2001).

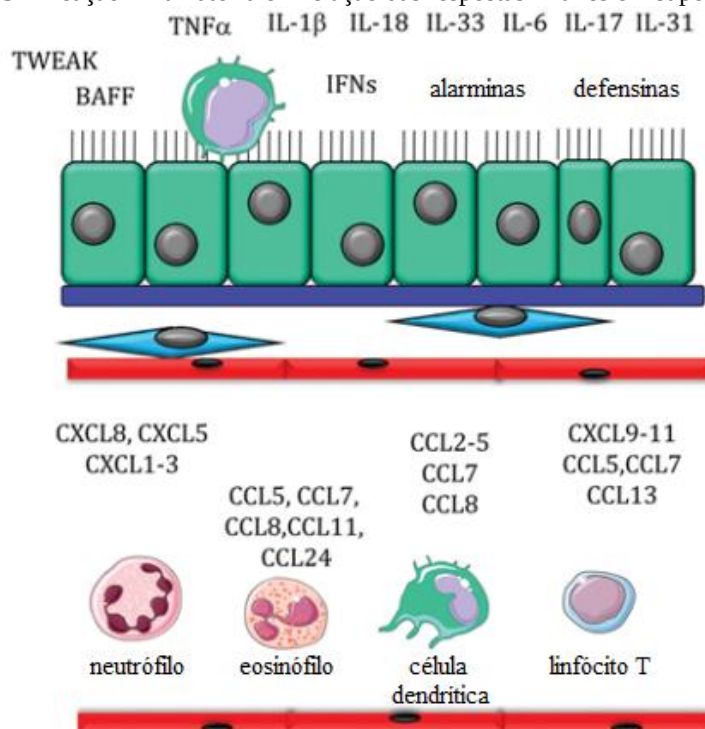
#### 2.1.4 Mecanismos inflamatórios da úlcera péptica

Apesar dos grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa péptica, a sua etiologia ainda não é totalmente conhecida. O conceito fisiopatológico básico é de que a úlcera péptica resulta da ruptura do equilíbrio existente entre os fatores agressivos e os de proteção da mucosa gastroduodenal (CARVALHO, 2000). Os principais fatores de risco incluem a infecção por *H. pylori*, uso crônico de AINEs, pepsina, tabagismo, alcoolismo, ácidos biliares, esteroides, estresse e mudanças na consistência da mucina gástrica (MYNATT *et al.*, 2009).

As células epiteliais e macrófagos localizados na camada mucosa podem secretar citocinas quimioatraentes e pró-inflamatórias, e representam a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos e outros estímulos que podem levar ao dano tecidual. Desta forma, essas células atuam como um sistema de alerta precoce para eventos imunológicos e inflamatórios. Alarminas e citocinas pró-inflamatórias iniciam uma cascata de eventos, atraindo diferentes populações de células imunes para o sítio do dano tecidual (**FIGURA 3**), as quais secretam

diversas outras citocinas, como TNF- $\alpha$ , interleucinas, interferon, fatores de crescimento e quimiocinas (STRIZ *et al.*, 2014).

**FIGURA 3** – Reação inflamatória e iniciação das respostas imunes em superfície mucosal



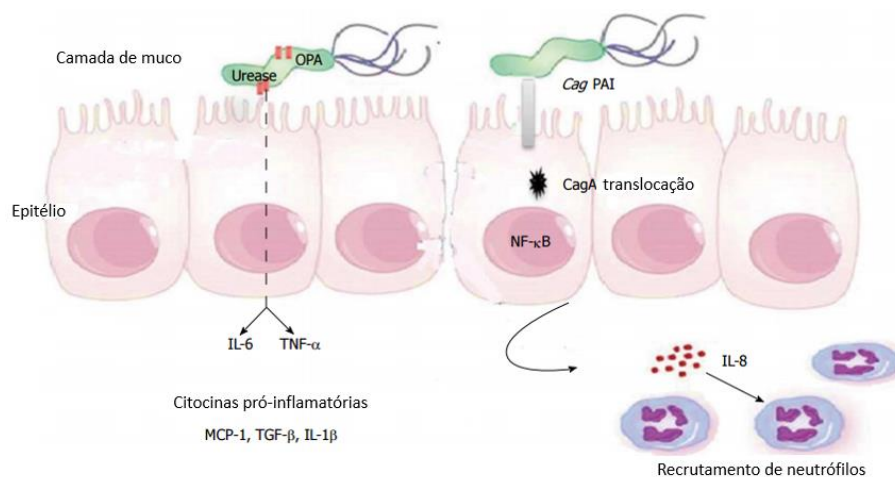
Legenda: TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IL: interleucina; IFNs: interferon; TWEAK: fator fraco de indução de apoptose semelhante ao TNF; BAFF: fator de ativação de célula B; CXC e CC: famílias de quimiocinas. Fonte: Adaptado de Striz *et al.*, 2014, p. 596.

A infecção por *H. pylori* representa um grande fator causal, relacionada à incidência de 60% de gastrite e até 50-75% de úlceras duodenais. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de uma inflamação crônica devido à sua colonização da mucosa antral. Apesar da produção de anticorpos, o sistema imunológico é incapaz de controlar a infecção, podendo causar uma gastrite crônica ativa. Em decorrência, a gastrina, liberada pelas células G da mucosa antral, estimula a produção de ácido gástrico (HCl) pelas células parietais. As respostas da colonização por *H. Pylori* e o aumento da secreção de gastrina, com consequente aumento do ácido, contribuem para a erosão da mucosa e, portanto, para a formação de úlceras (MUSTAFA *et al.*, 2015).

O *H. pylori* leva à produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais gástricas (CEGs), por mecanismos: (i) interações entre o CagA (fator de virulência) translocado e as células epiteliais gástricas, que levam à ativação do NF- $\kappa$ B, à alteração na transcrição genética nas CEGs e à secreção de IL-8 pelas CEGs, acarretando no recrutamento de neutrófilos; e (ii)

a urease de *H. pylori* induz a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  pelas CEGs. Outras citocinas são secretadas durante a infecção por *H. pylori* tais como, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), fator inibidor de migração (MIF) e fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (**FIGURA 4**) (ALZAHIRANI *et al.*, 2014). Hunt *et al.* (1995) e Misiewicz (1995) relataram que a infecção pelo *H. pylori* induz inflamação da mucosa gástrica, que é acompanhada por uma infiltração de neutrófilos, monócitos, linfócitos e plasmócitos, bem como por uma expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e interferon- $\gamma$ . Níveis aumentados destas mesmas citocinas pró-inflamatórias no epitélio gástrico têm sido descritos em vários estudos (CRABTREE, *et al.*, 1991; CRABTREE, *et al.*, 1993; FAN, *et al.*, 1993; NOACH, *et al.*, 1994; YAMAOKA *et al.*, 1996; ARAKAWA *et al.*, 2012; PAWLIK *et al.*, 2016). Além disso, cepas de *H. pylori* que contém mais sítios de fosforilação na proteína CagA, característica associada à virulência da bactéria, são capazes de reduzir, com grande intensidade, a expressão das mucinas gástricas MUC1 e MUC5AC (FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2017).

**FIGURA 4** – Produção de citocinas pelas células do epitélio gástrico durante infecção por *Helicobacter pylori*.



Legenda: OPA: proteína inflamatória externa; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; Cag PAI: ilha de patogenicidade *Cag*, NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa. Fonte: Adaptado de Alzahrani *et al.*, 2014, p. 12775.

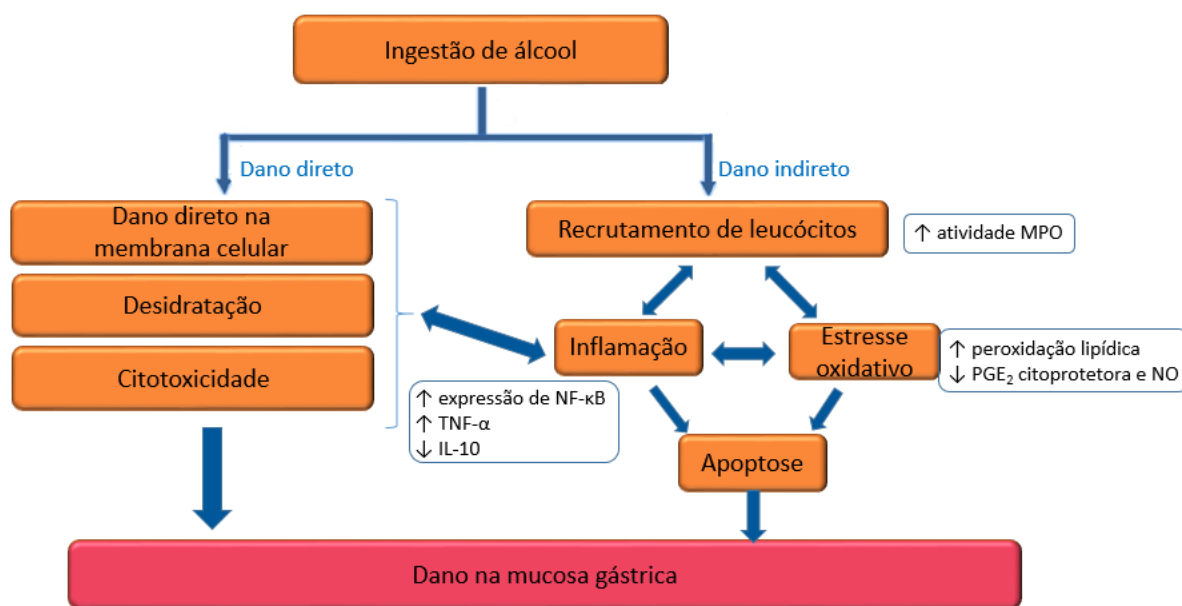
Um estudo realizado por Lindholm *et al.* (1998) demonstrou um perfil semelhante de resposta local de liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  entre pacientes com úlcera duodenal infectados pelo *H. pylori*, e aqueles que apresentavam gastrite crônica, sem infecção. Apesar da semelhança no perfil de liberação dessas citocinas, foi observado que os níveis eram mais elevados quando a infecção por *H. pylori* estava presente.

Paralelamente à prevalência da úlcera péptica relacionada à infecção por *Helicobacter pylori*, Scarpignato e Hunt (2010) apontam como a segunda causa das úlceras pépticas o uso de AINEs e/ou aspirina. Essa relação pode ser justificada pelo aumento da expectativa de vida, que leva a uma prevalência crescente de distúrbios artríticos na população idosa, as quais são acompanhadas por um aumento das prescrições de AINEs. Shim e Kim (2016) também relatam que a prevalência da úlcera péptica vem aumentando na população idosa, principalmente devido ao aumento da utilização dos AINEs para controlar a dor e a inflamação.

Em modelos *in vivo* de lesões gástricas induzidas por indometacina, foi demonstrada uma hiper-regulação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e fator ativador de plaquetas (PAF) (MUSUMBA, 2009). Ainda neste modelo de lesão, muitos estudos têm demonstrado que a aderência de neutrófilos no endotélio vascular é um evento inicial crítico na patogênese do dano mucosal gástrico induzido por AINEs.

Ainda que em menor prevalência, o alcoolismo também é considerado um fator de risco importante relacionado à úlcera péptica (MUSTAFA *et al.*, 2015). Os mecanismos pelos quais o álcool induz às úlceras gástricas ainda não estão totalmente definidos. Contudo, existem evidências que indicam o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e apoptose, que desempenham papéis cruciais na sua patogênese (AL BRATAN *et al.*, 2013; SANGIOVANNI *et al.*, 2013) (**FIGURA 5**). A invasão da mucosa gástrica por neutrófilos, acompanhada da atividade aumentada da mieloperoxidase, contribuem para a danificação da mucosa gástrica (WALLACE *et al.*, 1990). A ativação dos neutrófilos está associada a uma regulação da resposta inflamatória, com um aumento da expressão do NF- $\kappa$ B, que controla a ativação gênica de produtos pró-inflamatórios, incluindo a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a COX-2, citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e quimiocinas (IL-8) (ALESSANDRI *et al.*, 2013; HAYDEN & GHOSH, 2014). Esses eventos amplificam a cascata inflamatória, disparando a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, e reforçam o recrutamento de macrófagos e neutrófilos, exacerbando o dano gástrico (AUGUSTO *et al.*, 2007; SANGIOVANNI *et al.*, 2013).

**FIGURA 5** – Diagrama representativo da lesão gástrica induzida pelo etanol.



Legenda: MPO: mieloperoxidase; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; NO: óxido nítrico; NF-κB: fator nuclear kappa B; TNF-α: fator de necrose tumoral α; IL-10: interleucina 10.

Fonte: Adaptado de Arab *et al.*, 2015, p. 16.

Modelos experimentais de lesão gástrica induzida por etanol mimetizam várias condições humanas e, portanto, podem fornecer um meio valioso para a avaliação de agentes com potenciais ações antiúlcera, juntamente com seus mecanismos relacionados à proteção gástrica (SANTOS & RAO, 2001; LIU *et al.*, 2012; SALGA *et al.*, 2012). Além desses modelos, outros agentes necrotizantes, como a utilização de AINEs, têm sido amplamente utilizados para a avaliação da atividade gastroprotetora e gastrotoxicidade de inúmeras substâncias (SAIRAM *et al.*, 2001; CHANDRANATH *et al.*, 2002; AL MOFLEH *et al.*, 2007; MUSUMBA, 2009).

### 2.1.5 Tratamento

O tratamento das úlceras pépticas evoluiu de modificações na dieta e cirurgia para a supressão de ácido com antiácidos, antagonistas do receptor H<sub>2</sub> (ARH<sub>2</sub>) para histamina, inibidores da bomba de prótons e erradicação da infecção por *H. pylori*. Antes do desenvolvimento dos ARH<sub>2</sub>, os pacientes eram frequentemente internados e a cirurgia era a opção mais comum. Hoje, o uso de ARH<sub>2</sub> e, mais tarde, os inibidores da bomba de prótons (IBPs) mudaram drasticamente o manejo das UP intra-hospitalares para um ambiente em grande parte ambulatorial, com redução no número de procedimentos cirúrgicos (SMOOTH *et al.*, 2001).

As estratégias terapêuticas atualmente utilizadas são direcionadas tanto para a redução dos agentes agressores, como ao fortalecimento dos mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal (JAIN *et al.*, 2007), conforme descrito na **Tabela 1** (WHO, 2004; KAMADA *et al.*, 2021). Muitas doenças gastrintestinais ainda são pouco responsivas às terapias e, mesmo nos casos em que existe grande variedade de fármacos efetivos, ainda há espaço para o aprimoramento e pesquisa em busca de novos fármacos (WALLACE e FERRAZ, 2010).

**TABELA 1** - Agentes atualmente aprovados para o manejo das úlceras pépticas.

| <b>Classe Terapêutica</b>                                | <b>Agentes</b>                                                    |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>Antiácidos</b>                                        | Carbonato de cálcio; Hidróxido de magnésio; Hidróxido de alumínio |
| <b>Agentes pró-cinéticos</b>                             | Betanecol; Metoclopramida; Domperidona; Cisaprida                 |
| <b>Agentes protetores da mucosa</b>                      | Sucralfato; Ácido algínico                                        |
| <b>Antagonistas do receptor H<sub>2</sub></b>            | Cimetidina; Nizatidina; Ranitidina; Famotidina                    |
| <b>Inibidores da bomba de prótons</b>                    | Omeprazol; Lansoprazol; Pantoprazol; Rabeprazol; Esomeprazol      |
| <b>Bloqueadores de ácido competitivos com o potássio</b> | Vonoprazana                                                       |

Fonte: WHO, 2004; Kamada *et al.*, 2021.

A erradicação da *H. pylori* constitui importante estratégia terapêutica, considerando-se que grande parte das UPs pode estar associada a essa infecção (JAIN *et al.*, 2007). A infecção por *H. pylori* pode levar à redução da produção de somatostatina que resulta no aumento da secreção ácida juntamente com a redução da produção de bicarbonato. Além disso, a infecção interfere na regulação da liberação de gastrina e induz à resposta inflamatória na mucosa gástrica com liberação de citocinas. O tratamento consiste basicamente na associação de antibióticos e agentes antissecretores (MALFERTHEINER *et al.*, 2009).

Os atuais protocolos para o tratamento das úlceras pépticas decorrentes do uso de AINES e/ou por infecção por *H. pylori* não preconizam a utilização de fármacos anti-inflamatórios (WHO, 2004; DROSSMAN, 2006; JAIN *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2018), o que amplia a possibilidade de novas opções terapêuticas para os pacientes com úlcera, em especial, com a utilização de medicamentos fitoterápicos.

### 2.1.6 Medicina Tradicional

Várias plantas medicinais têm sido usadas para o tratamento de distúrbios gastrintestinais. O primeiro fármaco sistematicamente efetivo contra úlceras gástricas, a carbenoxolona, foi descoberto como resultado de pesquisas com *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz), comumente usada pelos indígenas (AKTAR & MUNIR, 1989 apud SILVA *et al.*, 2006).

Um estudo de revisão realizado por Bi *et al.* (2014) demonstrou que os medicamentos à base de plantas são eficazes no tratamento da úlcera gástrica, e apresentam menos efeitos adversos e menores taxas de recorrência. Medicamentos à base de plantas, isolados ou em combinação com fármacos convencionais, podem ser utilizados como uma alternativa para tratar certas úlceras gástricas e prevenir a recorrência. Algumas plantas medicinais exibem, além da atividade anti-úlcera gástrica, propriedades antimicrobianas (XIE *et al.*, 2013 apud BI *et al.*, 2014). Assim, a combinação de medicamentos à base de plantas e anti-*H. pylori* poderia melhorar o resultado para pacientes com úlcera gástrica.

Outro estudo realizado na Alemanha indicou que, aproximadamente, 50% dos pacientes com síndrome do intestino inflamado já utilizaram tratamentos alternativos, sendo a homeopatia e a fitoterapia os mais comuns (LANGHORST *et al.*, 2005).

Os extratos vegetais têm características distintas dos fármacos sintéticos. Geralmente, contêm uma série de substâncias e, muitas vezes, o(s) princípio(s) ativo(s) é(são) desconhecido(s) (SAHOO *et al.*, 2010). Estudos clínicos já comprovaram a eficácia de alguns produtos naturais para o tratamento de doenças gastrintestinais. Por exemplo, a capsaicina (derivada de pimentas do gênero *Capsicum*) protegeu a mucosa gástrica em voluntários saudáveis que fizeram uso de ácido acetilsalicílico (YEOH *et al.*, 1995). O extrato de *Curcuma domestica* (açafrão) demonstrou ser eficiente para o alívio da dispepsia em um estudo duplo-cego com 116 pacientes (THAMLIKITKUL *et al.*, 1989). Já pacientes tratados com extrato de *Maytenus ilicifolia* (espinaheira-santa) por 28 dias apresentaram melhora significativa, em relação ao grupo placebo, no que diz respeito à sintomatologia dispéptica global, e principalmente nos sintomas de azia e gastralgia (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009).

No Brasil, com a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF - BRASIL, 2006) e adoção da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC – BRASIL, 2015), a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME – BRASIL, 2020) conta, atualmente, com doze medicamentos fitoterápicos, dentre eles, a Espinheira-santa (*Maytenus officinalis* Mabb.), com indicação no tratamento coadjuvante de gastrite e úlcera gastroduodenal e sintomas de dispepsia. No Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2021), constam algumas plantas com indicações terapêuticas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e que, inclusive, estão incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, (RENISUS) como a mil-folhas (*Achillea millefolium*), hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*), carqueja (*Baccharis trimera*), boldo-brasileiro (*Plectranthus barbatus*), dentre outras. Observa-se, portanto, que com a implementação das políticas nacionais para as plantas medicinais houve um incentivo à pesquisa de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população para o tratamento de diversas doenças, com o intuito de garantir o seu uso seguro, eficaz e de qualidade, o que torna promissor o estudo da espécie *C. lineatifolia*.

## 2.2 A Família Myrtaceae

*Myrtaceae* Jussieu é a nona maior família de plantas superiores, que inclui árvores e arbustos. Tem como centros de diversidade os trópicos úmidos, particularmente na América do Sul, Austrália e Ásia Tropical, distribuída em 132 gêneros e 5671 espécies (GOVAERTS *et al.*, 2014). As espécies dessa família têm folhas simples, com glândulas oleíferas, flores polistêmones, ovário mediano a ínfero, floema interno e pontuações ornamentadas nos vasos do xilema (GOMES *et al.*, 2009). Ela representa uma das maiores famílias da flora brasileira, com 23 gêneros e 1034 espécies que ocorrem distribuídas em todas as regiões e formações vegetais do país (SOBRAL *et al.*, 2015), destacando-se, com mais de uma centena de espécies, os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calyptanthus*.

Economicamente, *Myrtaceae* é uma família muito importante. Algumas espécies são cultivadas, como a *Eucalyptus* spp., a partir da qual a madeira é usada para produzir papel, poste e carvão vegetal; outras espécies são ornamentais e algumas são usadas como especiarias, tais como *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, conhecido como "cravo-da-índia" ou cravo. Várias espécies produzem frutos comestíveis que são usadas para fazer suco, geleia e

doces, como *Psidium guajava* L. ("goiabeira" e "goiaba"), *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg ("jabuticabeira"), *Eugenia uniflora* L. ("pitangueira"), *Syzygium* spp. ("Jambo"), mas nem todas são cultivadas (CASCAES *et al.*, 2015). Espécies de *Myrtaceae* também são empregadas na medicina popular para tratar várias doenças, especialmente distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas, com uma ação que provavelmente está relacionada com suas propriedades adstringentes, devido à presença de taninos. As partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos que são comumente consumidos (CRUZ & KAPLAN, 2004).

Infelizmente, algumas espécies dessa família estão desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia ou se tenha qualquer estudo de seu perfil fitoquímico ou eficácia farmacológica (GRESSLER *et al.*, 2006).

### 2.3 O gênero *Campomanesia*

O gênero *Campomanesia* compreende 45 espécies distribuídas predominantemente em florestas e vegetações de savana (LANDRUM, 1986; GOVAERTS *et al.*, 2008). Pode ser separado de outros gêneros da família *Myrtaceae* pelas flores pentâmeras, o alto número de lóculos usualmente presentes (3-18, normalmente acima de 5), a presença de uma parede locular glandular que recobre a semente e serve como uma falsa cobertura no fruto maduro e um embrião com grande hipocótilo e pequenos cotilédones (LANDRUM, 1986). No Brasil, de acordo com Sobral *et al.* (2015), 41 espécies de *Campomanesia* são conhecidas, com 32 delas endêmicas.

As atividades biológicas nas diferentes espécies do gênero *Campomanesia* têm sido atribuídas principalmente à presença de metabólitos especiais, como terpenos, flavonoides, champanonas, taninos e saponinas, identificados em vários estudos (**FIGURA 6, TABELA 2**). Dentre essas substâncias, destacam-se os flavonoides, que possuem uma série de propriedades bioquímicas e farmacológicas e que tem despertado interesse. Além de sua propriedade antioxidante, há evidências de que essas substâncias podem afetar diversas funções biológicas como a permeabilidade capilar, processos secretórios envolvidos na resposta inflamatória e a atividade de enzimas, receptores ou carreadores (NOROOZI *et al.*, 1998; HODEK *et al.*, 2002; MOTA *et al.*, 2009).

**FIGURA 6** – Algumas substâncias químicas isoladas de espécies de *Campomanesia*.

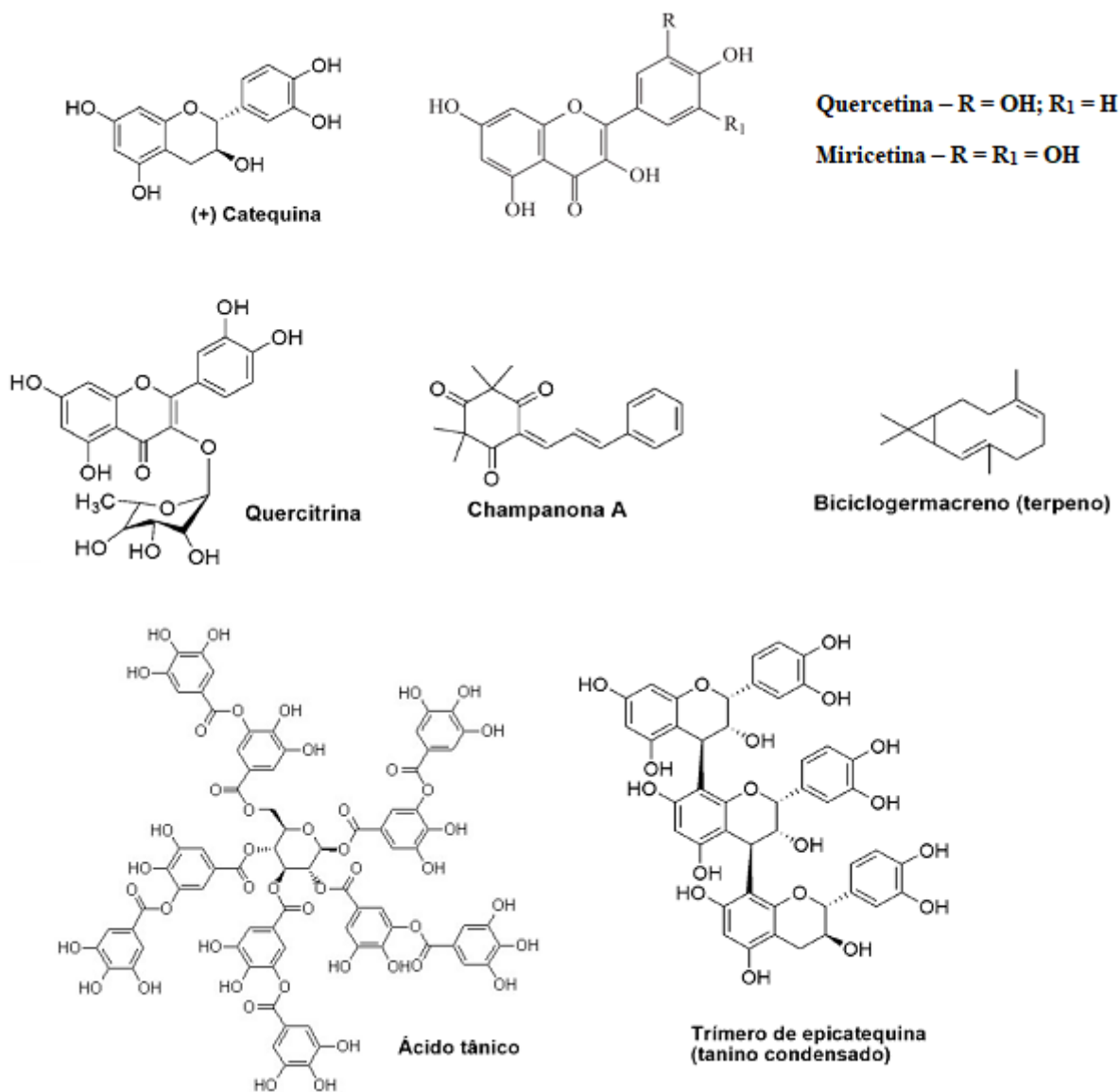


**TABELA 2** – Substâncias/classes químicas identificadas e/ou isoladas e atividades biológicas de espécies do gênero *Campomanesia*.

| <b>Espécie</b>                | <b>Substâncias identificadas e/ou isoladas</b>                                                                                    | <b>Material vegetal</b>                              | <b>Atividade biológica</b>                                                                                                                                                 | <b>Referência</b>                  |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b><i>C. lineatifolia</i></b> | Quercitrina e catequina                                                                                                           | Extrato etanólico e fração acetato de etila (folhas) | Antioxidante e gastroprotetora                                                                                                                                             | Barbosa, 2009                      |
| <b><i>C. guazumifolia</i></b> | Quercetina pentose, quercetina deoxihexosídeo, miricetina deoxihexosídeo e ácido quínico                                          | Extrato aquoso (folhas)                              | Anti-inflamatória                                                                                                                                                          | Catelan <i>et al.</i> , 2018       |
| <b><i>C. xanthocarpa</i></b>  | Flavonoides, saponinas, taninos                                                                                                   | Extrato hidroalcólico (folhas)                       | Antiulcerogênica em ratos; toxicidade aguda com ratos indicando segurança nas doses testadas                                                                               | Markman <i>et al.</i> , 2004       |
|                               | Flavonoides, saponinas, taninos                                                                                                   | Extrato seco (folhas)                                | Redução do colesterol total e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos; antioxidante e inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase <i>in vitro</i>      | Ktafke <i>et al.</i> , 2010        |
|                               | Flavonoides, saponinas, taninos                                                                                                   | Extrato etanólico (frutos)                           | Atividade antidiarreica                                                                                                                                                    | Souza-Moreira <i>et al.</i> , 2011 |
|                               | Taninos, flavonoides (quercetina, miricetina, quercitrina e rutina), saponinas e terpenos                                         | Extrato aquoso (folhas)                              | Atividades antiagregante plaquetária, antitrombótica e fibrinolíticas                                                                                                      | Klafke <i>et al.</i> , 2012        |
| <b><i>C. adamantium</i></b>   | Flavanonas e chalconas (6 substâncias)                                                                                            | Extrato (frutos)<br>Fração acetato de etila          | Atividade anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                                                                                                                          | Pavan <i>et al.</i> , 2009         |
|                               | Monoterpenos (limoneno, $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno e sesquiterpenos (bicyclogermacreno e globulol)                        | Óleo essencial (folhas)                              | Antioxidante e antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>                                                | Coutinho <i>et al.</i> , 2009      |
|                               | Ácido elágico e ácido gálico                                                                                                      | Extrato aquoso (raízes)                              | Atividades antioxidantes e anti-hiperlipidêmicas                                                                                                                           | Espíndola <i>et al.</i> , 2016     |
|                               | 33 substâncias voláteis (majoritários: $\alpha$ -pineno, espatulenol, $\beta$ -eudesmol, $\gamma$ -cadineno, $\gamma$ -muuroleno) | Extrato hexânico (frutos)                            | Antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella setubal</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>C. albicans</i> | Cardoso <i>et al.</i> , 2010       |
|                               | Miricitrina, quercetina e miricetina                                                                                              | Extrato aquoso e acetato de etila (folhas)           | Atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas                                                                                                                           | Ferreira <i>et al.</i> , 2013      |

|                            |                                                                                                                   |                                                  |                                                                                                                                                                            |                                   |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|                            | Cardamonina                                                                                                       | Extrato etanólico (folhas)                       | Atividades anti-proliferativas e efeitos indutores de apoptose em células de câncer de próstata                                                                            | Pascoal <i>et al.</i> , 2014      |
|                            | Dimetil-chalconas, champanona C, champanona D, flavanonas                                                         | Extrato diclorometano (polpa e casca dos frutos) | Anti-proliferativa em células de melanoma                                                                                                                                  | Lima e Silva <i>et al.</i> , 2018 |
|                            | Flavanonas e chalconas (6 substâncias)                                                                            | Extrato metanólico (frutos)                      | Redução da agregação plaquetária e inibição da cicloxigenase                                                                                                               | Lescano <i>et al.</i> , 2018      |
| <b><i>C. phaea</i></b>     | Sesquiterpenos (40 substâncias) e flavonoides (alpinetina O-dideoxihexosídeo, 5,7-dimetoxiflavanona e alpinetina) | Extrato etanólico e óleo essencial (folhas)      | Anti-inflamatória                                                                                                                                                          | Lorençoni <i>et al.</i> , 2020    |
| <b><i>C. pubescens</i></b> | Sesquiterpenos (23 substâncias) e triterpenos                                                                     | Extrato hexânico (folhas)                        | Antioxidante; toxicidade aguda com micro crustáceo indicando segurança nas doses testadas                                                                                  | Cardoso <i>et al.</i> , 2008      |
|                            | 2',4'-diidroxí-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona e 2',4'-diidroxí-5'-metil-6'-metil-6'-metoxichalcona               | Extrato hexânico e acetato de etila (frutos)     |                                                                                                                                                                            | Cardoso <i>et al.</i> , 2013      |
|                            | 34 substâncias voláteis (majoritários: $\alpha$ -pineno, espatulenol, $\beta$ -eudesmol, $\beta$ -cariofileno)    | Extrato hexânico (frutos)                        | Antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella setubal</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>C. albicans</i> | Cardoso <i>et al.</i> , 2010      |
| <b><i>C. reitziana</i></b> | Dimetil-cardamonina (chalcona)                                                                                    | Extrato metanólico (frutos)                      | Anti-nociceptiva                                                                                                                                                           | Nesello <i>et al.</i> , 2016      |

## 2.4 *Campomanesia lineatifolia*

A *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. (**FIGURA 7**) é originária da região oeste da Amazônia e sua distribuição geográfica compreende o estado brasileiro do Amazonas, leste da Colômbia e Peru, parte da Bolívia amazônica além de regiões não inundadas de clima quente e úmido e solos argilosos pouco drenados, podendo ser também encontrada nos vales interandinos. É uma espécie arbórea que pode atingir 8 a 10 metros de altura (D'EECKENBRUGGE e FERLA, 2000).

**FIGURA 7** – *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. 1) Tronco e folhas; 2) Flores; 3) Formação do fruto; 4) Frutos; 5) Frutos em diferentes estágios de maturidade; 6) Frutos maduros para consumo.



Fonte: Adaptado de Balaguera *et al.*, 2009, p. 115.

É conhecida popularmente como gabioba, gavioba, champa, palillo, guayaba de leche ou guayaba de mono. O nome gabioba, em guarani, significa “árvore com casca ácida”. Os frutos são comestíveis e bastante apreciados, sendo utilizados no preparo de doces, sucos e licores (D'EECKENBRUGGE e FERLA, 2000; LORENZI *et al.*, 2006).

Estudos que relacionam a fitoquímica e atividades biológicas para a espécie ainda são escassos na literatura. A análise fitoquímica de sementes de *C. lineatifolia* identificou como principais constituintes as  $\beta$ -tricetonas (BONILLA *et al.*, 2005; OSORIO *et al.*, 2006), consideradas uma classe de metabólitos secundários relativamente rara e que mostraram atividade antimicrobiana (BONILLA *et al.*, 2005). Barbosa *et al.* (2009) isolaram a quercitrina e a catequina e demonstraram que *C. lineatifolia* apresenta elevado teor de fenois, como flavonoides e taninos, além de alta atividade antioxidante, sugerindo a relação de sua utilização etnofarmacológica como antidiarreico, antiúlcera gástrica e cicatrizante. Madalosso *et al.* (2012) demonstraram que extratos etanólico e fração de acetato de etila de *C. lineatifolia* protegeram a mucosa gástrica de ratos contra lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina, e que o efeito gastroprotetor parece estar relacionado com suas atividades antioxidantes e seu conteúdo polifenólico. Ainda, a investigação de toxicidade aguda na dose de 2000 mg/Kg mostrou ausência de morte dos ratos e de alterações graves nos comportamentos e sinais clínicos, indicando a segurança oral aguda da espécie. Henriques *et al.* (2016) demonstraram a atividade anti-TNF- $\alpha$  *in vitro* de *C. lineatifolia*, num estudo de triagem de plantas medicinais brasileiras em células THP-1 estimuladas por LPS, sugerindo sua atividade anti-inflamatória. Assim, a continuidade dos estudos de caracterização química e biológica da espécie *C. lineatifolia* torna-se de importância para relacionar seu uso na medicina tradicional ao tratamento da úlcera gástrica.

Esses resultados prévios associados aos relatos do uso popular da espécie *C. lineatifolia* para o tratamento de distúrbios gastrointestinais suportam a continuidade dos estudos e tornam a espécie promissora como alternativa ou adjuvante no tratamento de úlceras gástricas.

## Referências

- AL BATRAN, R, AL-BAYATY, F, JAMIL AL-OBAIDI, MM, ABDUALKADER, AM, HADI, HA, ALI, HM *et al.* (2013). In vivo antioxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *PLoS One*; 8(5): e64751.
- AL MOFLEH, I. A. *et al.* (2007). Aqueous suspension of anise (*Pimpinella anisum*); protects rats against chemically induced gastric ulcers. *World Journal of Gastroenterology* [S.I.], v. 13, n. 7, p. 1112-1118.
- ALESSANDRI, AL, SOUSA, LP, LUCAS, CD, ROSSI, AG, PINHO, V, TEIXEIRA, MM. (2013). Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & therapeutics*, 139 (2): 189-212.
- ALZHRANI, S, LINA, TT, GONZALEZ, J, PINCHUK, IV, BESWICK, EJ, REYES, V. (2014). Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*, 28; 20(36): 12767-12780.
- ANDREWS, FJ, MALCONTENTI-WILSON, C, O'BRIEN, PE. (1994). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on LFA-1 and ICAM-1 expression in gastric mucosa. *American Journal of Physiology*, vol. 266(4): G657–G664.
- ARAB, HH, SALAMA, SA, OMAR, HA, ARAFA, E-S. A, MAGHRABI, IA. (2015). Diosmin Protects against Ethanol-Induced Gastric Injury in Rats: Novel Anti-Ulcer Actions. *PLoS ONE* 10(3): e0122417.
- ARAKAWA, T, WATANABE, T, TANIGAWA, T, TOMINAGA, K, FUJIWARA, Y, MORIMOTO, K. (2012). Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance. *World J Gastroenterol* 21; 18(35): 4811-4822.
- AUGUSTO, AC, MIGUEL, F, MENDONÇA, S, PEDRAZZOLI, JJR, GURGUEIRA, SA. (2007). Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin Biochem*; 40(9–10):615–622.
- BALAGUERA, HE, ÁLVAREZ, JG, BONILLA, DC. (2009). Crecimiento y desarrollo del fruto de champa (*Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pavón). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 12 (2): 113-123.
- BARBOSA, J. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2009.
- BARKUN, A, LEONTIADIS, G. (2010). Systematic Review of the Symptom Burden, Quality of Life Impairment and Costs Associated with Peptic Ulcer Disease. *American Journal of Medicine* [S.I.], v. 123, n. 4, p. 358-U5.

- BI, WP, MAN, HB, MAN, MQ. (2014). Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. *World J Gastroenterol*, 20 (45): 17020-17028.
- BJARNASON I, SCARPIGNATO C, HOLMGREN E, OLSZEWSKI M, RAINSFORD KD, LANAS A. (2018). Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology*;154(3):500-514.
- BOMBARDIER, C. *et al.* (2000). Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 343, n. 21, p. 1520-1528.
- BONILLA, A. *et al.* (2005). Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry* [S.I.], v. 66, n. 14, p. 1736-1740.
- BRASIL. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p.
- \_\_\_\_\_. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 96 p.
- \_\_\_\_\_. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2020 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 201. 217 p.
- \_\_\_\_\_. Formulário de Fitoterápicos – Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021. 217 p.
- CARDOSO, CAL. *et al.* (2008). Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 297-301.
- CARDOSO, CAL, SALMAZZO, GR, HONDA, NK, PRATES, CB, VIEIRA, MC, COELHO, RG. (2010). Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia Species* (Myrtaceae). *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1273–1276.
- CARDOSO, CAL, SALVADOR, MJ, CARVALHO, JE, COELHO, RG. (2013). Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 72(4): 309-315.
- CARVALHO, A.S.T. (2000). Úlcera péptica. *J Pediatr (Rio J)*;76(Supl.2):s127-s34.
- CASCAES, M.M, GUILHON, GMSP, ANDRADE, EHA, ZOGHBI, MGB, SANTOS, LS. (2015). Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 23881-23904.
- CASTELLSAGUE J, RIERA-GUARDIA N, CALINGAERT B, *et al.* (2012). Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications: a systematic review and meta-analysis of observational studies (the SOS project). *Drug Saf*. 35(12):1127-1146.

- CATELAN, TBS, SANTOS RADAI, JA, LEITÃO, MM, BRANQUINHO, LS, VASCONCELOS, PCP, HEREDIA-VIEIRA, SC, KASSUYA, CAL, CARDOSO, CAL. (2018). Evaluation of the toxicity and anti-inflammatory activities of the infusion of leaves of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg. *J Ethnopharmacol.* 15;226:132-142.
- CHANDRANATH, S. I. *et al.* (2002). A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 173-180.
- CIRAK, MY, AKYÖN, Y, MÉGRAUD, F. (2007). Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 12 (Suppl. 1), 4–9.
- COELHO, LGV *et al.* (2018). IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter Pylori* Infection. *Arq. Gastroenterol.* [online]. 2018, vol.55, n.2 [cited 2021-05-05], pp.97-121.
- COUTINHO, I. D. *et al.* (2009). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [S.I.], v. 45, n. 4, p. 767-776.
- CRABTREE JE, SHALLCROSS TM, HEATLEY RV, WYATT JI. (1991). Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut.* 32(12):1473-7. doi: 10.1136/gut.32.12.1473.
- CRABTREE, JE, PEICHL, P, WYATT, JI, STACHL, U, LINDLEY, IJD. (1993). Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Immunol.* 37: 65-70.
- CRUZ, AVM, KAPLAN, MAC. (2004). Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil (Medicinal use of Myrtaceae and Melastomataceae species in Brazil). *Floresta Ambient.*, 11, 47–52.
- D'EECKENBRUGGE, G.C., FERLA, D.L. Fruits from America: An Ethnobotanical Inventory. Institute for Plant Genetic Resources (IPGRI)/Centre de cooperacion internationale en recherche agronomique pour de developpement. Departement des production fruitieres et horticoles (CIRAD-FLHOR), Cali, Colombia, 2000.
- DROSSMAN, D. A. (2006). The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*, v. 130, p. 1377-1390.
- EL-OMAR, EM. *et al.* (2000). Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology*, 118: 22-30.
- ESPINDOLA, PP, DA ROCHA, P DOS S, CAROLLO, CA, SCHMITZ, WO, PEREIRA, ZV, VIEIRA, MDOC, DOS SANTOS, EL, DE PICOLI SOUZA, K. (2016). Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:7910340.

- FAN XJ, CHUA A, O'CONNELL MA, *et al.* (1993). Interferon-gamma and tumor necrosis factor production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Ir J Med Sci.* 162: 408–11.
- FERREIRA, LC, GRABE-GUIMARÃES, A, DE PAULA, CA, MICHEL, MC, GUIMARÃES, RG, REZENDE, SA, DE SOUZA FILHO, JD, SAÚDE-GUIMARÃES, DA. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol.* Jan 9;145(1):100-8.
- FERREIRA JÚNIOR, M, DE ASSIS BATISTA, S, CALVÃO BARBUTO, R, DIAS GOMES, A, MARIA MAGALHÃES QUEIROZ, D, DUVAL ARAÚJO, I, VIDIGAL CALIARI, M. (2017). *Helicobacter pylori* Containing More Phosphorylation Sites of the CagA Protein Induces Greater Reduction of Gastric Mucins. *Asian Journal of Medicine and Health*, 5(4), 1-9.
- FINE, M. (2013). Quantifying the impact of NSAID-associated adverse events. *Am J Manag Care.* Nov;19(14 Suppl):s267-72.
- GOH, KL, CHAN, WK, SHIOTA, S, YAMAOKA, Y. (2011). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter* 16 (Suppl. 1), 1–9.
- GOMES, SM. *et al.* (2009). Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Botânica Brasilica*, v. 23, n. 1, p. 224-238.
- GOVAERTS, R, SOBRAL, M, ASHTON, P, BARRIE, F, HOLST, BK, LANDRUM, LR, MATSUMOTO, K, MAZINE, FF, NIC LUGHADHA, E, PROENÇA, CEB, SILVA, LHS, WILSON, PG, LUCAS, EJ. (2008). World Checklist of Myrtaceae, vol. 1. Royal Botanic Garden, Kew, pp. 57–59.
- GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; *et al.* (2014). *Word Checklist of Myrtaceae*; Kew Publishing, Royal Botanic Gardens: Kew, UK.
- GRESSLER E. P. *et al.* (2006). Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, n. 4, p.509-530.
- GUDIS, K & SAKAMOTO, C. (2005). The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 50, no. 1, pp. S16–S23.
- HAYDEN, MS. and GHOSH, S. (2014). Regulation of NF-κB by TNF family cytokines. *Semin Immunol.*; 26(3):253-66.
- HENRIQUES, BO. *et al.* (2016). In Vitro TNF-α Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of Stryphnodendron adstringens in an Acute Arthritis Model. *Evid Based Complement Alternat Med.*, v. 2016, Article ID 9872598, 15 pages.
- HERNANDEZ-DIAZ, S, RODRIGUEZ, LAG. (2002). Incidence of serious upper gastrointestinal bleeding/perforation in the general population: Review of epidemiologic studies. *Journal of Clinical Epidemiology* [S.I.], v. 55, n. 2, p. 157-163.

- HODEK, P. *et al.* (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* [S.I.], v. 139, n. 1, p. 1-21.
- HOOI JKY, LAI WY, NG WK, SUEN MMY, UNDERWOOD FE, TANYINGOH D, MALFERTHEINER P, GRAHAM DY, WONG VWS, WU JCY, CHAN FKL, SUNG JJY, KAPLAN GG, NG SC. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*;153(2):420-429.
- HUNT RH, MALFERTHEINER P, YEOMANS, ND *et al.* (1995). Critical issues in the pathophysiology and management of peptic ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 7: 685-99.
- ISRAEL, DA & PEEK, RM. (2001). Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15: 1271-90.
- JAIN, SK *et al.* (2007). Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 15, n. 3, p. 1181-1205.
- JÚNIOR, MF; BATISTA, SA; BARBUTO, RC; GOMES, AD; QUEIROZ, DMM; ARAÚJO, ID; CALIARI, MV. (2016). CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites produces increase of G cell and decrease of D cell in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Adv Med Sci-Poland*, v. 61, p. 231-236.
- KAMADA T, SATOH K, ITOH T, ITO M, IWAMOTO J, OKIMOTO T, KANNO T, SUGIMOTO M, CHIBA T, NOMURA S, MIEDA M, HIRAISHI H, YOSHINO J, TAKAGI A, WATANABE S, KOIKE K. (2021). Evidence-based clinical practice guidelines for peptic ulcer disease 2020. *J Gastroenterol*;56(4):303-322.
- KLAFKE, JZ, ARNOLDI DA SILVA, M, FORTES ROSSATO, M, TREVISAN, G, BANDERÓ WALKER, CI, MARTINS LEAL, CA, OLSCHOWSKY BORGES, D, CHITOLINA SCHETINGER, MR, NOAL MORESCO, R, MEDEIROS FRESCURA DUARTE, MM, SOARES DOS SANTOS, AR, NAZÁRIO VIECILI, PR, FERREIRA, J. (2012). Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:954748.
- KONTUREK, SJ, KONTUREK, PC, PAWLIK, T, SLIWOWSKI, Z, OCHMANSKI, W, HAHN, EG. (2004). Duodenalmucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 55, pp. 5–17.
- KTAFKE, JZ. *et al.* (2010). Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 127, n. 2, p. 299-305.
- LANDRUM, LR. (1986). *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium* and *Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropica Monographs* 45: 7–72.
- LANGHORST, J. *et al.* (2005). Amount of systemic steroid medication is a strong predictor for the use of complementary and alternative medicine in patients with inflammatory bowel

- disease - Results from a German national survey. *Inflammatory Bowel Diseases* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 287-295.
- LESCANO, C. H. *et al.* (2018). Effect of Polyphenols From *Campomanesia adamantium* on Platelet Aggregation and Inhibition of Cyclooxygenases: Molecular Docking and in Vitro Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 9:617, 1-13.
- LIMA E SILVA, MCB, BOGO, D, ALEXANDRINO, CAF, PERDOMO, RT, FIGUEIREDO, PO, DO PRADO, PR, GARCEZ, FR, KADRI, MCT, XIMENES, TVN, GUIMARÃES, RCA, SARMENTO, UC, MACEDO, MLR. (2018). Antiproliferative Activity of Extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and Isolated Compound Dimethylchalcone Against B16-F10 Murine Melanoma. *J Med Food*, Oct;21(10):1024-1034.
- LIU, Y, TIAN, X, GOU, L, FU, X, LI, S, LAN, N. *et al.* (2012). Protective effect of l-citrulline against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*; 34(2): 280–287.
- LORENÇONI, MF, FIGUEIRA, MM, TOLEDO E SILVA, MV, PIMENTEL SCHMITT, EF, ENDRINGER, DC, SCHERER, R, BARTH, T, VILELA BERTOLUCCI, SK, FRONZA, M. (2020). Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *J Ethnopharmacology*. 24;252:112562.
- LORENZI, H, BACHER, L, LACERDA, M, SARTORI, S. Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas: (de consumo in natura). *Instituto Plantarum*, São Paulo, 2006.
- MADALOSSO, RC. *et al.* (2012). *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 772-779.
- MALFERTHEINER, P. *et al.* (2009). Peptic ulcer disease. *Lancet* [S.I.], v. 374, n. 9699, p. 1449-1461.
- MARKMAN, BEO, BACCHI, EM, KATO, ETM. (2004). Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 1, p. 55-57.
- MCCAFFERTY, DM, GRANGER, DN. and WALLACE, JL. (1995). Indomethacin-induced gastric injury and leukocyte adherence in arthritic versus healthy rats. *Gastroenterology*, vol. 109(4): 1173–1180.
- MCCARBERG B, GIBOFSKY A. (2012). Need to develop new nonsteroidal anti-inflammatory drug formulations. *Clin Ther*. 34(9):1954- 1963.
- MISIEWICZ, JJ. (1995). Current insights in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J. Gastroenterol Hepatol*. 7: 701-3.
- MOTA, K. S. D. *et al.* (2009). Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 979-1012.

- MUSTAFA, M, MENON, J, MUIANDY, RK, FREDIE, R, SEIN, MM, FARIZ, A. (2015). Risk Factors, Diagnosis, and Management of Peptic ulcer Disease. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 14 (7): 40-46.
- MUSUMBA, C. et al. (2009). Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [S.I.], v. 30, n. 6, p. 517-531.
- MYNATT, RP, DAVIS, GA, ROMANELLI, F. (2009). PepticUlcer Disease: Clinically Relevant Causes and Treatment. *Orthopedics*; 32(2):104.
- NESELLO, LA, CAMPOS, A, WAGNER, T, FELICIANO, AS, DE CAMPOS BUZZI, F, FILHO, VC. (2016). Chemical Composition and Antinociceptive Potential of *Campomanesia reitziana* Fruits. *J Med Food*. May;19(5):518-20.
- NOACH, LA, BOSMA, NB, JANSEN, J, HOEK, FJ, VAN DEVENTER, SJ, TYTGAT, GN. (1994). Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol*. 29:425–429.
- NOROOZI, M. et al. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition* [S.I.], v. 67, n. 6, p. 1210-1218.
- OLIVEIRA, A.F, CARVALHO, JR, COSTA, MFS, LOBATO, LCP, SILVA, RS, SCHRAMM, JMA. (2015). Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 24, p. 45-154.
- OSORIO, C. et al. (2006). Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 54, n. 2, p. 509-516.
- PASCOAL, AC, EHRENFRIED, CA, LOPEZ, BG, DE ARAUJO, TM, PASCOAL, VD, GILIOLI, R, ANHÊ, GF, RUIZ, AL, CARVALHO, JE, STEFANELLO, ME, SALVADOR, MJ. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules*. Feb 7;19 (2):1843-55.
- PAVAN, FR. et al. (2009). Evaluation of anti-Mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). *Química Nova* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 1222-1226.
- PAWLIK MW, KWIECIEN S, PTAK-BELOWSKA A, PAJDO R, OLSZANECKI R, SUSKI M, MADEJ J, TARGOSZ A, KONTUREK SJ, KORBUT R, BRZOSOWSKI T. (2016). The renin-angiotensin system and its vasoactive metabolite angiotensin-(1-7) in the mechanism of the healing of preexisting gastric ulcers. The involvement of Mas receptors, nitric oxide, prostaglandins and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol.*; 67(1):75-91.

- PRASAD, M , & FRIEDMAN , L. (2018). Peptic ulcer disease . In S. Srinivasan & L. Friedman (Eds.), *Essentials of gastroenterology* (2nd ed ., pp. 35 – 44 ). Hoboken, NJ : Wiley.
- PRZYBYŁA GW, SZYCHOWSKI KA, GMIŃSKI J. (2020). Paracetamol - An old drug with new mechanisms of action. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- SAHOO, N. *et al.* (2010). Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* [S.I.], v. 81, n. 6, p. 462-471.
- SAIRAM, K. *et al.* (2001). Prophylactic and curative effects of *Bacopa monniera* in gastric ulcer models. *Phytomedicine* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 423-430.
- SALGA, MS, ALI, HM, ABDULLA, MA, ABDELWAHAB, SI. (2012). Gastroprotective activity and mechanism of novel dichlorido-zinc(II)-4-(2-(5-methoxybenzylideneamino) ethyl) piperazin-1-iumphenolate complex on ethanol-induced gastric ulceration. *Chem Biol Interact*; 195(2):144–153.
- SANGIOVANNI, E, VRHOVSEK, U, ROSSONI, G, COLOMBO, E, BRUNELLI, C, BREMBATI, L. *et al.* (2013). Ellagitannins from *Rubus berries* for the control of gastric inflammation: in vitro and in vivo studies. *PLoS One*; 8(8): e71762.
- SANTOS, FA. & RAO, VS. (2001). 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Dig Dis Sci*; 46(2):331–337.
- SANTOS-OLIVEIRA, R. *et al.* (2009). Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas [S.I.], v. 19, n. 2 B, p. 650-659.
- SANTUCCI, L, FIORUCCI, S, GIANSAANTI, M, BRUNORI, PM, DI MATTEO, FM and A. MORELLI, A. (1994). Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumor necrosis factor alpha. *Gut*, vol. 35(7): 909–915.
- SCARPIGNATO, C, HUNT, RH. (2010). Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: clinical picture, pathogenesis, and prevention. *Gastroenterol Clin North Am*. 39:433–64.
- SCHNITZER, TJ. *et al.* (2004). Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: Randomised controlled trial. *Lancet* [S.I.], v. 364, n. 9435, p. 665-674.
- SEIBERT, K and MASFERRER, JL. (1994). Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*, vol. 4, no. 1, pp. 17–23.
- SEIBERT, K, ZHANG, Y, LEAHY, K *et al.* (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 25, pp. 12013–12017.

- SEPÚLVEDA, AR. (2001). Molecular testing of *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions. *J. Clin. Gastroenterol.*, 32(5): 377-82.
- SHARMA, M, VERMA, A, CHAUHAN, R, KEDAR, M, KULSHRESTHA, R (2019). Study of cyclooxygenase-3 on the bases of its facts and controversies. *IJPSR*, 10, pp. 387-392.
- SHIM, YK, KIM, N. (2016). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug and Aspirin-induced Peptic Ulcer Disease. *Korean J Gastroenterol.* 25;67(6):300-12.
- SILVA, M. S. *et al.* (2006). Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. *Acta bot. bras.*, v.20, n. 4, p. 815-829.
- SILVERSTEIN, FE. *et al.* (2000). Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis - The CLASS study: A randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* [S.I.], v. 284, n. 10, p. 1247-1255.
- SILVERSTEIN, FE, GEIS, GS. (1996). Misoprostol and gastrointestinal complications in patients taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs for rheumatoid arthritis - Response. *Annals of Internal Medicine* [S.I.], v. 124, n. 10, p. 927-927.
- SINHA, M, GAUTAM, L, SHUKLA, PK, KAUR, P, SHARMA, S e SINGH, TP. (2013). Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, vol. 2013, Article ID 258209, 11 pages.
- SMOOTH, DT, GO, MF, CRYER, B. (2001). Peptic Ulcer Disease. *Primary Care.* 28(3): 487-499.
- SOBRAL, M, PROENÇA, C, SOUZA, M, MAZINE, F, LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 20 Mar. 2019.
- SOUZA-MOREIRA, TM, SALVAGNINI, LE, SANTOS, E, SILVA, VY, MOREIRA, RR, SALGADO, HR, PIETRO, RC. (2011). Antidiarrheal activity of *Campomanesia xanthocarpa* fruit. *J Med Food.* May;14(5):528-31.
- STRIZ, I, BRABCOVA, E, KOLESAR, L, SEKERKOVA, A. (2014). Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci (Lond).* 126 (9): 593–612.
- THAMLIKITKUL, V. *et al.* (1989). Randomized double blind study of Curcuma domestica Val. for dyspepsia. *Journal of the Medical Association of Thailand* [S.I.], v. 72, n. 11, p. 613-620.
- VANE, JR. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology*, vol. 43, pp. 232–235.
- WALLACE, JL. (1997). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology*, vol. 112, no. 3, pp. 1000–1016.

- WALLACE, JL, FERRAZ, JGP. (2010). New Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* [S.I.], v. 39, n. 3, p. 709-720.
- WALLACE, JL, KEENAN, CM, GRANGER, DN. (1990). Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol*; 259: G462–467.
- WANG, F, MENG, W, WANG, B, and QIAO, L. (2014). *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 345, 196–202.
- WHO - World Health Organization. Peptic Ulcer Disease “Pharmaceuticals Closing a Surgical Gap”. Annex to Chapter 1. Priority Medicines for Europe and the World "A Public Health Approach to Innovation". Sept. 2004.
- YAMAOKA Y, KITA M, KODAMA T, *et al.* (1996). *Helicobacter pylori cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology*; 110: 1744–52.
- YEOH, KG. *et al.* (1995). Chili protects against aspirin-induced gastroduodenal mucosal injury in humans. *Digestive Diseases and Sciences* [S.I.], v. 40, n. 3, p. 580-583.

---

## CAPÍTULO 3: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

---

### 3.1 Introdução

Em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (MADALOSSO *et al.*, 2012; BARBOSA, 2009), a investigação preliminar dos constituintes químicos em extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia* obtido por percolação mostrou a sua natureza flavonoídica. Este extrato foi posteriormente submetido a partições sucessivas com hexano, diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol, revelando que a planta *Campomanesia lineatifolia* é rica em polifenóis, com quantidades expressivas tanto de taninos (~ 18% para o extrato etanólico) quanto de flavonoides (~ 9% para a fração AcOEt). A presença de flavonoides foi confirmada não apenas no doseamento realizado, mas também pelas análises fitoquímicas das frações AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e extrato etanólico. Apesar do perfil obtido, o processo utilizado foi longo (acima de 48 horas) e envolveu o consumo de grande quantidade de solventes (aproximadamente 2 litros). Ainda neste trabalho, duas substâncias foram isoladas e identificadas por técnicas espectroscópicas, a catequina (flavan-3-ol) e a quercitrina (flavonol). Assim, buscou-se neste trabalho o desenvolvimento de um processo extrativo de execução mais simples e rápida e de menor custo para obtenção de extrato de *C. lineatifolia* rico em flavonoides.

### 3.2 Materiais e métodos

#### 3.2.1 Material vegetal

A coleta das folhas de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. foi realizada em fevereiro de 2017, em um remanescente de mata, no campus da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG (GPS 19° 52' 9.87'' S; 43° 58' 12.04'' W). O material vegetal foi identificado pelo Dr. Marcos Sobral e uma exsiccata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número BHCB 150606. O registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi realizado e tem o código A216C7C.

### 3.2.2 Obtenção de extratos

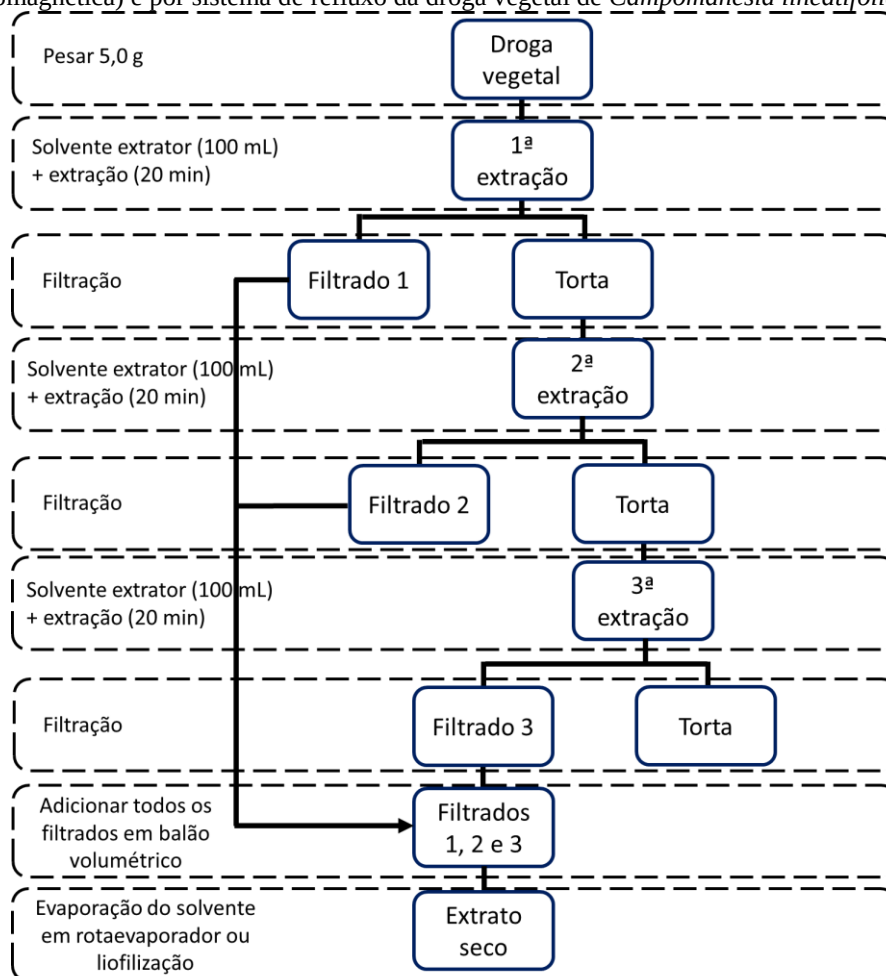
Após a coleta, as folhas de *C. lineatifolia* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar e temperatura de 40 °C, por 72 horas. Em seguida, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas. Porções do material vegetal seco e pulverizado (droga vegetal) foram submetidas a diferentes métodos extrativos em diferentes solventes ou misturas desses, descritos a seguir.

#### 3.2.2.1 Extração por maceração em banho de ultrassom

Pesaram-se 5,0 g do material vegetal seco e pulverizado num béquer de vidro de 250 mL, adicionaram-se 100 mL de solvente extrator e a solução foi então submetida à extração por maceração auxiliada por banho de ultrassom, à temperatura ambiente, durante vinte minutos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para tubos de centrífuga de 14 mL e centrifugados a 1.400 *g* (Centrífuga Edutech, modelo EEQ-9004/B), durante cinco minutos. O sobrenadante foi filtrado em funil contendo algodão para um balão volumétrico. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e os extratos obtidos reunidos no balão volumétrico foram evaporados em rotaevaporador ( $T = 60^{\circ}\text{C}$ ) (Evaporador rotatório Buchi, modelo R-114 e waterbath B-480) e liofilizados (Liofilizador Liotop, modelo L101), para aqueles que continham água, até a completa eliminação do solvente, obtendo-se, assim, os extratos brutos secos (**FIGURA 8**).

Neste método extrativo, os seguintes solventes e misturas de solventes extratores foram utilizados: etanol comercial 96°GL – 92,8°INPM (EtOH); metanol (MeOH); água (H<sub>2</sub>O), EtOH: H<sub>2</sub>O 8:2 v/v; EtOH: H<sub>2</sub>O 7:3 v/v; EtOH: H<sub>2</sub>O 1:1 v/v; EtOH: H<sub>2</sub>O 3:7 v/v; EtOH: H<sub>2</sub>O 2:8 v/v; AcOEt e EtOH: AcOEt 1:1 v/v.

**FIGURA 8** – Fluxograma dos métodos extrativos por maceração (por ultrassom ou agitação eletromagnética) e por sistema de refluxo da droga vegetal de *Campomanesia lineatifolia*.



### 3.2.2.2 Extração contínua em sistema de refluxo

Pesaram-se 5,0 g do material vegetal seco e pulverizado num béquer de vidro de 250 mL e transferiram-se para um balão volumétrico. Então, foram adicionados 100 mL de solvente extrator e a solução foi então submetida à extração por refluxo sob aquecimento ( $T = 90^{\circ}\text{C}$ ), durante vinte minutos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para tubos de centrífuga de 14 mL e centrifugados a 1.400  $g$  (Centrífuga Centrífuga Edutech, modelo EEQ-9004/B), durante cinco minutos. O sobrenadante foi filtrado em funil contendo algodão para um segundo balão volumétrico. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e os extratos obtidos reunidos no balão volumétrico foram evaporados em rotaevaporador ( $T = 60^{\circ}\text{C}$ ) (Evaporador rotatório Buchi, modelo R-114 e waterbath B-480) ou liofilizados (Liofilizador Liotop, modelo L101) até a completa eliminação do solvente, obtendo-se, assim, os extratos brutos secos (**FIGURA 8**).

Neste método extrativo, os seguintes solventes extratores e misturas foram utilizados: etanol comercial 96°GL – 92,8°INPM (EtOH); EtOH: H<sub>2</sub>O 8:2 v/v e EtOH: AcOEt 1:1 v/v.

#### 3.2.2.3 Extração por maceração em agitação eletromagnética

Pesaram-se 5,0 g do material vegetal seco e pulverizado num béquer de vidro de 250 mL, adicionaram-se 100 mL de solvente extrator e a solução foi então submetida à extração por maceração em agitação eletromagnética em chapa aquecida à temperatura de  $50 \pm 5$  °C, durante vinte minutos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para tubos de centrífuga de 14 mL e centrifugados a 1.400 g (Centrífuga Edutech, modelo EEQ-9004/B), durante cinco minutos. O sobrenadante foi filtrado através de funil contendo algodão para um balão volumétrico. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e os extratos obtidos reunidos no balão volumétrico foram evaporados em rotaevaporador (T = 60°C) (Evaporador rotatório Buchi, modelo R-114 e waterbath B-480) ou liofilizados (Liofilizador Liotop, modelo L101) até a completa eliminação do solvente, obtendo-se, assim, os extratos brutos secos (**FIGURA 8**).

Neste método extrativo, os seguintes solventes extratores e misturas foram utilizados: etanol comercial 96°GL – 92,8°INPM (EtOH); EtOH: H<sub>2</sub>O 8:2 v/v e EtOH: AcOEt 1:1 v/v.

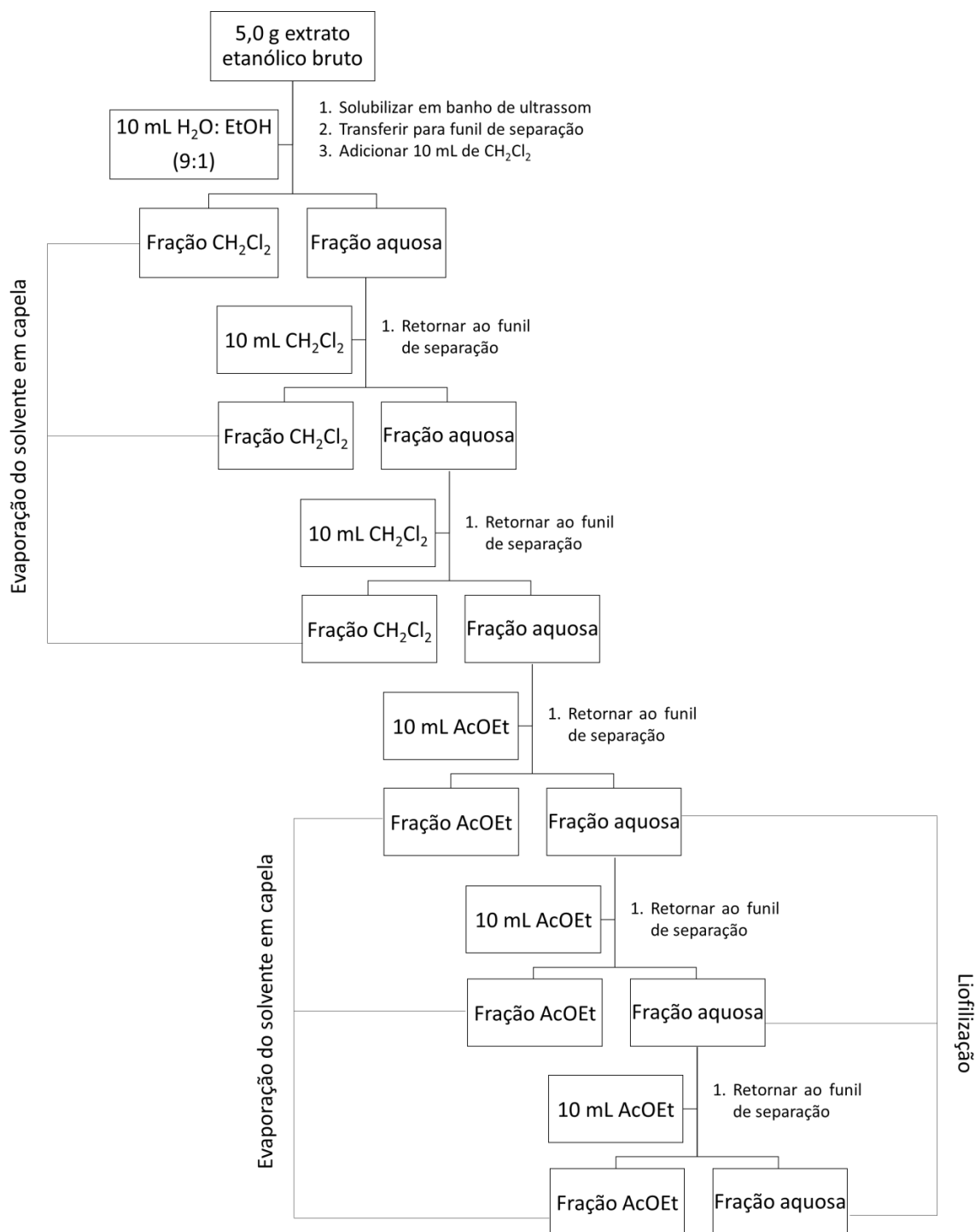
#### 3.2.2.4 Extração líquido-líquido a partir do extrato etanólico seco

Pesou-se 0,5 g do extrato etanólico, obtido na extração por maceração e banho ultrassônico (item 5.2.1.1) em um béquer de 50 mL, adicionaram-se 10 mL da mistura de solventes H<sub>2</sub>O: EtOH (9:1 v/v) e a solução, então, foi submetida à banho de ultrassom até completa solubilização. Em seguida, a solução foi transferida para um funil de separação de 125 mL e foram adicionados 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O funil de separação foi agitado e aguardou-se a separação das fases. A fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi recolhida e reservada. À fração aquosa remanescente no funil foi adicionado novamente 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, repetindo-se o procedimento mais duas vezes.

Após as extrações com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, foram adicionados à fração aquosa no funil de separação 10 mL de AcOEt e o sistema foi submetido a agitação, aguardando-se, posteriormente, a separação

das fases. A fração em AcOEt foi recolhida e o mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes na fração aquosa remanescente (**FIGURA 9**).

**FIGURA 9** – Fluxograma da partição líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico obtido por maceração por banho de ultrassom da droga vegetal de *Campomanesia lineatifolia*.

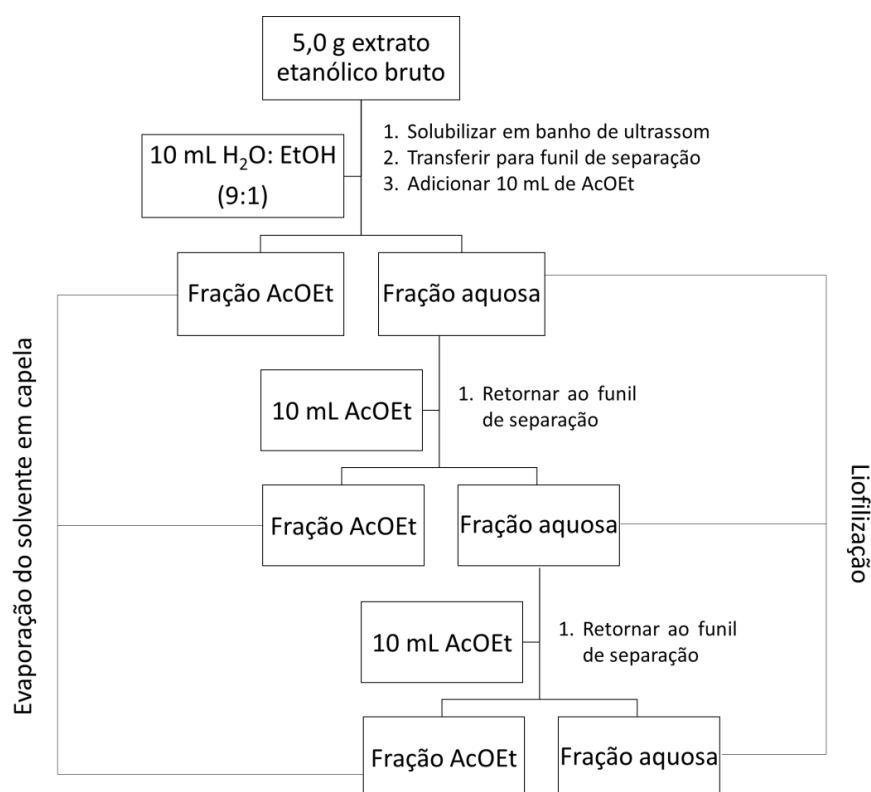


Legenda:  $\text{H}_2\text{O}$ : EtOH = água: etanol;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  = diclorometano; AcOEt = acetato de etila.

As frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e AcOEt (fração AcOEt PLL1) reunidas foram evaporadas em capela e a fração aquosa (fração aquosa PLL1) foi liofilizada (Liofilizador Liotop, modelo L101) até a

completa eliminação do solvente, obtendo-se, assim, os extratos brutos secos. O mesmo procedimento de extração líquido-líquido descrito acima foi realizado com o extrato etanólico bruto, obtido por maceração em banho ultrassônico, utilizando-se como solvente extrator apenas acetato de etila, obtendo-se ao final as frações aquosa e acetato de etila (PLL2) (**FIGURA 10**).

**FIGURA 10** – Fluxograma da partição líquido-líquido com acetato de etila do extrato etanólico obtido por maceração por banho de ultrassom da droga vegetal de *Campomanesia lineatifolia*.

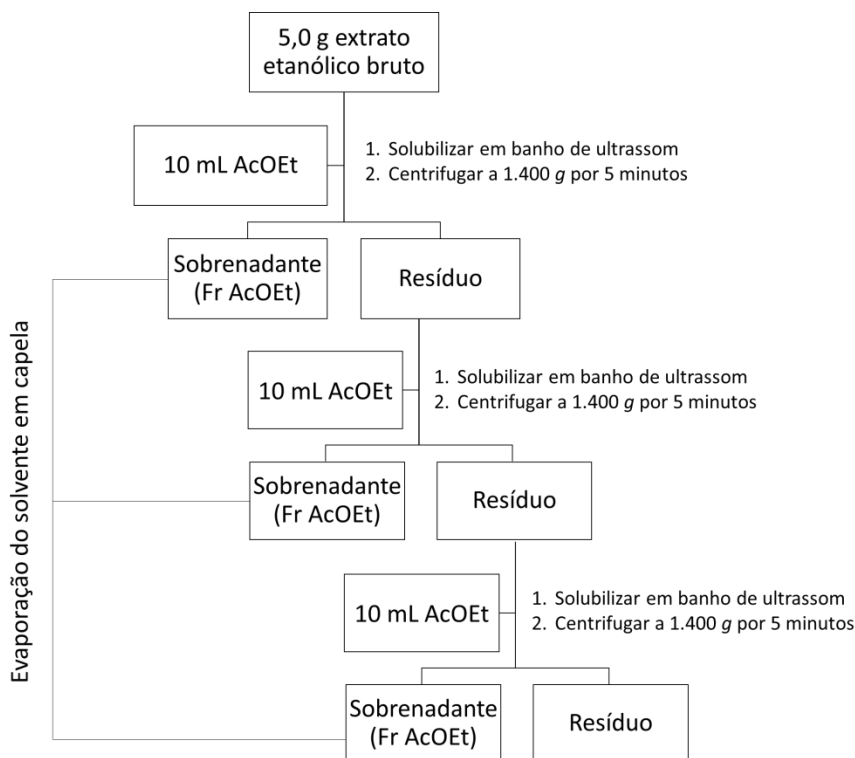


Legenda: H<sub>2</sub>O: EtOH = água: etanol; AcOEt = acetato de etila.

### 3.2.2.5 Extração sólido-líquido a partir do extrato etanólico seco

Pesou-se 0,5 g do extrato etanólico seco, obtido por maceração em banho ultrassônico (item 5.2.1.1) em um tubo de centrífuga de 14 mL, adicionaram-se 10 mL do solvente AcOEt e a solução, então, foi submetida à banho de ultrassom até solubilização. Em seguida, a solução foi centrifugada a 1.400 g (Centrífuga Edutec, modelo EEQ-9004/B), durante cinco minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi recolhido e reservado e, ao resíduo, foram novamente adicionados 10 mL de AcOEt, repetindo-se o procedimento mais duas vezes (**FIGURA 11**). As frações AcOEt (PSL) reunidas foram evaporadas em capela até a completa eliminação do solvente, obtendo-se, assim, o extrato bruto seco.

**FIGURA 11** – Fluxograma da extração sólido-líquido com acetato de etila do extrato etanólico obtido por maceração em banho de ultrassom da droga vegetal de *Campomanesia lineatifolia*.



Legenda: Fr AcOEt = fração acetato de etila.

### 3.2.3 Análise cromatográfica por CLAE/DAD

Preliminarmente, a fim de se avaliarem os diferentes solventes e misturas de solventes, para a otimização da obtenção de extratos ricos em fenólicos, foram obtidos os perfis cromatográficos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) de todos os extratos obtidos por maceração auxiliada por banho ultrassônico (item 3.2.1.1) e partições líquido-líquido (item 3.2.1.4) e sólido-líquido (item 3.2.1.5). As soluções foram preparadas a partir dos extratos obtidos da droga vegetal de *C. lineatifolia* (item 3.2.1) na concentração de 10 mg/mL, em metanol grau CLAE (Dinâmica – Química Contemporânea Ltda). Para tanto, pesaram-se 10,0 mg dos extratos em microtubos plásticos e adicionou-se 1,0 mL de metanol grau CLAE. A dissolução foi realizada com o auxílio de um banho ultrassônico por 20 minutos. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de 2 mL.

Para análise por CLAE (Alliance - Waters, equipado com injetor automático 2695, detector de arranjo de diodos 2996, bomba L-6200A, integrador C-R4A e programa Empower para processamento de dados) foi empregado o método previamente descrito por Barbosa (2009)

para análise dos extratos de *C. lineatifolia*. A coluna utilizada foi a de fase reversa C18 (LiChrospher® 100 RP-18, partículas de 5 µm, 125 x 4 mm d.i), pré-coluna de mesma marca, fase e tamanho de partícula, volume de injeção 10 µL e fluxo de 1 mL/min, com temperatura de 40°C. A leitura foi realizada em  $\lambda$  210 nm, sendo registrados em uma faixa espectral de  $\lambda$  200 a 600 nm.

A fase móvel empregada foi composta de acetonitrila (ACN) grau CLAE (Merck) e água destilada (filtrada em sistema Milli-Q), contendo 0,1% de ácido fosfórico, na proporção inicial 95:5, com gradiente linear de 60% a 40% de água em 60 minutos, conforme **Tabela 3**.

**TABELA 3** – Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE dos extratos brutos e frações obtidos por diferentes solventes, a partir da droga vegetal de *Campomanesia lineatifolia*.

| MATERIAL ANALISADO | TEMPO (min.) | ÁGUA/ÁCIDO* | ACETONITRILA/ÁCIDO* (%) |
|--------------------|--------------|-------------|-------------------------|
|                    | 0            | 95          | 5                       |
| Extrato bruto e    | 60           | 60          | 40                      |
| frações            | 70           | 95          | 5                       |

\*ÁCIDO (%): corresponde à adição de 0,1% de ácido fosfórico aos solventes água e acetonitrila.

Fonte: Adaptado de Barbosa, 2009, p. 44.

### 3.2.4 Análise cromatográfica por CLUE/DAD

Após a análise dos perfis cromatográficos obtidos preliminarmente por CLAE, os solventes / misturas de solventes que apresentaram resultados extrativos otimizados, em função do teor de fenólicos, foram selecionados, e seus perfis cromatográficos analisados por Cromatografia Líquida de ultra Eficiência (CLUE) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD), para seleção e posterior identificação de marcadores químicos. Ainda, após a seleção dos melhores solventes e misturas de solventes, foi realizado um planejamento experimental, utilizando-se diferentes métodos extrativos (extração contínua em sistema de refluxo, item 3.2.1.2 e maceração em agitação eletromagnética, item 3.2.1.3), em comparação à maceração auxiliada por banho ultrassônico, com o objetivo de melhorar os resultados da otimização obtida anteriormente. Cabe ressaltar que, esta última avaliação foi realizada apenas pela análise dos perfis cromatográficos obtidos por CLUE, tendo em vista que a seleção preliminar com os solventes e misturas de solventes havia sido realizada utilizando-se os perfis obtidos por CLAE.

Para tanto, foram preparadas soluções dos extratos obtidos da droga vegetal de *C. lineatifolia* (item 3.2.1) na concentração de 5 mg/mL, em metanol grau CLAE, preparadas conforme descrito no item 3.2.3.

A condição cromatográfica utilizada consistiu na utilização de sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC Acquity System® acoplado a detector UV/DAD, coluna Acquity UPLC® BEH C18 (100 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm), pré-coluna VanGuard™ C18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm), temperatura do forno 40 °C, fase móvel em gradiente linear, utilizando-se água ultrapura e acetonitrila grau CLAE, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, conforme descrito na **Tabela 4**, fluxo 0,3 mL/ min, comprimento de onda de detecção em 210 nm, sendo registrados em uma faixa espectral de  $\lambda$  200 a 600 nm e volume de injeção: 2,0 µL. Para obtenção da condição cromatográfica por CLUE foi utilizado o sistema de conversão *Acquity UPLC Calculator (Empower)*.

**TABELA 4** – Sistema de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLUE-DAD dos extratos otimizados ricos em fenólicos selecionados, obtidos da droga vegetal de *Campomanesia lineatifolia*.

| TEMPO (min.) | ÁGUA/ÁCIDO* | ACETONITRILA/ÁCIDO* (%) |
|--------------|-------------|-------------------------|
| 0            | 95          | 5                       |
| 48           | 60          | 40                      |
| 56           | 95          | 5                       |

\*ÁCIDO (%): corresponde à adição de 0,1% de ácido fórmico aos solventes água e acetonitrila.

### 3.2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Graph Prism* versão 6.0. Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. A comparação entre dois grupos foi realizada empregando-se o teste “*t* de *Student*” não pareado. Para a comparação de mais de dois grupos, foi empregado o teste *One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Tukey para comparações múltiplas de pequenas amostras. A escolha desses testes foi realizada de acordo com a dispersão relativa dos dados na estatística descritiva e  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### 3.3 Resultados e discussão

Sabe-se que os flavonoides são encontrados em plantas, principalmente na sua forma glicosilada, ou seja, com açúcares ligados às suas estruturas, podendo ser O-glicosiladas e C-glicosiladas, sendo a D-glicose e L-ramnose os açúcares mais comuns (HERMANN, 1988; ERLUND, 2004). O efeito da glicosilação faz com que os flavonoides apresentem uma maior solubilidade em água e, por isso, soluções aquosas e hidroalcoólicas podem ser consideradas mais adequadas para extração destas substâncias. Já para as agliconas de flavonoides menos polares, como isoflavonas, flavanonas, flavonas e flavonóis, podem ser extraídos utilizando-se solventes de baixa a média polaridade como clorofórmio, diclorometano, éter etílico ou acetato de etila (ANDERSEN e MARKHAM, 2006). Neste trabalho, foram avaliadas misturas de etanol e água em diferentes proporções (80:20, 70:30, 50:50, 30:70 e 20:80), além de solventes puros – EtOH comercial, MeOH e AcOEt – para extração do material vegetal. Em decorrência da indicação na tradição popular do consumo medicinal de chá das folhas de *C. lineatifolia*, somada a alta polaridade dos flavonoides presentes, realizou-se, ainda, a extração utilizando-se água.

Os materiais vegetais são comumente extraídos empregando-se solventes líquidos, devido à sua ampla aplicabilidade, eficiência e facilidade de utilização (SHARMA e GUPTA, 2015; SAFDAR *et al.* 2017). A técnica, denominada extração sólido-líquido, em geral, envolve a secagem e moagem do material vegetal e a escolha de um solvente e de um procedimento adequado para a extração das substâncias de interesse (SHARMA e GUPTA, 2015). Inicialmente, foi utilizado o método extrativo por maceração auxiliado por banho ultrassônico das folhas secas e trituradas de *C. lineatifolia*, conforme descrito no item 3.2.1.1, realizados em triplicata, para cada solvente e mistura de solventes. A escolha por esse método deveu-se em função de se tratar de um método de execução rápida, simples e não-laboriosa, com menor consumo de solventes, tornando-se uma alternativa ambientalmente sustentável para obtenção de extratos (MACHADO *et al.*, 2017). O **GRÁFICO 1** demonstra os resultados do rendimento (m/m%) desta primeira extração efetuada.

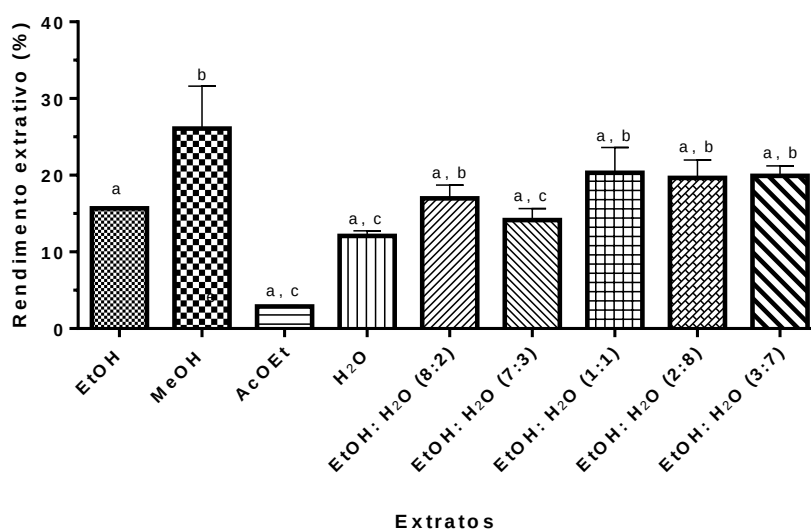


**GRÁFICO 1** – Rendimentos extrativos (m/m) dos extratos de *Campomanesia lineatifolia* obtidos por maceração auxiliada por banho ultrassônico, empregando-se diferentes solventes extratores. Legenda: EtOH = etanol; MeOH = metanol; AcOEt = acetato de etila; H<sub>2</sub>O = água e misturas de etanol e água em diferentes proporções. Teste: One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). <sup>a,b,c</sup> representam as médias que diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

Em análise aos resultados, pode-se constatar que não houve diferença estatística nos rendimentos do extrato EtOH em relação aos outros solventes e misturas de solventes testados, à exceção do extrato MeOH. Para o extrato MeOH, houve diferença estatística em comparação com o extrato AcOEt, H<sub>2</sub>O e EtOH:H<sub>2</sub>O (7:3), mas sem diferença estatística para os demais.

Além deste protocolo extrativo, outro frequentemente utilizado para obtenção de extratos enriquecidos em fenólicos, como flavonoides, é a extração sequencial utilizando-se solventes de polaridades crescentes. Em uma primeira etapa, utiliza-se um solvente de baixa polaridade, como diclorometano, por exemplo, para extrair as substâncias de menor polaridade e agliconas. Em etapa subsequente, utilizam-se soluções hidroalcoólicas para obtenção dos flavonoides mais polares (ANDERSEN e MARKHAM, 2006). O extrato obtido é comumente denominado extrato desengordurado. Assim, na tentativa de eliminar as substâncias de menor polaridade e, consequentemente, concentrar os flavonoides presentes, também se avaliou a utilização de extrações com diclorometano, acetato de etila e ambos, no extrato etanólico de *C. lineatifolia* (PLL1 e PLL2, descritas no item 3.2.2.4 e PSL, descrita no item 3.2.2.5). Os rendimentos extrativos (m/m) estão apresentados no **Gráfico 2**.

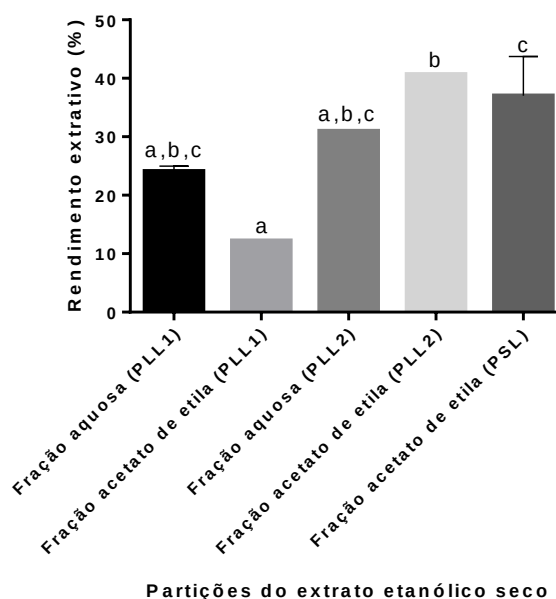


**GRÁFICO 2** – Rendimentos extrativos (m/m) das frações obtidas por partição com extrato etanólico seco de *Campomanesia lineatifolia*. Legenda: PLL1 = partição líquido-líquido em acetato de etila, desengordurado com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; PLL2 = partição líquido-líquido com acetato de etila; PSL = extração sólido-líquido com acetato de etila. Teste: *One-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey ( $n=3$ ). <sup>a,b,c</sup> representam as médias que diferem entre si ( $p<0,05$ ).

A fração acetato de etila obtida por PLL1 apresentou diferença estatística quando comparada às frações acetato de etila obtida por PLL2 e PSL. Para as demais frações, não houve diferença estatística. Assim, preliminarmente, pode-se inferir que as frações acetato de etila obtidas por PLL2 e PSL foram as que apresentaram os melhores rendimentos extrativos (m/m).

Apesar da importância em se avaliar o rendimento extrativo (m/m) das matérias-primas vegetais, este parâmetro pode não fornecer informações completas sobre a eficiência do método e do solvente utilizado em extrair as substâncias de interesse. Então, para se identificar o melhor solvente ou mistura de solvente extrator, foram preparadas soluções dos extratos obtidos para análise em CLAE-DAD (**TABELA 3**, item 3.2.3), a fim de se obterem os perfis cromatográficos.

A utilização de CLAE acoplada a detectores UV-DAD tem sido, nas duas últimas décadas, o método padrão para detecção de flavonoides em misturas. Na ausência de substâncias químicas de referência, a técnica oferece informações espectrais importantes sobre os flavonoides presentes em matrizes complexas, por meio do registro de espectros para cada pico do cromatograma. Isso é possível porque essa classe de substâncias apresenta duas bandas de absorção no UV muito características, com valores máximos de comprimento de onda entre

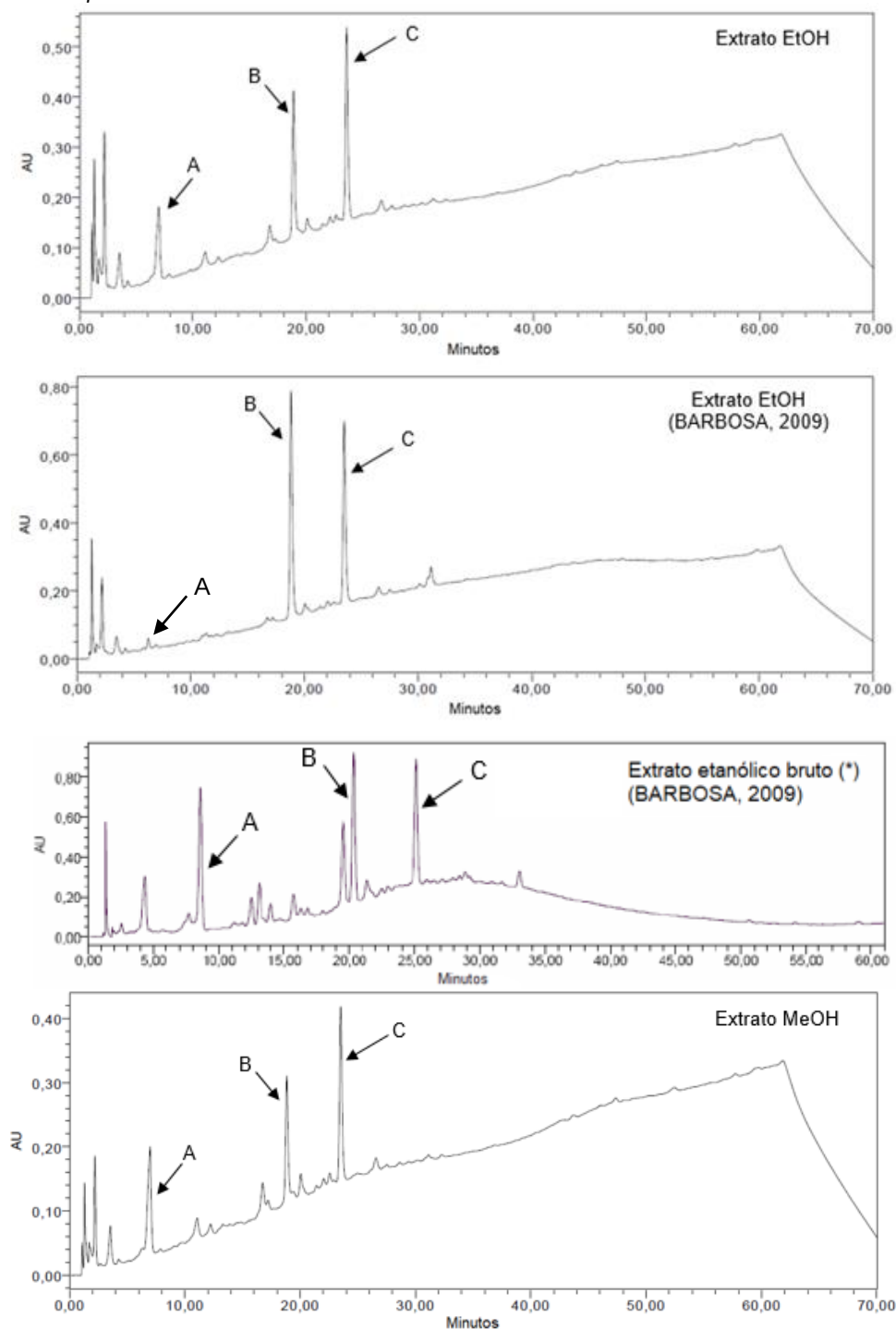
240 a 285 e 300 a 550 nm, sendo que os vários tipos flavonoídicos podem ser diferenciados pelas características do seu espectro de UV (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

A obtenção destes perfis cromatográficos permitiu a análise qualitativa da composição química dos extratos e a identificação dos picos referentes às substâncias flavonoídicas majoritárias presentes, em comparação com o obtido por Barbosa (2009). A **Figura 11** mostra os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, em  $\lambda$  210 nm, para os diferentes solventes utilizados na extração da droga vegetal de *C. lineatifolia*. Nesta figura, pode-se perceber a ocorrência de picos majoritários comuns entre os diversos cromatogramas de *C. lineatifolia*, identificando-se, assim, os seus principais marcadores químicos que, conforme perfil no UV, apresentam características flavonoídicas.

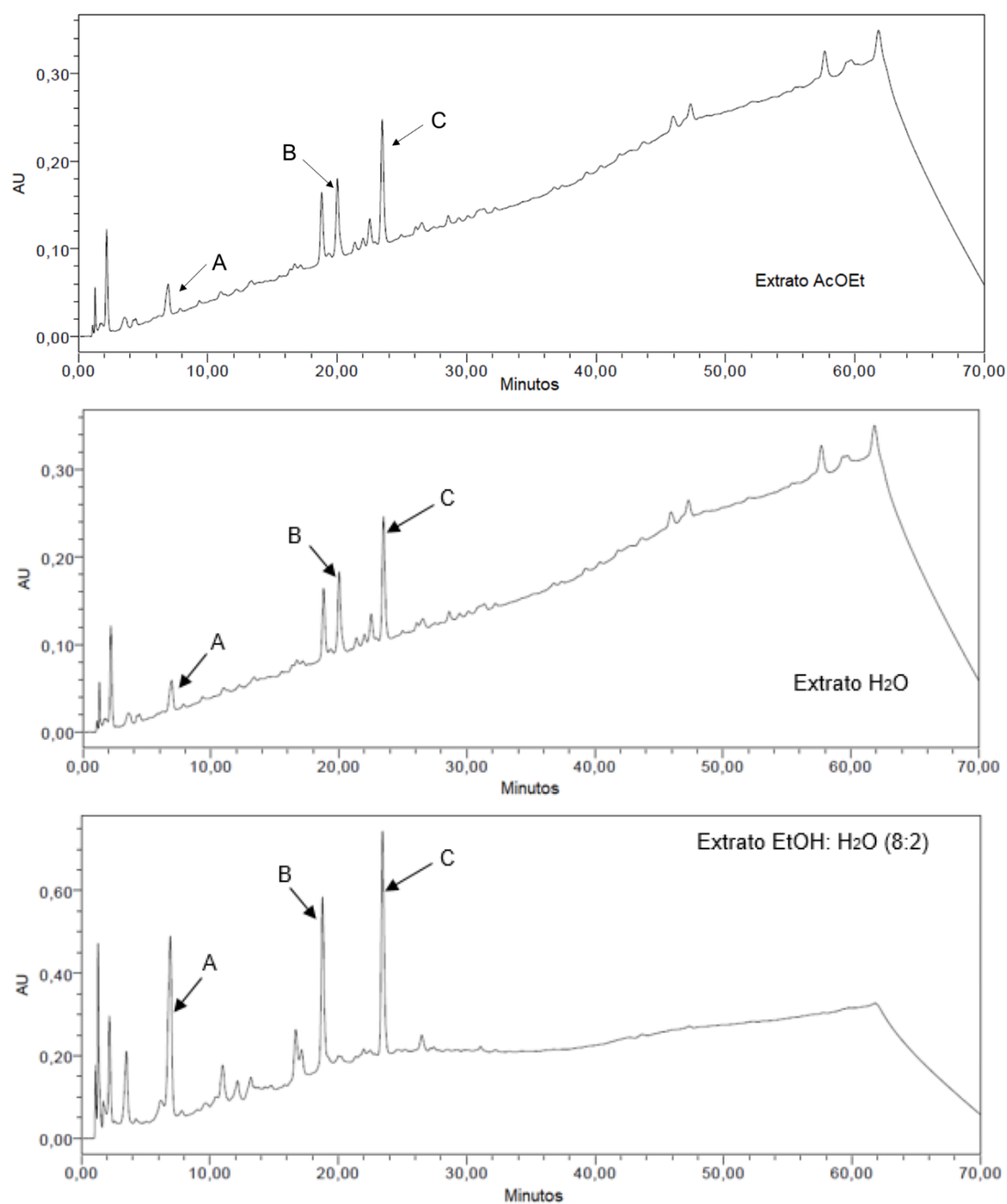
Três picos majoritários mais intensos (A, B e C) estão presentes em todos os cromatogramas, com tempos de retenção semelhantes ( $\sim$  6,9; 18,8 e 23,5 min; respectivamente) para os diferentes solventes e misturas de solventes testados nas extrações. Foi possível observar perfil cromatográfico semelhante ao obtido por Barbosa (2009). É importante ressaltar que, apesar da substância A ter sido detectada no extrato etanólico em pico de baixa intensidade, e não ter sido detectada na fração acetato de etila obtida por Barbosa (2009) nesta eluição recente (2019), a mesma substância foi identificada, conforme pode ser verificado na **Figura 12**, nos cromatogramas identificados como extrato etanólico bruto e fração AcOEt (\*) (BARBOSA, 2009). A referida substância foi identificada como sendo o monômero de tanino (+) – catequina. Jacques *et al.* (2010) demonstraram que as substâncias fenólicas apresentam estabilidade quando armazenadas sob temperatura de refrigeração ( $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-18^{\circ}\text{C}$ ), por um período não superior a quatro meses. Van der Sluis, Dekker e van Boekel (2005) descreveram estabilidade da catequina em condições de armazenamento sob refrigeração durante um mês, mas nenhum estudo relata a estabilidade desta substância por período superior a seis meses de armazenamento. Possivelmente, a baixa intensidade do pico da catequina nas amostras de Barbosa (2009) demonstra que ela pode ter sido degradada nesse período de dez anos de estocagem sob refrigeração, justificando os resultados das corridas cromatográficas atuais.

Além da catequina, a substância aqui relacionada como C, também foi identificada por Barbosa (2009), representando o flavonol quercitrina, presente em todos os cromatogramas, nos diferentes solventes e mistura de solventes extratores.

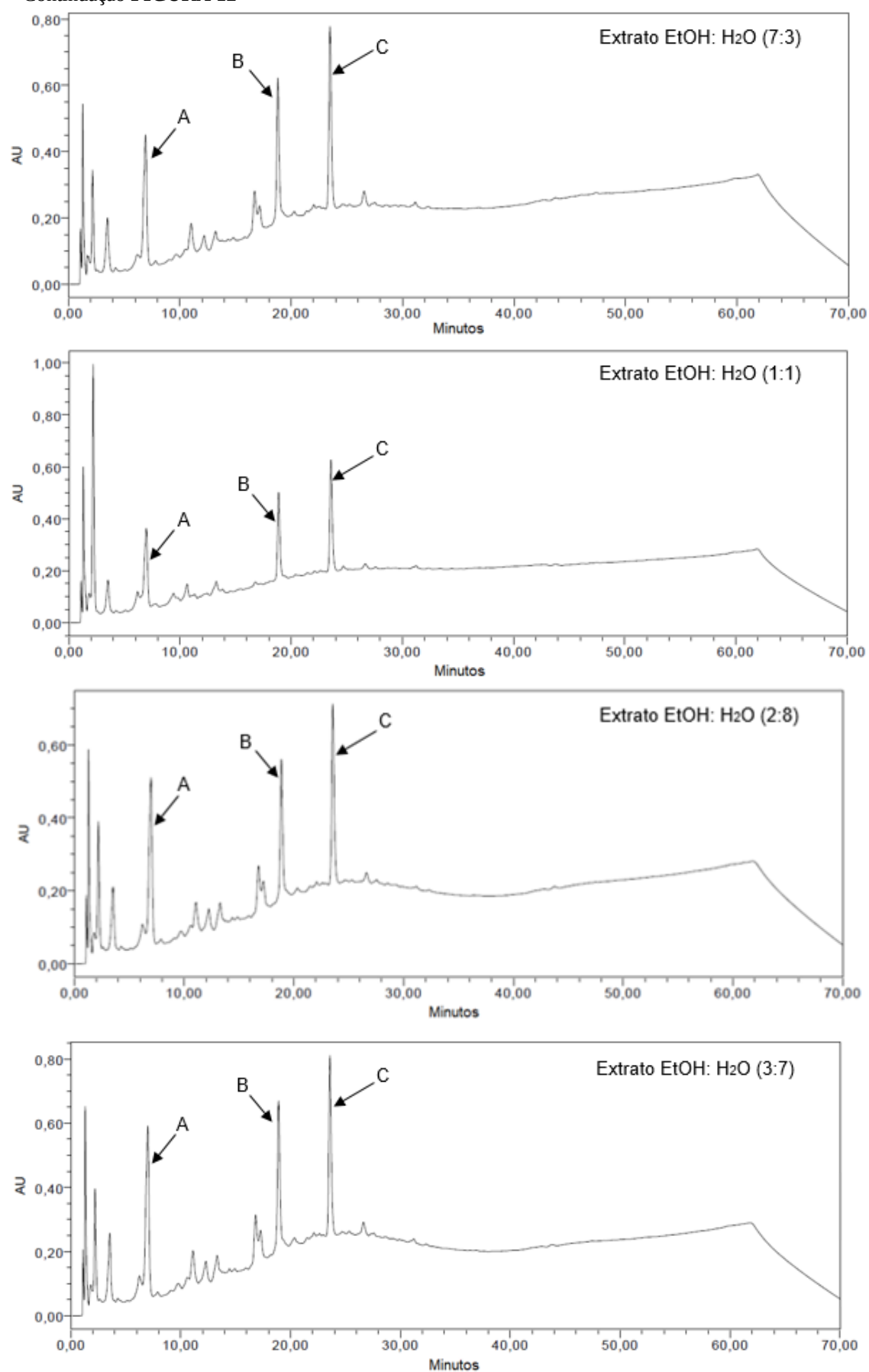
**FIGURA 12** – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, em 210 nm, para os extratos obtidos com os diferentes solventes utilizados na extração da droga vegetal de *C. lineatifolia*.



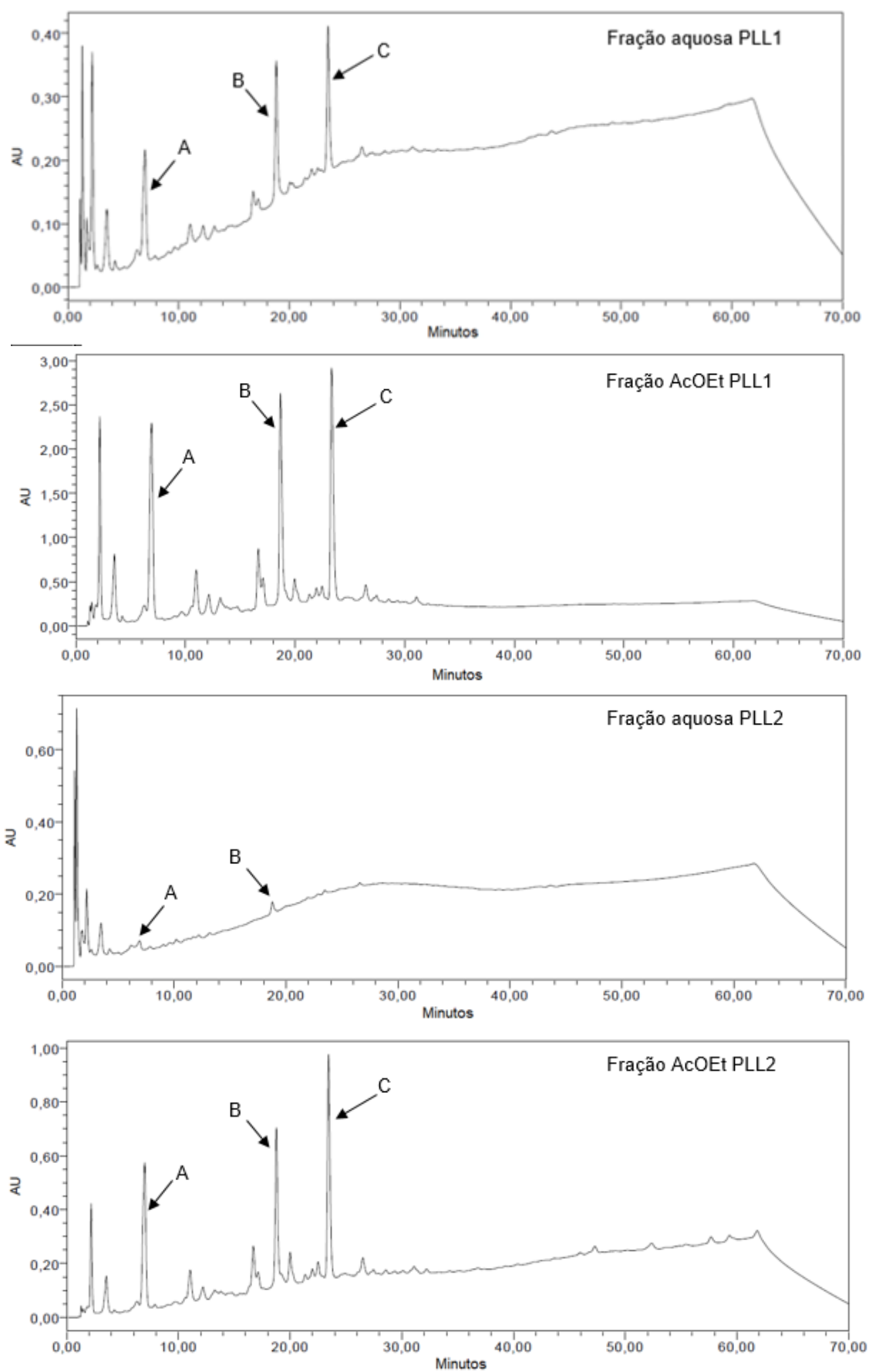
Continuação FIGURA 12



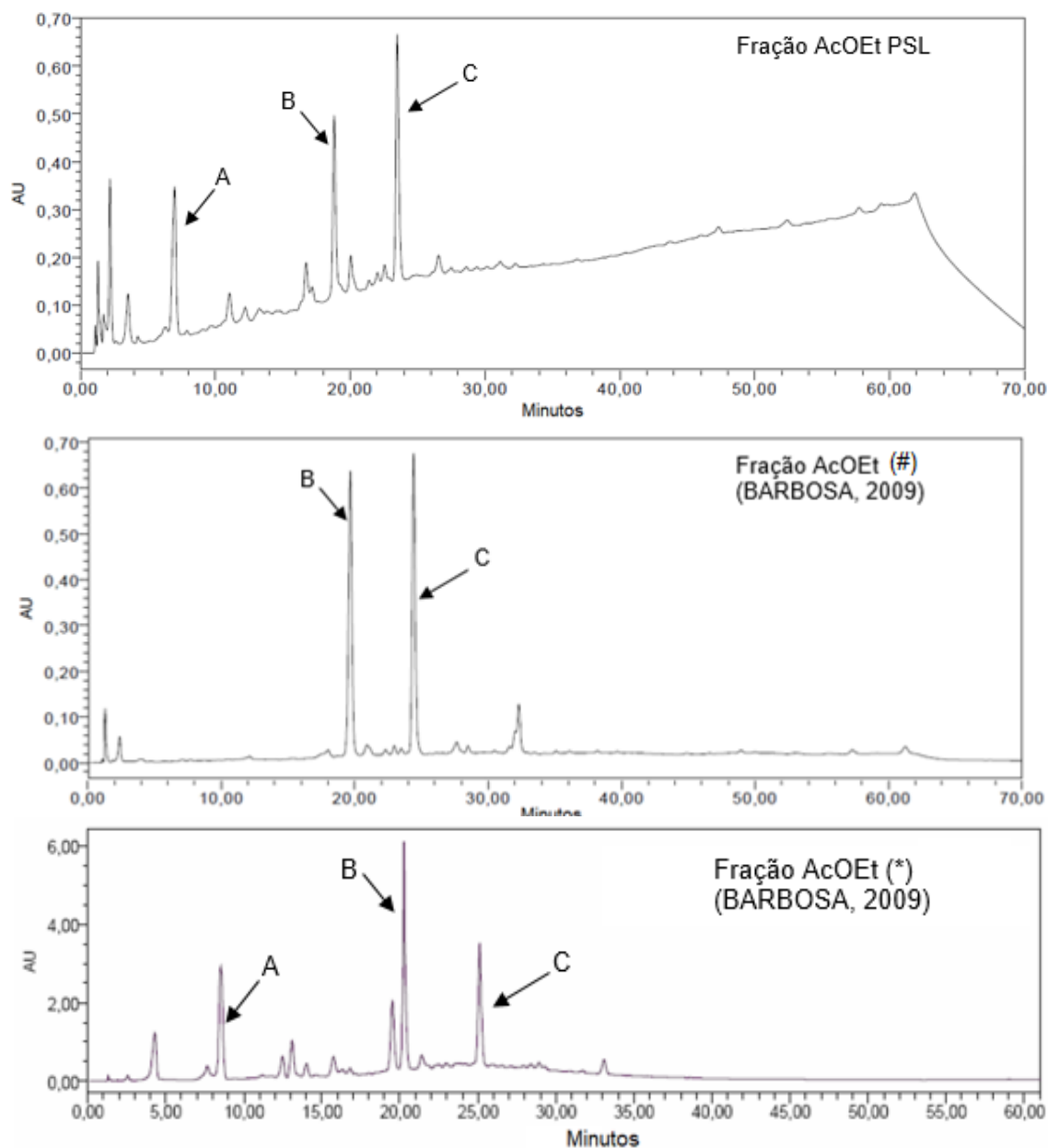
Continuação FIGURA 12



Continuação FIGURA 12



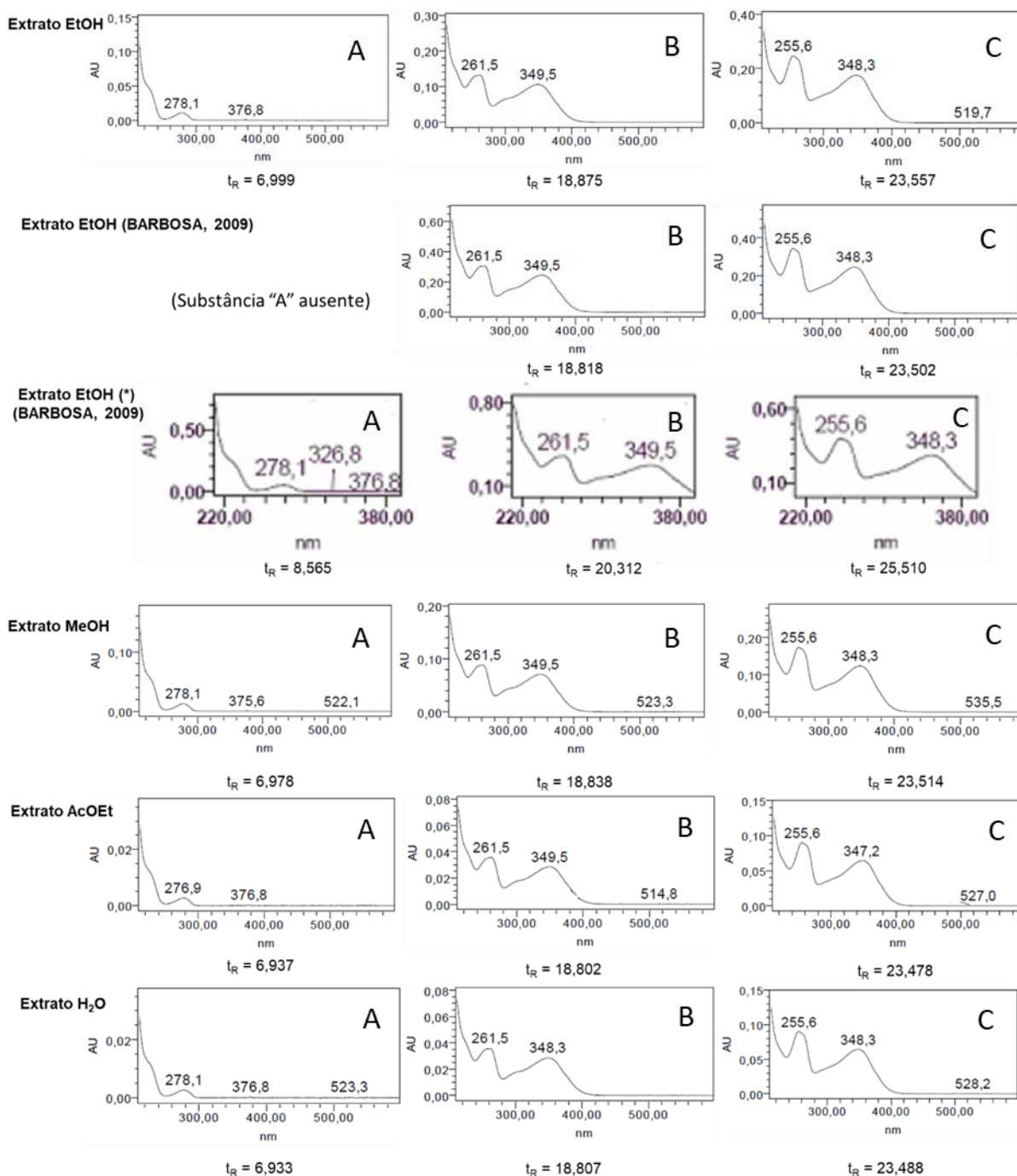
Continuação FIGURA 12



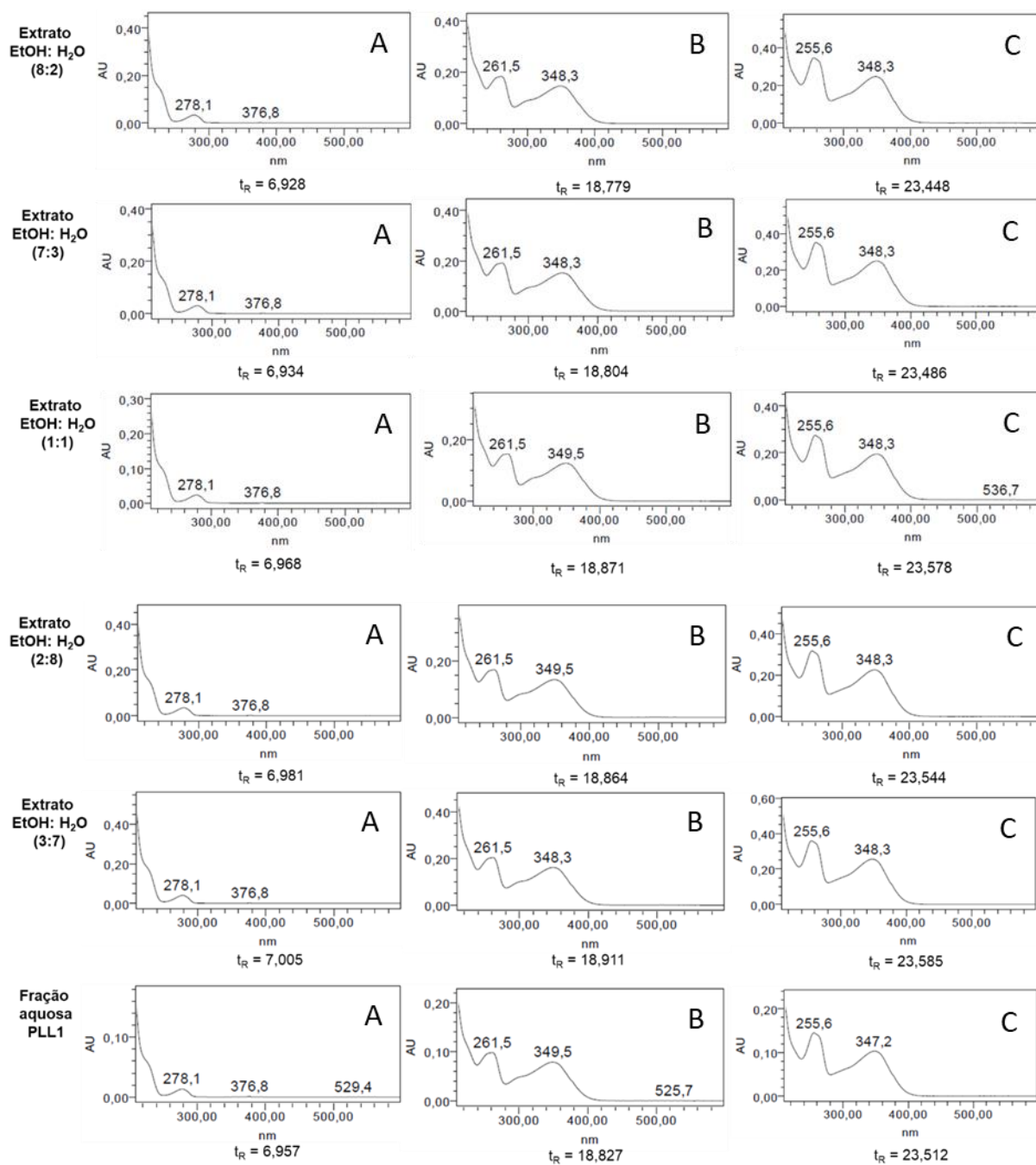
Legenda: A, B e C = substâncias majoritárias selecionadas; AU = absorbância. Legenda: EtOH = etanol; MeOH = metanol; AcOEt = acetato de etila; H<sub>2</sub>O = água; PLL1 = partição líquido-líquido do extrato etanólico seco com diclorometano e acetato de etila; PLL2 = partição líquido-líquido do extrato etanólico seco com acetato de etila; PSL = extração sólido-líquido do extrato etanólico seco com acetato de etila. (#) Perfil cromatográfico obtido em corrida recente com amostra obtida em 2009; (\*) Perfil cromatográfico obtido por Barbosa (2009) no ano de 2009, sob as mesmas condições cromatográficas. Condições cromatográficas em material e métodos, item 3.2.3.

Os espectros UV das substâncias referentes aos picos A, B e C apresentaram padrões de bandas semelhantes entre si, correspondendo, possivelmente, à presença de substâncias flavonoídicas, em função de bandas observadas: uma banda entre  $\lambda$  250 e 280 nm e outra entre  $\lambda$  340 e 380 nm (FIGURA 13).

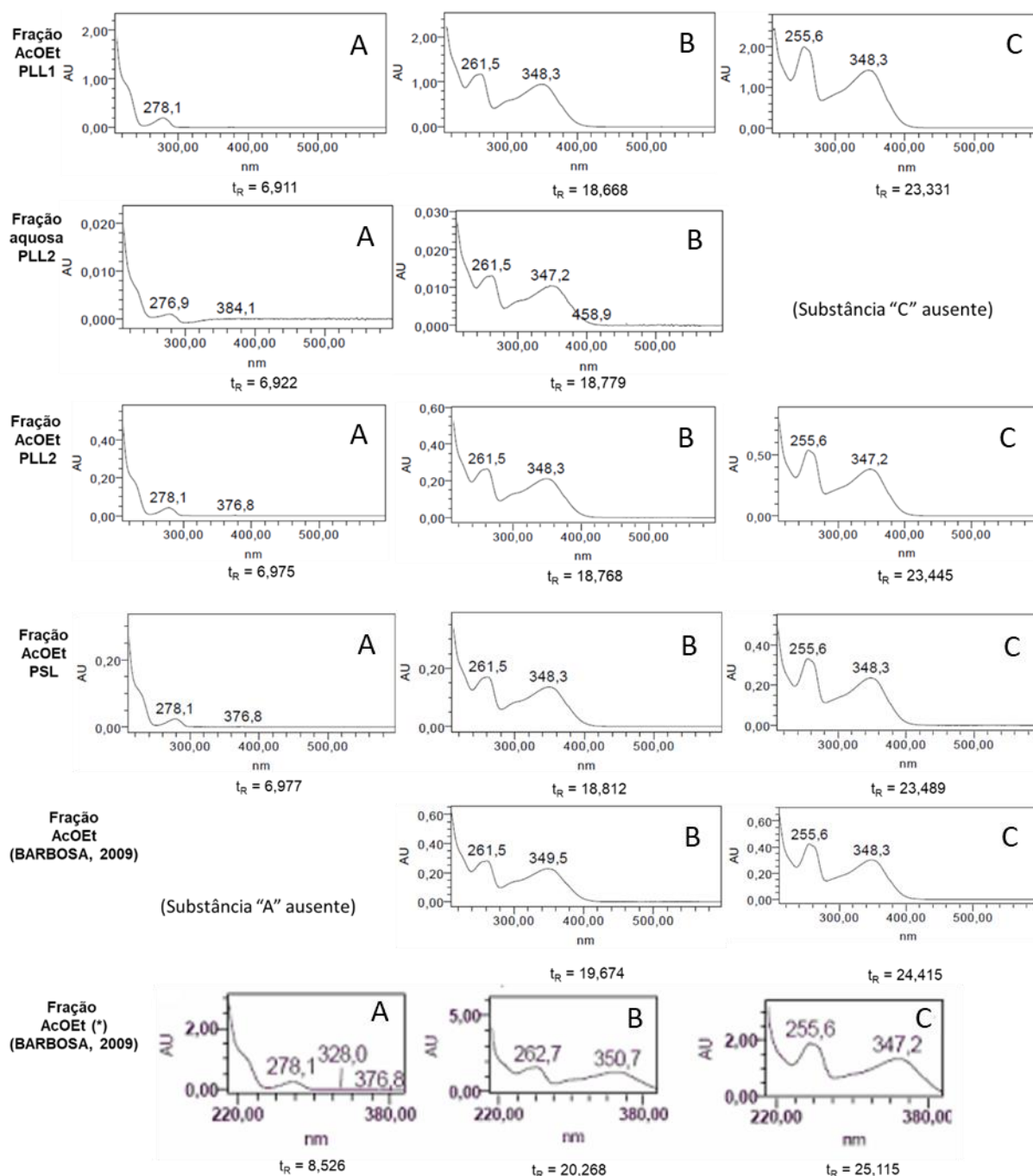
**FIGURA 13** – Espectros no UV dos picos majoritários A, B e C obtidos nos cromatogramas em CLAE-FR., dos extratos de *Campomanesia lineatifolia* com diferentes solventes e misturas de solventes.



Continuação FIGURA 13



Continuação FIGURA 13



Legenda: UV = ultravioleta; AU = absorbância, CLAE-FR = cromatografia líquida de alta eficiência, fase reversa; EtOH = etanólico; MeOH = metanólico; AcOEt = acetato de etila; H<sub>2</sub>O = água; PLL1 = partição líquido-líquido do extrato etanólico seco em acetato de etila desengordurado com diclorometano ; PLL2 = partição líquido-líquido do extrato etanólico seco com acetato de etila; PSL = extração sólido-líquido do extrato etanólico seco com acetato de etila; fração AcOEt (BARBOSA, 2009) = espectros UV obtidos na mesma data da corrida realizada para os demais solventes e (\*) espectros UV obtidos por Barbosa (2009), sob as mesmas condições cromatográficas. Condições cromatográficas em material e métodos, item 3.2.3.

Após a análise e seleção das substâncias majoritárias A, B e C por meio de seus perfis cromatográficos (respectivos tempos de retenção) e espectros no UV, fez-se necessário o estudo da eficiência da extração dessas substâncias de interesse, em função do uso de diferentes

solventes e misturas de solventes e das áreas respectivas destes picos. Analisando-se individualmente a eficiência da extração para as substâncias B e C, os diferentes solventes e misturas de solventes utilizados não apresentaram diferença estatística entre eles. Para a substância A, conforme pode ser demonstrado no **Gráfico 3**, a extração com o solvente AcOEt foi o menos eficiente em relação às misturas EtOH:H<sub>2</sub>O, nas proporções 7:3, 3:7 e 2:8. Para o restante, não houve diferença estatística entre os solventes e misturas utilizados.

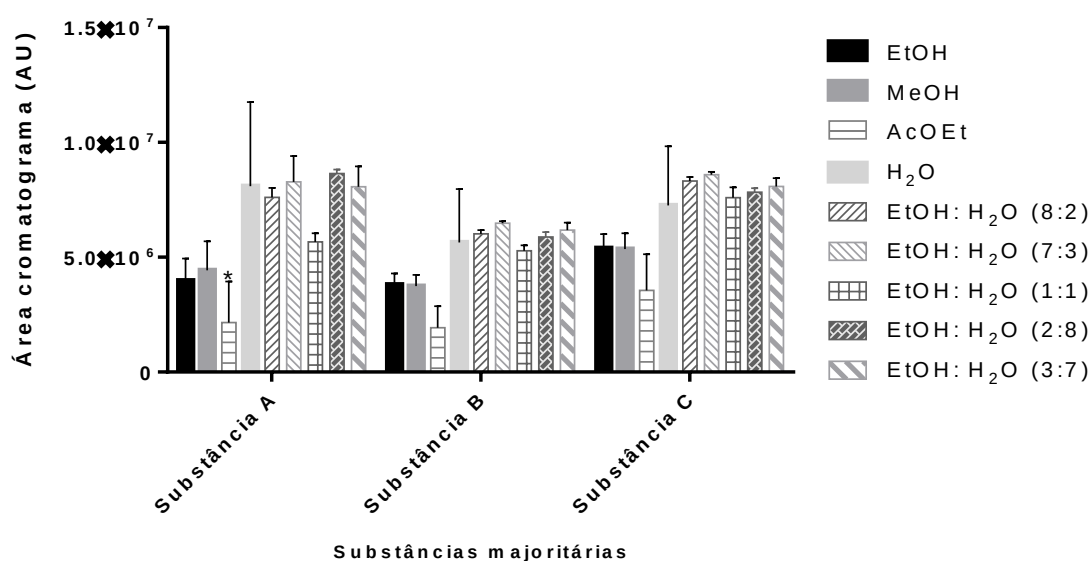


**GRÁFICO 3** – Áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada extrato de *Campomanesia lineatifolia* com diferentes solventes e mistura de solventes extratores. Legenda: EtOH = etanol; MeOH = metanol; AcOEt = acetato de etila; H<sub>2</sub>O = água. Teste: Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). (\*) representa diferença estatística entre o solvente AcOEt com as misturas EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3; 3:7 e 2:8, com p<0,05. Condições cromatográficas em material e métodos, item 3.2.3.

Também foi avaliada a eficiência das extrações para as frações PLL1, PLL2 e PSL para as substâncias A, B e C, individualmente. O perfil das extrações é mostrado no **Gráfico 4**. Para as substâncias A e B, não houve diferença estatística com relação às partições realizadas. Para a substância C, a fração AcOEt PLL1 demonstrou ser mais eficiente na extração, mas sem diferença estatística para as demais frações obtidas pelas partições.

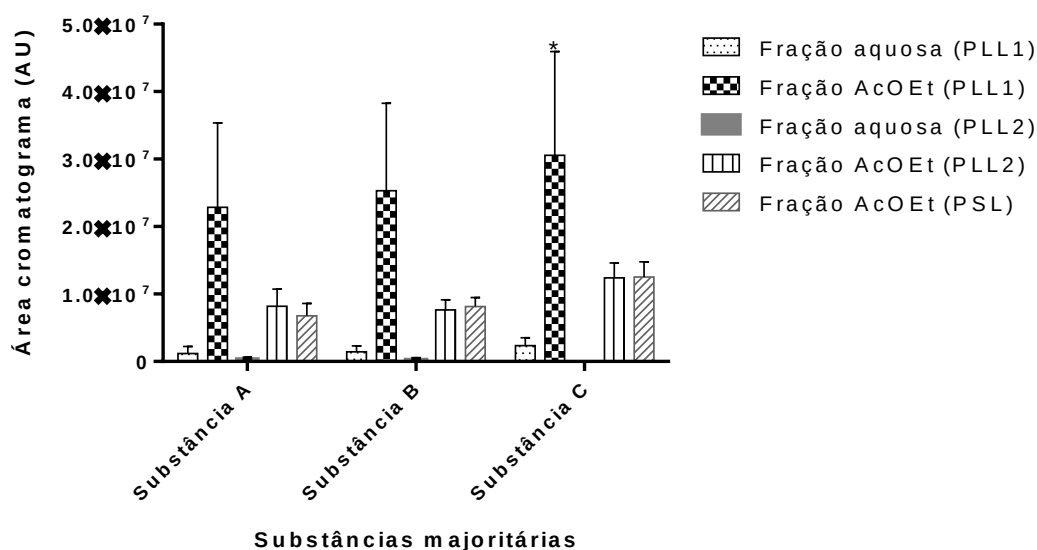


**GRÁFICO 4** – Áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada fração de partições e extrações sólido-líquido realizadas com o extrato etanólico seco de *Campomanesia lineatifolia*. Legenda: CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; PLL1 = partição líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila; PLL2 = partição líquido-líquido com acetato de etila; PSL = extração sólido-líquido com acetato de etila. Teste: *Two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). (\*) representa diferença estatística entre a Fração AcOEt PLL1 e demais Frações avaliadas, com  $p < 0,05$ . Condições cromatográficas em material e métodos, item 3.2.3.

Os **Gráficos 5 e 6** mostram o somatório das áreas dos picos das três substâncias selecionadas (A, B e C) obtidos por CLAE, nos diferentes solventes e misturas de solventes utilizados nos métodos extrativos descritos, sob as mesmas condições cromatográficas (**TABELA 3**, item 3.2.3).

Em análise ao **Gráfico 5**, observou-se que os extratos obtidos utilizando 100% de solventes orgânicos apresentaram concentrações muito baixas dos flavonoides selecionados, à exceção do extrato EtOH. Ainda, foi demonstrada uma boa eficiência com a utilização de soluções hidroalcoólicas contendo 80% e 70% de etanol.

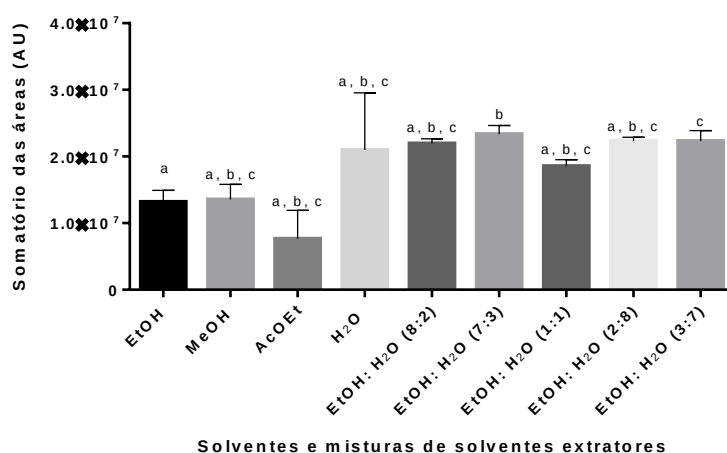


**GRÁFICO 5** – Somatório das áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada extrato de *Campomanesia lineatifolia* com diferentes solventes e mistura de solventes extratores. Legenda: EtOH = etanol; MeOH = metanol; AcOEt = acetato de etila; H<sub>2</sub>O = água. Teste: One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). <sup>a,b,c</sup> representam as médias que diferem entre si (p<0,05). Condições cromatográficas em material e métodos, item 3.2.3.

A eficiência máxima de extração das substâncias de interesse, a partir das frações obtidas por partições, como pode ser demonstrada no **Gráfico 6**, foi observada com a utilização da técnica de partição líquido-líquido do extrato etanólico de *C. lineatifolia* com o solvente acetato de etila (PLL1), desengordurada com diclorometano.

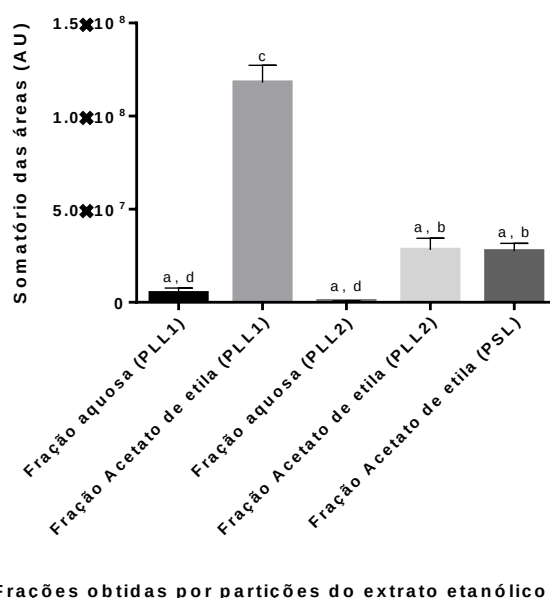


**GRÁFICO 6** – Somatório das áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLAE, das substâncias fenólicas majoritárias selecionadas (A, B e C) para cada fração de partições realizadas com o extrato etanólico seco de *Campomanesia lineatifolia*. Legenda: CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; PLL1 = partição líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila; PLL2 = partição líquido-líquido com acetato de etila; PSL = extração sólido-líquido com acetato de etila. Teste: One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). <sup>a,b,c,d</sup> representam as médias que diferem entre si (p<0,05). Condições cromatográficas em material e métodos, item 3.2.3.

Portanto, preliminarmente, as análises utilizando-se o método analítico por CLAE, permitiu selecionar os extratos e partições que apresentaram eficiência na extração das substâncias fenólicas de interesse (extratos EtOH, EtOH:H<sub>2</sub>O 8:2 e 7:3 e a fração acetato de etila PLL1), a partir da droga vegetal de folhas de *Campomanesia lineatifolia*.

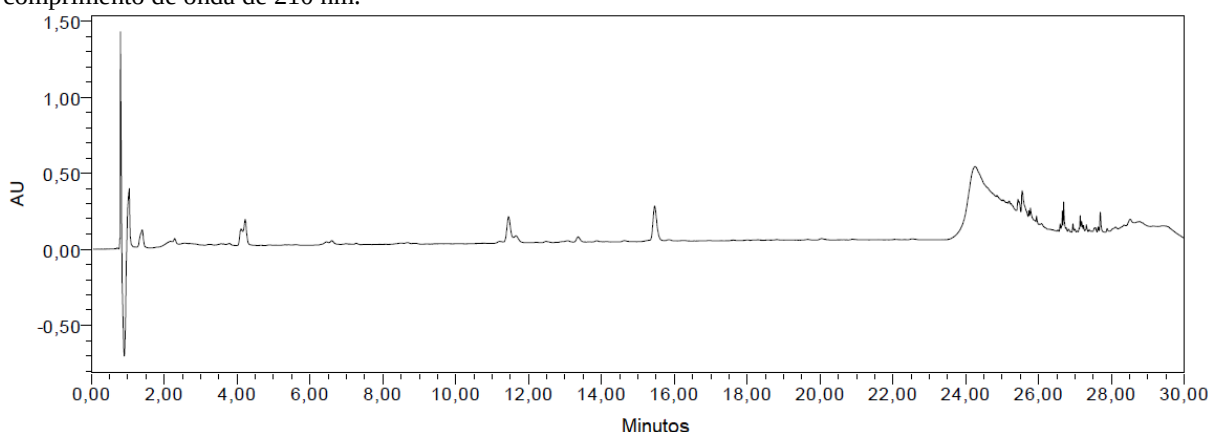
Para facilitar a análise e o estudo de flavonoides e substâncias fenólicas, a etapa cromatográfica é frequentemente necessária para separar individualmente uma substância da outra. Para tanto, a cromatografia líquida tem sido a técnica de separação mais comumente utilizada (MARSTON e HOSTETTMANN, 2006). Nos últimos anos, a CLAE vem sendo substituída pela CLUE, que inclui diversas vantagens, incluindo tempos menores de análises e melhores sensibilidade e resolução nos cromatogramas (CHURCHWELL *et al.*, 2005; ORTEGA *et al.*, 2010).

A partir desta análise preliminar, foi proposta a transferência analítica de CLAE para CLUE, a fim de se obter os resultados cromatográficos em menores intervalos de tempo de eluição, com menor consumo de solventes, com menores quantidades de amostra analisada e com a intenção de desenvolvimento analítico e validação posterior do método analítico para quantificação. Entretanto, quando se realiza a transposição de um método analítico de CLAE para CLUE, é crucial existir uma confirmação de que os novos resultados obtidos em CLUE sejam semelhantes aos já existentes em CLAE, em especial no que diz respeito ao parâmetro de resolução entre as substâncias de interesse. Ainda, por ser a transferência de um método analítico de CLAE para CLUE um processo longo, que requer a avaliação e o ajuste de uma série de parâmetros cromatográficos considerados críticos na transferência analítica que incluem o tipo de coluna utilizada, o fluxo da fase móvel, a temperatura da coluna, a proporção da fase móvel utilizada, a composição da fase móvel e o volume de injeção da amostra (PORTO, 2014).

O cromatógrafo utilizado conta com o software *Empower*, dotado de uma ferramenta, o *Acquity UPLC Calculator*, que permite a introdução das condições cromatográficas de um método em CLAE e sugere a adaptação desses mesmos parâmetros para CLUE. Não obstante, a utilização do *Acquity UPLC Calculator* é apenas um ponto de partida para os estudos de transferência analítica, uma vez que as condições cromatográficas aconselhadas podem, nem sempre, ser totalmente aplicáveis à transferência em estudo. A equivalência das condições da eluição obtida pela calculadora de conversão é descrita na **Tabela 4** (item 3.2.4).

Para análise e interpretação dessa condição analítica inicial obtida pela transferência dos métodos de CLAE para CLUE, apenas o extrato EtOH foi utilizado, tendo em vista que se tratou de um extrato com bom rendimento (**GRÁFICO 5**) e de fácil obtenção, quando comparado aos outros extratos com bons rendimentos (EtOH:H<sub>2</sub>O 8:2 e 7:3; fração acetato de etila PLL1). Este primeiro perfil cromatográfico em CLUE do extrato etanólico não apresentou boa resolução das substâncias majoritárias previamente selecionadas por CLAE, no comprimento de onda de 210 nm. Para que a resolução se tornasse melhor, o método analítico foi modificado (Condição experimental C, **Tabela 6**, item 4.2.1) e novo perfil cromatográfico obtido por CLUE (**FIGURA 14**).

**FIGURA 14** – Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Campomanesia lineatifolia* obtido por CLUE, em comprimento de onda de 210 nm.

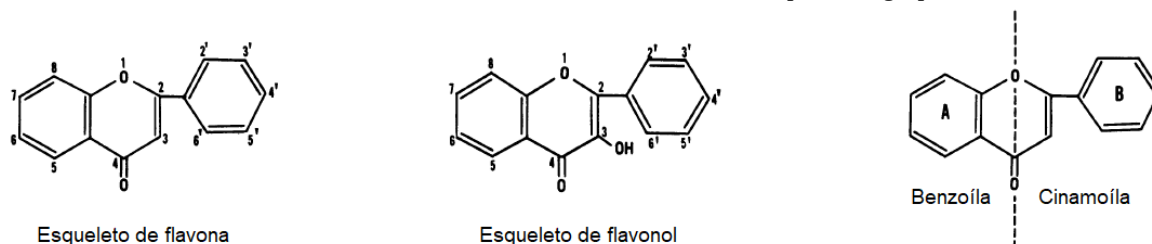


Legenda: AU = absorvância; CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência. Condição cromatográfica C, item 4.2.1.

O comprimento de onda inicialmente escolhido de 210 nm foi proposto objetivando-se uma análise de varredura das possíveis substâncias presentes nos extratos de *C. lineatifolia*. Após a obtenção dos espectros em UV, pode ser constatado que, a maioria dos picos registrados, apresentaram espectros de UV compatíveis com substâncias fenólicas, dentre eles taninos, flavonas e flavonóis, assim como descrito por Barbosa (2009), para os extratos de *C. lineatifolia*. Os espectros de flavonas e flavonóis em metanol exibem dois picos de absorção de alta intensidade na região de 240-400 nm. Estes dois picos são comumente referidos como banda I (usualmente 300 a 380 nm) e banda II (240 - 280 nm). A absorção da banda I está associada à presença do sistema cinamoíla do anel B e a absorção da banda II é decorrente da presença do grupo cromóforo benzoíla do anel A. Essas características permitem diferenciar as flavonas e os flavonóis das demais classes de flavonoides. A banda I de flavonas ocorre em comprimentos de onda de 304–350 nm, enquanto a banda I dos flavonóis, de uma maneira geral, apresentam o comprimento de onda de absorção superior a 350 nm, devido à presença da

hidroxila na posição 3, que aumenta a densidade eletrônica do cromóforo cinamoíla. Entretanto, em flavonóis que apresentam substituição da hidroxila na posição 3 (metilas ou açúcares) a banda I (328-357 nm) sobrepõe-se à região da banda I em flavonas, e a forma geral das curvas espectrais aproximam-se daquelas das flavonas. (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970) (FIGURA 15).

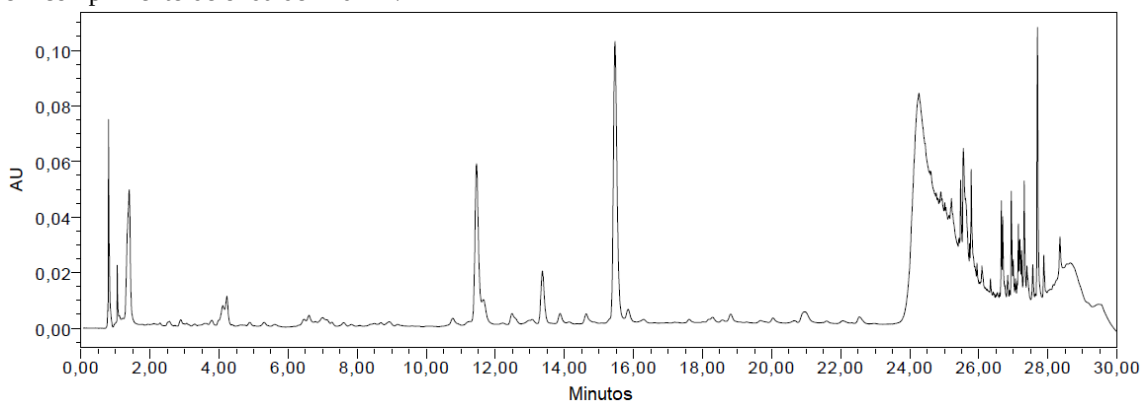
**FIGURA 15** – Características estruturais das flavonas e flavonóis e seus respectivos grupos benzoíla e cinamoíla.



Fonte: Adaptado de Mabry, Markham e Thomas, 1970, p. 42.

Baseando-se nos padrões de absorção das substâncias flavonoídicas, novo cromatograma foi obtido (nas mesmas condições cromatográficas descritas para a **Figura 14**), agora em comprimento de onda de 270 nm, visando melhorar a seletividade para identificação dessas substâncias (**FIGURA 16**).

**FIGURA 16** – Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *Campomanesia lineatifolia* obtido por CLUE, em comprimento de onda de 270 nm.

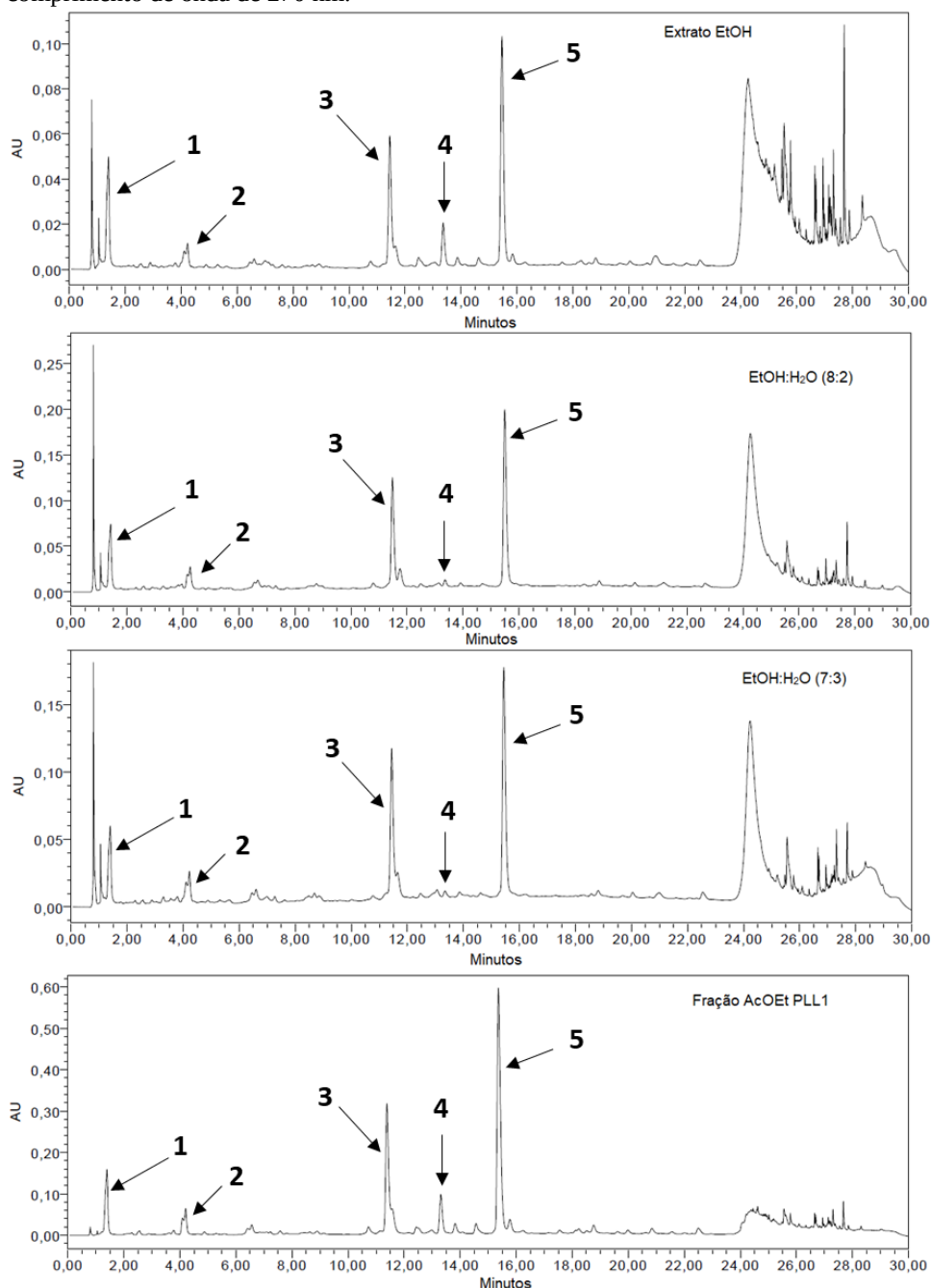


Legenda: AU = absorvância; CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência. Condição cromatográfica C, item 4.2.1.

Observou-se, neste comprimento de onda (270 nm), a presença de cinco picos majoritários, os quais foram numerados de 1 a 5, conforme seu tempo de retenção. A partir dessa seleção, procederam-se as corridas dos extratos com maiores rendimentos selecionados por CLAE em CLUE, mantendo-se a mesma condição cromatográfica anterior (condição experimental C,

**Tabela 6**, item 4.2.1) nos diferentes solventes e misturas (extratos EtOH, EtOH:H<sub>2</sub>O 8:2, EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3 e a fração acetato de etila PLL1) (**FIGURA 17**).

**FIGURA 17** – Perfis cromatográficos dos extratos e fração otimizados de *Campomanesia lineatifolia*, obtidos por CLUE, em comprimento de onda de 270 nm.



Legenda: AU = absorbância; CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência; EtOH = etanol, H<sub>2</sub>O = água; AcOEt = acetato de etila; PLL1 = partição líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico seco de *C. lineatifolia* Condição cromatográfica C, item 4.2.1.

Para se traçar o perfil quantitativo dessas substâncias selecionadas (1 a 5), as áreas absolutas dos 5 picos foram avaliadas por CLUE ( $\lambda$  270 nm, nas mesmas condições cromatográficas

descritas anteriormente), em função dos diferentes solventes e misturas de solventes extratores mais eficientes, selecionados previamente por CLAE (**GRÁFICO 7**).

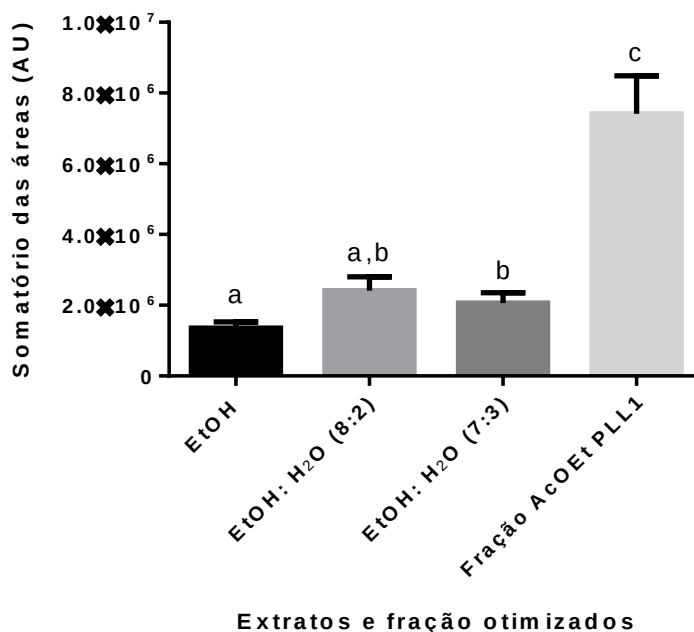


**GRÁFICO 7** – Somatório das áreas dos picos cromatográficos obtidos por CLUE ( $\lambda$  270 nm), das substâncias flavonoídicas majoritárias selecionadas (1 a 5) para os extratos e fração otimizados de *Campomanesia lineatifolia*. Legenda: AU = absorvância; CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência; EtOH = etanol, H<sub>2</sub>O = água; AcOEt = acetato de etila; PLL1 = partição líquido-líquido com diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico seco de *C. lineatifolia*. Teste: One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). <sup>a,b,c</sup> representam as médias que diferem entre si (p<0,05). Condição cromatográfica C, item 4.2.1.

A fração AcOEt PLL1 mostrou-se a mais enriquecida com relação às substâncias de interesse (1 a 5), apresentando diferença estatística quando comparada com os demais extratos (EtOH, EtOH:H<sub>2</sub>O 8:2 e 7:3). Para os extratos etanólico e hidroalcoólicos, os que apresentaram melhores eficiências foram os extratos EtOH:H<sub>2</sub>O 8:2 e 7:3, sem diferença estatística entre eles, seguido do extrato EtOH, que apresentou diferença estatística somente para o EtOH:H<sub>2</sub>O e 7:3.

Estudos conduzidos com espécies do gênero *Campomanesia* para avaliação de atividades biológicas e ensaios de toxicidade, em função dos flavonoides presentes nos extratos, também utilizaram como solventes extratores o etanol (SOUZA-MOREIRA, *et al.*, 2011; KLAFKE *et al.*, 2012; PASCOAL *et al.*, 2014), soluções hidroalcoólicas (MARKMAN *et al.*, 2004) e acetato de etila (FERREIRA *et al.*, 2013). Os resultados então descritos corroboram com o perfil otimizado obtido para os solventes / misturas de solventes extratores avaliados: etanol e etanol:água (8:2) para as folhas de *C. lineatifolia* neste estudo. É importante ressaltar que, a fração acetato de etila PLL1, apesar de ter demonstrado melhor eficiência em extrair as substâncias majoritárias selecionadas por CLUE (1 a 5), foi excluída das próximas etapas de

otimização na obtenção de extratos enriquecidos em flavonoides, tendo em vista que apresentou menor rendimento (m/m%) (**GRAFICO 2**) e por apresentar um processo de obtenção mais laborioso e com maior consumo de solventes extratores e tempo, além da toxicidade do solvente acetato de etila.

Relacionando os resultados apresentados em nosso estudo aos publicados anteriormente por Barbosa (2009) e Madalosso *et al.* (2012), foi proposto um planejamento experimental para avaliação de dois novos métodos extrativos, quais sejam, a maceração sob agitação eletromagnética e sistema contínuo de refluxo (condensador de bolas), em comparação ao método utilizado preliminarmente, maceração com auxílio de banho ultrassônico, na tentativa de otimizar a obtenção de extrato rico em fenólicos.

Vários métodos extrativos podem ser propostos com o objetivo de se obterem extratos enriquecidos em fenólicos. Machado *et al.* (2017) desenvolveram e otimizaram um método de extração para obtenção de extrato enriquecido em substâncias fenólicas nas sementes de guaraná, que empregou a maceração líquido-sólido utilizando mistura de solventes de EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2, v/v) com ácido diluído (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% em água, v/v), sob agitação eletromagnética, em temperatura de 75-78 °C, em três extrações sucessivas, 10 minutos cada. Outros estudos também se concentram na extração de substâncias fenólicas por meio de solventes aceitos pela indústria farmacêutica e de alimentos, por exemplo, água e etanol, em combinação com as técnicas de extração assistida, como extração líquida pressurizada, extração por microondas e extração assistida por ultrassom (BODOIRA *et al.*, 2017; CALEJA *et al.*, 2017; DUBA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015).

A temperatura do processo extrativo é um outro parâmetro que deve ser levado em consideração. Diversos estudos demonstram que o aumento da temperatura melhora a solubilidade das substâncias fenólicas nos solventes extratores e otimiza a extração dessas substâncias em matérias-primas vegetais (DANESHFAR, GHAZIASKAR e HOMAYOUN, 2008; SRINIVAS *et al.*, 2010; CUEVAS-VALENZUELA *et al.*, 2014; BODOIRA *et al.*, 2019).

Diante do exposto, para os métodos extrativos propostos no planejamento experimental, o solvente EtOH e a mistura de solventes EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2) foram mantidos, tendo em vista a

eficiência que demonstraram na obtenção de extratos ricos em fenólicos (avaliados anteriormente por CLAE e CLUE), além de boa solubilidade das substâncias fenólicas nestes solventes (DANESHFAR, GHAZIASKAR e HOMAYOUN, 2008; BARBOSA, 2009; MADALOSSO *et al.*, 2012; VUONG *et al.*, 2011; CUEVAS-VALENZUELA *et al.*, 2014). Como não houve diferença estatística entre as misturas EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2) e (7:3), este último não foi incluído no planejamento, tendo em vista a maior dificuldade de se retirar a água que se encontra em maior proporção nesse extrato. Em adição, nova mistura de solventes foi incluída no planejamento, etanol:acetato de etila (1:1) [EtOH: AcOEt (1:1)], tendo em vista que o solvente acetato de etila tem demonstrado eficiência na extração de substâncias fenólicas (DANESHFAR, GHAZIASKAR e HOMAYOUN, 2008; VUONG *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013) e também pelo fato de a partição com acetato de etila PLL1 ter demonstrado um bom resultado. O planejamento experimental encontra-se sumarizado na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Planejamento experimental proposto para avaliação de diferentes métodos extrativos e solventes / mistura de solventes, na obtenção de extratos enriquecidos em fenólicos, a partir da droga vegetal de folhas de *C. lineatifolia*.

| ENSAIO | SOLVENTE / MISTURA DE SOLVENTES | AGITAÇÃO / TEMPERATURA (°C)                 |
|--------|---------------------------------|---------------------------------------------|
| 1      | EtOH                            | Banho ultrassônico (US) / 27°C              |
| 2      | EtOH                            | Chapa eletromagnética (AE) / 50 ± 2°C       |
| 3      | EtOH                            | Sistema contínuo de refluxo (R) / 100 ± 5°C |
| 4      | EtOH:H <sub>2</sub> O (8:2)     | Banho ultrassônico (US) / 27°C              |
| 5      | EtOH:H <sub>2</sub> O (8:2)     | Chapa eletromagnética (AE) / 50 ± 2°C       |
| 6      | EtOH:H <sub>2</sub> O (8:2)     | Sistema contínuo de refluxo (R) / 100 ± 5°C |
| 7      | EtOH:AcOEt (1:1)                | Banho ultrassônico (US) / 27°C              |
| 8      | EtOH:AcOEt (1:1)                | Chapa eletromagnética (AE) / 50 ± 2°C       |
| 9      | EtOH:AcOEt (1:1)                | Sistema contínuo de refluxo (R) / 100 ± 5°C |

Legenda: EtOH = etanol, H<sub>2</sub>O = água e AcOEt = acetato de etila, US = maceração auxiliada por ultrassom, AE = maceração sob agitação eletromagnética; R = extração em sistema contínuo de refluxo.

Os parâmetros então propostos foram em função do tipo de solvente / mistura de solventes utilizados e o método extrativo. Para a avaliação da otimização em diferentes métodos extrativos, os perfis cromatográficos de cada extrato foram obtidos por CLUE-UV/DAD, em comprimento de onda de 270 nm, e as áreas dos picos majoritários (picos de 1 a 5) foram comparadas (**GRÁFICO 8**).

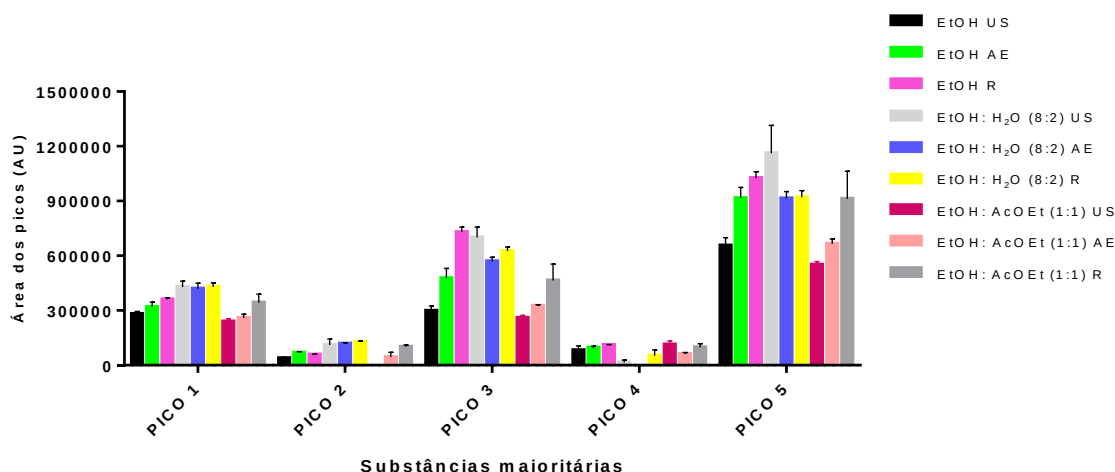


**Gráfico 8** – Área dos picos das substâncias majoritárias (picos de 1 a 5) de extratos de *C. lineatifolia* obtidos por CLUE-UV/DAD em diferentes métodos e solventes extrativos. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM, Two-way ANOVA, com comparação pós-teste de Tukey,  $p < 0.05$ . Legenda: EtOH = etanol; H<sub>2</sub>O = água; AcOEt = acetato de etila; US = maceração auxiliada por ultrassom; AE = maceração sob agitação eletromagnética; R = extração em sistema contínuo de refluxo. Condição cromatográfica C, item 4.2.1.

Para as substâncias identificadas como picos 1, 2 e 4, não houve diferença estatística para os diferentes métodos extrativos e solventes / misturas de solventes testados.

Para a extração da substância 3 (pico 3), o método por refluxo, utilizando etanol como solvente (EtOH R) foi estatisticamente diferente dos sistemas EtOH US; EtOH AE; EtOH: AcOEt (1:1) US, R e AE, mas sem diferença estatística quando se utilizou os solventes EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2) para todos os métodos (**GRÁFICO 9**).

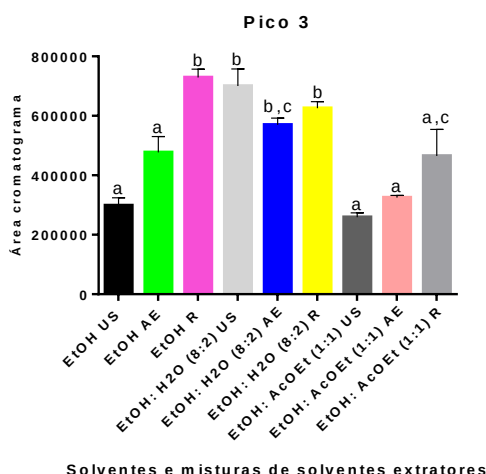


**Gráfico 9** – Avaliação dos métodos extrativos em extratos de *C. lineatifolia*, em função da área do cromatograma obtido por CLUE-UV/DAD, para a substância 3 (pico 3). Legenda: EtOH = etanol; H<sub>2</sub>O = água; AcOEt = acetato de etila; US = maceração auxiliada por ultrassom; AE = maceração sob agitação eletromagnética; R = extração em sistema contínuo de refluxo. Teste: Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey ( $n=3$ ). Cada barra representa a média  $\pm$  EPM e <sup>a,b,c</sup> representam as médias que diferem entre si ( $p < 0,05$ ). Condição cromatográfica C, item 4.2.1.

Para a extração da substância 5 (pico 5), o método de maceração com auxílio de ultrassom (US), utilizando-se a mistura de solventes EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2), foi estatisticamente mais eficiente em relação aos sistemas EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2) AE e R; EtOH US e AE; EtOH: AcOEt (1:1) US, AE e R, mas sem diferença estatística quando se utilizou o solvente etanol, no sistema de refluxo (EtOH R), conforme **Gráfico 10**.

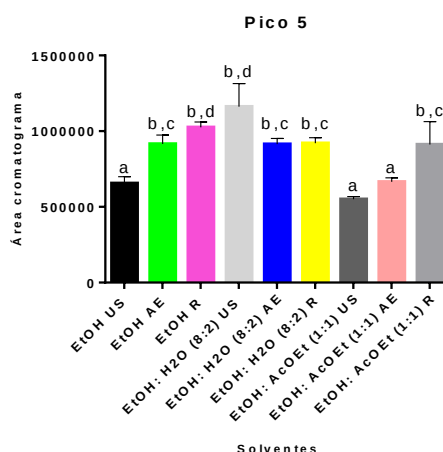


**Gráfico 10** – Avaliação dos métodos extrativos em extratos de *C. lineatifolia*, em função da área do cromatograma obtido por CLUE-UV/DAD, para a substância 5 (pico 5). Legenda: EtOH = etanol; AcOEt = acetato de etila; US = maceração auxiliada por ultrassom; AE = maceração sob agitação eletromagnética; R = extração em sistema contínuo de refluxo. Teste: Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey (n=3). Cada barra representa a média ± EPM e <sup>a,b,c</sup> representam as médias que diferem entre si (p<0,05). Condição cromatográfica C, item 4.2.1.

### 3.4 Conclusões

As extrações por EtOH R e EtOH:H<sub>2</sub>O (8:2) US representaram métodos otimizados para a obtenção das substâncias majoritárias selecionadas (1 a 5). A eficiência dessas extrações também demonstrou a influência da utilização de solventes polares isolados (EtOH) e de mistura hidroalcoólica (EtOH:H<sub>2</sub>O 8:2, v/v) na extração de substâncias flavonoídicas de *C. lineatifolia*, demonstrando o perfil da solubilidade das substâncias de interesse em solventes polares. O uso de “solventes verdes” está sendo priorizado em análises de rotina do laboratório, visando estabelecer as “impressões digitais” cromatográficas de inúmeras amostras de plantas. Tal enfoque é particularmente útil para análise de plantas medicinais devido ao programa criado pelo Ministério da Saúde para viabilizar o uso de fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2009; FUNARI *et al.*, 2014) e atender aos regulamentos da ANVISA para o uso seguro de fitoterápicos. Portanto, para fins práticos e sustentáveis, o sistema por refluxo utilizando-se etanol como solvente foi selecionado para as etapas de desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação dos marcadores, bem como para os testes *in vivo* e *in vitro*.

## Referências

- ANDERSEN, O.M; MARKHAM, K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry an applications. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006. 1237 p.
- BARBOSA, J. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2009.
- BODOIRA, R, VELEZ, A, ANDREATTA, AE, MARTÍNEZ, M, MAESTRI, D. (2017). Extraction of bioactive compounds from sesame (*Sesamum indicum* L.) defatted seeds using water and ethanol under sub-critical conditions. *Food Chemistry*, 237, 114–120.
- BODOIRA, R, VELEZ, A, ROVETTO, L, RIBOTTA, P, MAESTRI, D, MARTÍNEZ, M. (2019). Subcritical Fluid Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistacia vera* L.) Nuts: Experiments, Modeling, and Optimization. *J Food Sci.*, 0, 1-8.
- BRASIL. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p.
- CALEJA, C, BARROS, L, PRIETO, MA, BARREIRO OLIVEIRA, M.F, FERREIRA, ICFR. (2017). Extraction of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* L. by heat-, microwave- and ultrasound-assisted extraction techniques: A comparative study through response surface analysis. *Separation and Purification Technology*, 186, 297–308.
- CHURCHWELL, MI, TWADDLE, NC, MEEKER, LR, DOERGE, DR. (2005). Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *J. Chromatogr. B.* 825:134–143.
- CUEVAS-VALENZUELA, J, GONZÁLEZ-ROJAS, A, WISNIAK, J, APELBLAT, A, PÉREZ-CORREA, JR. (2004). Solubility of (+)-catechin in water and water-ethanol mixtures within the temperature range 277.6–331.2 K: Fundamental data to design polyphenol extraction processes. *Fluid Phase Equilibria*, 382: 279-285.
- DANESHFAR, A, GHAZIASKAR, HS, HOMAYOUN, N. (2008). Solubility of Gallic Acid in Methanol, Ethanol, Water, and Ethyl Acetate. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 53(3), 776–778.
- DUBA, KS, CASAZZA, AA, MOHAMED, HB, PEREGO, P, FIORI, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food Bioproducts Processing*, 94, 29–38.
- ERLUND, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.*, v.24, p.851-874.
- FERREIRA, LC, GRABE-GUIMARÃES, A, DE PAULA, CA, MICHEL, MC, GUIMARÃES, RG, REZENDE, SA, DE SOUZA FILHO, JD, SAÚDE-GUIMARÃES,

- DA. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol.* Jan 9;145(1):100-8.
- FUNARI, CS, CARNEIRO, RL, ANDRADE, AM, HILDER, EF, CAVALHEIRO, AJ. (2014). Green chromatographic fingerprinting: an environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. *Journal of separation science*, 37(1-2):37-44.
- HERMANN, K. (1988). On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm. Unters. F. A*, v.186, p.1-5.
- JACQUES, AC, PERTUZATTI, PB, BARCIA, MT, ZAMBIAZI, RC, CHIM, JF. (2010). Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. *Química Nova (Online)*, v. 33, p. 1720-1725.
- KLAFKE, JZ, ARNOLDI DA SILVA, M, FORTES ROSSATO, M, TREVISAN, G, BANDERÓ WALKER, CI, MARTINS LEAL, CA, OLSCHOWSKY BORGES, D, CHITOLINA SCHETINGER, MR, NOAL MORESCO, R, MEDEIROS FRESCURA DUARTE, MM, SOARES DOS SANTOS, AR, NAZÁRIO VIECILI, PR, FERREIRA, J. (2012). Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:954748.
- MABRY, T, MARKHAM, KR., THOMAS, MB. The Systematic Identification of Flavonoids. *Springer-Verlag New York Inc.* 1970.
- MACHADO, KN, FREITAS, AAD, CUNHA, LH, FARACO, AAG, PÁDUA, RMD, BRAGA, FC, VIANNA-SOARES, CD, CASTILHO, RO. (2017). A rapid simultaneous determination of methylxantines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). *Food Chemistry*. 15; 239:180-188.
- MADALOSSO, RC. *et al.* (2012). *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 772-779.
- MARKMAN, BEO, BACCHI, EM, KATO, ETM. (2004). Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 1, p. 55-57.
- MARSTON, A, HOSTETTMANN, K. Separation and quantification of flavonoids. Pp. 1–36 in *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*, eds. Andersen, Ø., Markham, K. R., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2006.
- ORTEGA, N, ROMERO, M.P, MACIÀ, A, REGUANT, J, ANGLÈS, N, MORELLÓ, JR, MOTILVA, MJ. (2010). Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *J. Food Compost. Anal.* 23:298–305.
- PASCOAL, AC, EHRENFRIED, CA, LOPEZ, BG, DE ARAUJO, TM, PASCOAL, VD, GILIOLI, R, ANHÊ, GF, RUIZ, AL, CARVALHO, JE, STEFANELLO, ME, SALVADOR, MJ. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules*. Feb 7;19 (2):1843-55.

- PORTO, HSM. HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. 2014.
- SAFDAR, MN, KAUSAR, T, JABBAR, S, MUMTAZ, A, AHAD, K, SADDIZAI, AA. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 25(3): 488-500.
- SHARMA, SS, GUPTA, YK. (2015). Drug development from natural resource: a systematic approach. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v15, n. 1, p. 52–57.
- SOUZA-MOREIRA, TM, SALVAGNINI, LE, SANTOS, E, SILVA, VY, MOREIRA, RR, SALGADO, HR, PIETRO, RC. (2011). Antidiarrheal activity of *Campomanesia xanthocarpa* fruit. *J Med Food*. May;14(5):528-31.
- SRINIVAS, K, KING, JH, HOWARD, LR, MONRAD, JK. (2010). Solubility of Gallic Acid, Catechin, and Protocatechuic Acid in Subcritical Water from (298.75 to 415.85) K. *J. Chem. Eng. Data*, 55 (9), pp 3101–3108.
- VAN DER SLUIS, AA, DEKKER, M, & VAN BOEKEL, MAJS. (2005). Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 3. Stability during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1073–1080.
- VUONG, QV, STATHOPOULOS, CE, NGUYEN, MH, GOLDING, JB, & ROACH, PD. (2011). Isolation of Green Tea Catechins and Their Utilization in the Food Industry. *Food Reviews International*, 27(3), 227–247.
- XU, H, WANG, W, LIU, X, YUAN, F, & GAO, Y. (2015). Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products*, 76, 946–954.

---

## CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS NO EXTRATO

---

### 4.1 Introdução

O desenvolvimento de método analítico faz-se necessário para contribuir com a padronização químico-biológica do extrato de *C. lineatifolia*, bem como identificar os marcadores químicos da espécie.

O mapeamento completo da constituição metabólica de uma espécie exige, necessariamente, o uso de instrumentos e de técnicas analíticas avançadas de alto desempenho, isto porque, em plantas, geralmente se obtém uma mistura complexa de substâncias por extração com solventes. O acoplamento de uma técnica que leve à separação dos constituintes de uma amostra com uma ou mais técnicas espectroscópicas que tragam informações sobre a estrutura destes constituintes é frequentemente utilizado para o estabelecimento dos perfis metabólicos de amostras. Dentre as técnicas de separação mencionadas, a cromatografia líquida de alta e ultra eficiência, CLAE e CLUE, respectivamente, associadas ao detector de UV e de arranjo de diodos (DAD) são as mais utilizadas em estudos metabolômicos por serem adequadamente compatíveis com grande número de analitos. Além disso, CLAE e CLUE são instrumentos de fácil manuseio, podem ser totalmente automatizados e exibem boa resolução, reprodutibilidade e seletividade (CORDEL e SHIN, 1999; TISTAERT, DEJAEGHER e HEYDEN, 2011; ZHONG, LI e JIANG, 2009; FUNARI *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a utilização de CLUE nas análises de extratos vegetais tem sido relatada como sendo uma técnica que trouxe novas possibilidades em cromatografia líquida, especialmente em relação à diminuição do tempo e consumo de solventes (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Basicamente, a técnica combina a utilização de colunas com partículas de diâmetro menor do que 2 mm e instrumentação que permite operar com altas pressões da fase móvel (6.000 – 15.000 psi), o que possibilita diminuição significativa do tempo de análise em comparação com a CLAE convencional. Esta é uma importante vantagem na análise de extratos

vegetais complexos em medicamentos fitoterápicos ou em programas de triagem para busca de substâncias bioativas em extratos vegetais (YARIWAKE, PEREIRA e MCCULLAGH, 2006).

Assim, considerando as vantagens da técnica, a partir das condições cromatográficas inicialmente estabelecidas para obtenção do perfil exploratório de extratos de *C. lineatifolia*, foram realizadas modificações visando à transferência do método para uma condição por CLUE, para promover a separação adequada dos flavonoides presentes com menor tempo de análise e consumo de solventes.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Desenvolvimento de método analítico

Para o desenvolvimento do método analítico, foi utilizado o extrato etanólico obtido por extração contínua em sistema de refluxo (EtOH R), o qual se mostrou otimizado em relação às substâncias majoritárias flavonoídicas identificadas por CLAE e CLUE.

As modificações realizadas a partir da condição inicial estabelecida na obtenção do perfil exploratório de extrato de *C. lineatifolia* visaram à transferência do método para uma condição por CLUE, com a utilização da calculadora de Colunas Waters® ACQUITY UPLC, conforme descrito no item 3.2.4.

A partir da condição A (**TABELA 6**) foram realizadas as modificações necessárias para separação dos picos de interesse e otimização do método de análise. Os parâmetros avaliados para o desenvolvimento do método incluíram o preparo da solução amostra, o modificador orgânico, temperatura do forno, fluxo, inclinação do gradiente e tempo de análise. As condições avaliadas estão sumarizadas na **Tabela 6**. Em todas as condições avaliadas, o volume de injeção foi de 2,0 µL, com utilização de pré-coluna VanGuard™ C18 (2,1 x 5 mm d.i., 1,7 µm) (Waters), coluna Acquity UPLC® BEH C18 (100 x 2,1 mm d.i., 1,7 µm). As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 335 nm, sendo os cromatogramas registrados em uma faixa espectral de 200 a 600 nm.

Para as condições experimentais, as soluções dos extratos foram preparadas em metanol grau CLAE (conforme descrito no item 3.2.4).

O cálculo do volume morto foi determinado teoricamente, por meio da fórmula:

$$V_0 = (\pi \times r^2 \times C) (0,5)$$

Onde: r = raio interno da coluna, em mm; C = comprimento da coluna, em mm.

**TABELA 6** – Condições cromatográficas (A-P) por CLUE para o desenvolvimento do método analítico para quantificação das substâncias de interesse em extrato etanólico de *C. lineatifolia*.

| Purificação das substâncias de interesse em extrato etanólico de <i>C. maritima</i> . |           |    |    |           |                   |                         |           |   |    |           |                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|----|-----------|-------------------|-------------------------|-----------|---|----|-----------|-------------------|
| t<br>(min)                                                                            | ELUENTE % |    |    | T<br>(°C) | FLUXO<br>(mL/min) | t (min)                 | ELUENTE % |   |    | T<br>(°C) | FLUXO<br>(mL/min) |
|                                                                                       | A         | B  | C  |           |                   |                         | A         | B | C  |           |                   |
| Condição experimental A                                                               |           |    |    |           |                   | Condição experimental B |           |   |    |           |                   |
| 0                                                                                     | 95        | -  | 5  | 40        | 0,3               | 0                       | 95        | - | 5  | 40        | 0,3               |
| 48                                                                                    | 60        | -  | 40 |           |                   | 18                      | 82        | - | 18 |           |                   |
| 56                                                                                    | 95        | -  | 5  |           |                   | 22                      | 95        | - | 5  |           |                   |
| Condição experimental C                                                               |           |    |    |           |                   | Condição experimental D |           |   |    |           |                   |
| 0                                                                                     | 95        | -  | 5  | 40        | 0,3               | 0                       | 98        | - | 2  | 40        | 0,3               |
| 1                                                                                     | 92        | -  | 8  |           |                   | 2                       | 85        | - | 15 |           |                   |
| 22                                                                                    | 78        | -  | 22 |           |                   | 5                       | 85        | - | 15 |           |                   |
| 25                                                                                    | 5         | -  | 95 |           |                   | 18                      | 5         | - | 95 |           |                   |
| 27                                                                                    | 5         | -  | 95 |           |                   | 18,1                    | 5         | - | 95 |           |                   |
| 30                                                                                    | 95        | -  | 5  |           |                   | 20                      | 98        | - | 2  |           |                   |
|                                                                                       |           |    |    |           |                   | 25                      | 98        | - | 2  |           |                   |
| Condição experimental E                                                               |           |    |    |           |                   | Condição experimental F |           |   |    |           |                   |
| 0                                                                                     | 98        | -  | 2  | 40        | 0,3               | 0                       | 98        | - | 2  | 40        | 0,3               |
| 6,5                                                                                   | 85        | -  | 15 |           |                   | 1                       | 92        | - | 8  |           |                   |
| 16,5                                                                                  | 85        | -  | 15 |           |                   | 10                      | 85        | - | 15 |           |                   |
| 17                                                                                    | 5         | -  | 95 |           |                   | 20                      | 85        | - | 15 |           |                   |
| 19                                                                                    | 5         | -  | 95 |           |                   | 20,5                    | 5         | - | 95 |           |                   |
| 20                                                                                    | 98        | -  | 2  |           |                   | 22                      | 5         | - | 95 |           |                   |
| 25                                                                                    | 98        | -  | 2  |           |                   | 25                      | 98        | - | 2  |           |                   |
|                                                                                       |           |    |    |           |                   | 30                      | 98        | - | 2  |           |                   |
| Condição experimental G                                                               |           |    |    |           |                   | Condição experimental H |           |   |    |           |                   |
| 0                                                                                     | 98        | 2  | -  | 40        | 0,3               | 0                       | 95        | - | 5  | 40        | 0,3               |
| 6,5                                                                                   | 85        | 15 | -  |           |                   | 5                       | 85        | - | 15 |           |                   |
| 16,5                                                                                  | 85        | 15 | -  |           |                   | 13                      | 80        | - | 20 |           |                   |
| 17                                                                                    | 5         | 95 | -  |           |                   | 13,1                    | 5         | - | 95 |           |                   |
| 19                                                                                    | 5         | 95 | -  |           |                   | 15                      | 5         | - | 95 |           |                   |
| 20                                                                                    | 98        | 2  | -  |           |                   | 17                      | 95        | - | 5  |           |                   |
| 25                                                                                    | 98        | 2  | -  |           |                   | 20                      | 95        | - | 5  |           |                   |

| Condição experimental I |    |   |    |    |      | Condição experimental J |    |   |    |    |      |
|-------------------------|----|---|----|----|------|-------------------------|----|---|----|----|------|
| 0                       | 95 | - | 5  |    |      | 0                       | 85 | - | 15 |    |      |
| 1                       | 85 | - | 15 |    |      | 10                      | 79 | - | 21 |    |      |
| 10                      | 79 | - | 21 |    |      | 10,1                    | 5  | - | 95 |    |      |
| 10,1                    | 5  | - | 95 | 40 | 0,3  | 12                      | 5  | - | 95 | 40 | 0,3  |
| 12                      | 5  | - | 95 |    |      | 13                      | 95 | - | 5  |    |      |
| 13                      | 95 | - | 5  |    |      | 15                      | 95 | - | 5  |    |      |
| 15                      | 95 | - | 5  |    |      |                         |    |   |    |    |      |
| Condição experimental K |    |   |    |    |      | Condição experimental L |    |   |    |    |      |
| 0                       | 85 | - | 15 |    |      | 0                       | 85 | - | 15 |    |      |
| 9                       | 80 | - | 20 |    |      | 9                       | 80 | - | 20 |    |      |
| 9,1                     | 5  | - | 95 |    |      | 9,1                     | 5  | - | 95 |    |      |
| 11                      | 5  | - | 95 | 40 | 0,3  | 11                      | 5  | - | 95 | 40 | 0,27 |
| 12                      | 85 | - | 15 |    |      | 12                      | 85 | - | 15 |    |      |
| 15                      | 85 | - | 15 |    |      | 15                      | 85 | - | 15 |    |      |
| Condição experimental M |    |   |    |    |      | Condição experimental N |    |   |    |    |      |
| 0                       | 85 | - | 15 |    |      | 0                       | 85 | - | 15 |    |      |
| 9                       | 80 | - | 20 |    |      | 9                       | 80 | - | 20 |    |      |
| 9,1                     | 5  | - | 95 |    |      | 9,1                     | 5  | - | 95 |    |      |
| 11                      | 5  | - | 95 | 40 | 0,33 | 11                      | 5  | - | 95 | 45 | 0,3  |
| 12                      | 85 | - | 15 |    |      | 12                      | 85 | - | 15 |    |      |
| 15                      | 85 | - | 15 |    |      | 15                      | 85 | - | 15 |    |      |
| Condição experimental O |    |   |    |    |      | Condição experimental P |    |   |    |    |      |
| 0                       | 85 | - | 15 |    |      | 0                       | 85 | - | 15 |    |      |
| 9                       | 80 | - | 20 |    |      | 9                       | 80 | - | 20 |    |      |
| 9,1                     | 5  | - | 95 |    |      | 9,1                     | 5  | - | 95 |    |      |
| 11                      | 5  | - | 95 | 35 | 0,3  | 11                      | 5  | - | 95 | 45 | 0,27 |
| 12                      | 85 | - | 15 |    |      | 12                      | 85 | - | 15 |    |      |
| 15                      | 85 | - | 15 |    |      | 15                      | 85 | - | 15 |    |      |

Legenda: CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência; t = tempo; min = minutos; Eluentes A = água + 0,1% de CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; B = metanol + 0,1% de CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C = acetonitrila; T = temperatura.

A condição cromatográfica selecionada dentro da avaliação dos parâmetros propostos para o extrato enriquecido em fenólicos (EtOH R) foi a condição experimental K.

### 4.3 Resultados e discussão

A análise preliminar dos extratos de *C. lineatifolia* por CLAE em uma condição cromatográfica exploratória, conforme discutido no item 3.3.1, permitiu uma avaliação qualitativa de sua

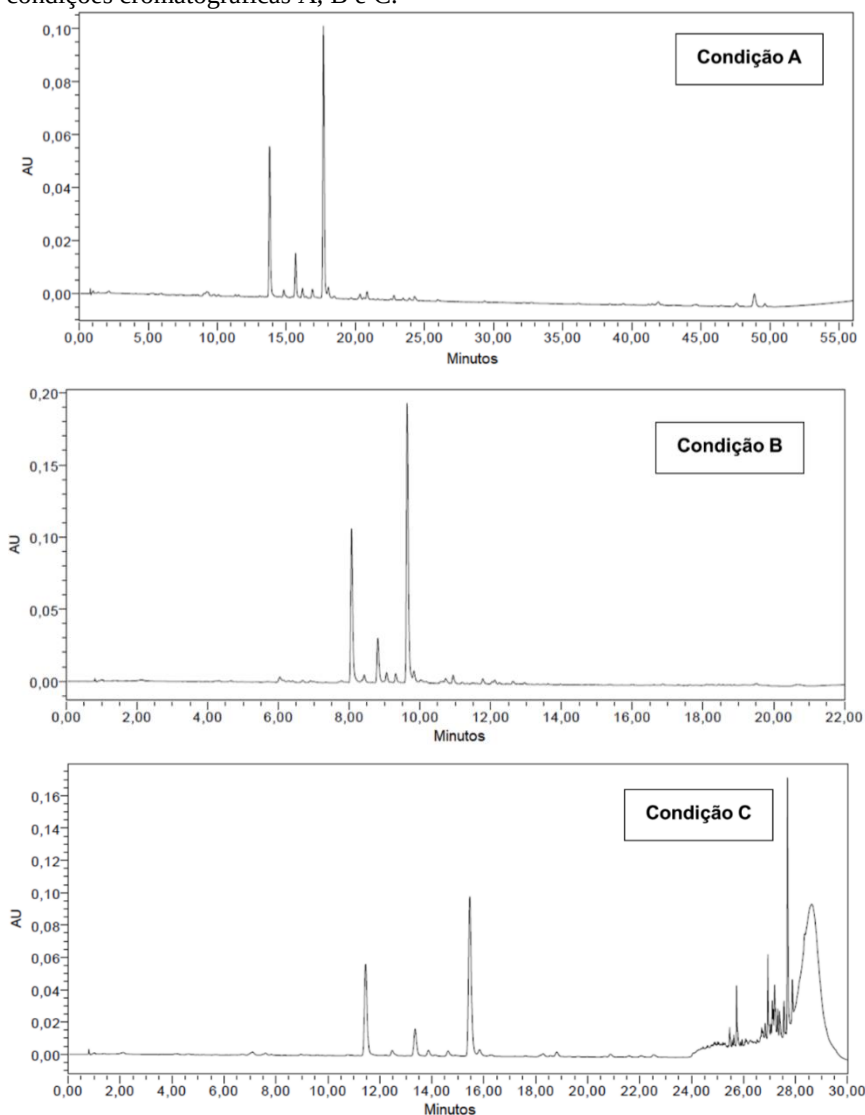
composição química. No entanto, verificou-se a necessidade de reduzir o tempo da corrida cromatográfica, melhorar a separação e resolução entre os picos das substâncias presentes, a fim de possibilitar uma análise mais detalhada da composição química dos extratos, assim como permitir uma análise quantitativa dos marcadores selecionados.

Como já discutido no item 3.3.1, para se estabelecer uma condição inicial em CLUE, foi utilizada a Calculadora de Colunas Waters® ACQUITY UPLC, uma ferramenta que realiza de forma automatizada os cálculos de escala necessários para converter métodos que empregam CLAE isocráticos ou por gradiente em métodos por CLUE. Assim, a partir dos dados referentes à condição cromatográfica exploratória por CLAE inicialmente avaliada (**TABELA 3**, item 3.2.3), a ferramenta forneceu a condição por CLUE que seria equivalente, a qual foi denominada condição **A** (**TABELA 6**, item 4.2.1). Para o desenvolvimento do método analítico, tendo em vista os perfis cromatográficos obtidos em CLUE-UV/DAD, bem como seus espectros no UV, apenas as substâncias **3**, **4** e **5** foram selecionadas. Numa varredura inicial, observou-se uma melhora significativa na resolução do cromatograma quando a leitura foi realizada em comprimento de onda de 335 nm, por ser este mais seletivo para os flavonoides. Matos *et al.* (2016) demonstram que as respostas analíticas de flavonoides em extratos não sofrem variações ou interferências significativas quando os comprimentos de onda são próximos.

Na condição **A**, observou-se que as substâncias de interesse foram todas eluídas no tempo de, aproximadamente, 18 minutos de análise. Assim, objetivando-se a redução do tempo de análise, mantendo-se a inclinação do gradiente em  $0,7\% \text{ min}^{-1}$ , foi proposta a condição **B**, em um menor tempo de análise (22 minutos). À sequência, na condição **C**, aumentou-se a inclinação do gradiente para  $3\% \text{ min}^{-1}$  no primeiro minuto, com o intuito de os picos de interesse eluírem em menor tempo de retenção. Em seguida (tempo 1 a 22 minutos), retornou-se à inclinação do gradiente para  $0,7\% \text{ min}^{-1}$ . Com o objetivo de eliminar os picos apolares que não eram de interesse, no tempo de 22 a 25 minutos, aumentou-se a força da fase móvel, mantendo-se uma condição isocrática por 3 minutos. Observa-se, também, que na condição **C**, os picos de interesse apresentaram boa separação, comparados aos perfis obtidos nas condições **A** e **B** (**FIGURA 18**), com resoluções de 5,18; 2,75 e 2,03. Segundo o guia *FDA-Validation of Chromatographic Methods* (CDER, 1994), uma boa resolução é aquela que se encontra em valores superiores a 2,0. Ainda, segundo a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC,

2019), em matrizes complexas como extratos, resoluções superiores a 1,5 são consideradas aceitáveis.

**FIGURA 18** – Cromatogramas obtidos por CLUE-UV/DAD (335 nm) para o extrato etanólico de *Campomanesia lineatifolia*, nas condições cromatográficas A, B e C.



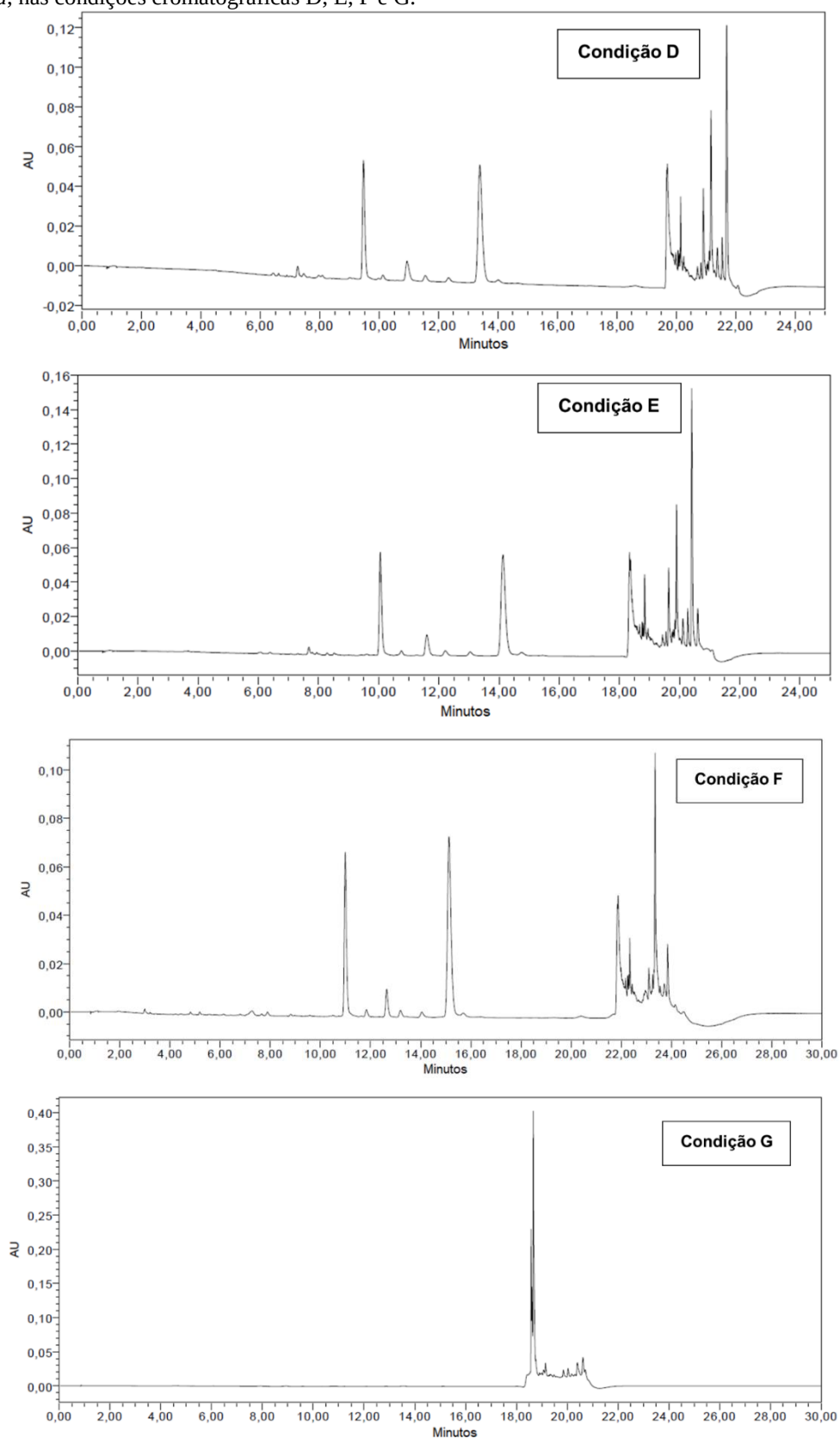
Legenda: CLUE-UV/DAD = cromatografia líquida de ultra eficiência-ultravioleta/arranjo diodo.  
Nota: condições cromatográficas: vide item 4.2.1, Tabela 6.

Conforme análise das condições experimentais **A**, **B** e **C**, observou-se que, a proporção de 15% de ACN foi um percentual eficiente para a eluição dos picos de interesse. Assim, foi proposta a condição **D**, mantendo-se uma condição isocrática nesta proporção de ACN para eluição, no tempo de 2 a 5 minutos. Ainda nesta condição, também foi proposta a utilização de gradiente inicial de menor força, como estratégia útil para promover melhor interação dos componentes do extrato com a coluna e promover uma melhor separação entre os picos (SNYDER *et al.*, 1997; NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Para esta condição, a **Figura 19** demonstra que houve uma

alteração da linha de base quando se reduziu a força inicial da fase móvel. Para contornar este problema, na condição **E** foi mantida a proporção de ACN, mas com maior tempo inicial nesta condição (tempo 0 a 6,5 minutos, 2% ACN), o que melhorou a linha de base, mas a separação entre os picos permaneceu praticamente inalterada. Na condição **F**, a fase móvel inicial foi composta de um gradiente também mais fraco, porém com um aumento mais gradativo (0-1 min: 2% ACN; 1-10 min: 8% ACN). A mesma condição isocrática de 15% de ACN foi mantida (10-20 min). Ainda nesta condição, é importante ressaltar que a solução para injeção foi preparada em mistura de MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) objetivando-se avaliar o perfil de solubilização da amostra a ser injetada. Como pode ser visto na **Figura 19**, não houve alterações significativas na separação dos picos, mas observou-se um aumento nos tempos de retenção dos 3 picos analisados.

Em condições exploratórias no desenvolvimento de um método cromatográfico é usual empregar acetonitrila como modificador orgânico, pelo fato deste, em geral, apresentar maior versatilidade e menor viscosidade que os demais solventes comumente empregados em cromatografia líquida. A determinação do modificador orgânico é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento de um método cromatográfico, já que o perfil cromatográfico é altamente influenciado pela seletividade do solvente (SNYDER *et al.*, 1997; SNYDER *et al.* 2010). Com a proposta de se modificar o solvente orgânico inicial (condição **G**), a mesma condição **E** foi repetida, alterando-se o modificador orgânico de ACN para metanol. Essa substituição não se demonstrou eficaz, tendo em vista que todos os picos foram eluídos juntos. De acordo com o resultado então obtido, decidiu-se continuar utilizando acetonitrila como modificador orgânico.

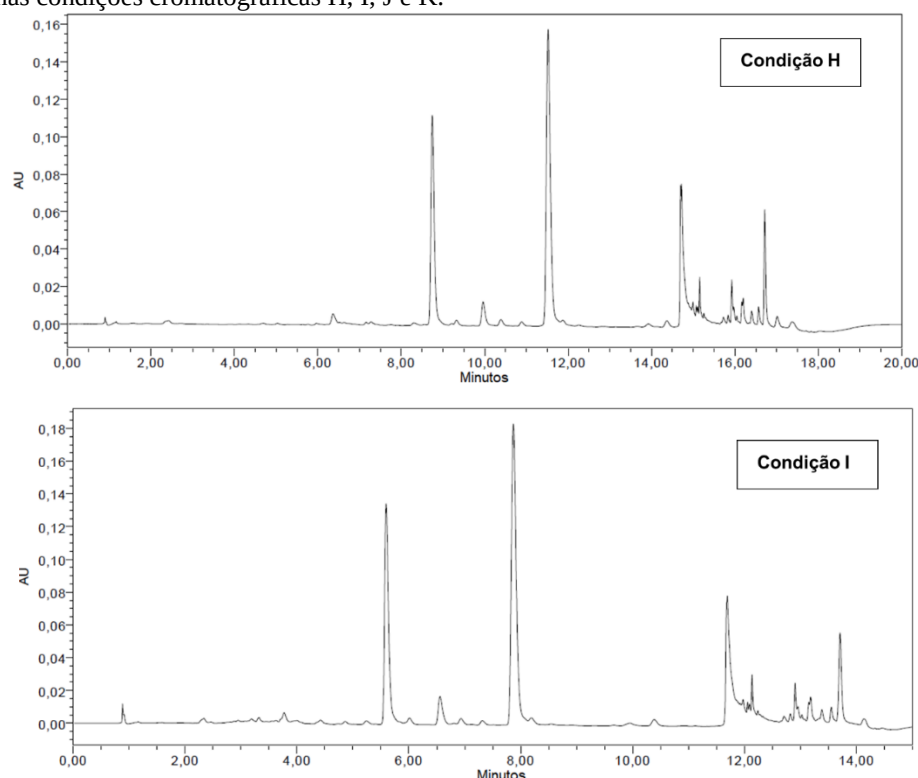
**FIGURA 19** – Cromatogramas obtidos por CLUE-UV/DAD (335 nm) para o extrato etanólico de *Campomanesia lineatifolia*, nas condições cromatográficas D, E, F e G.



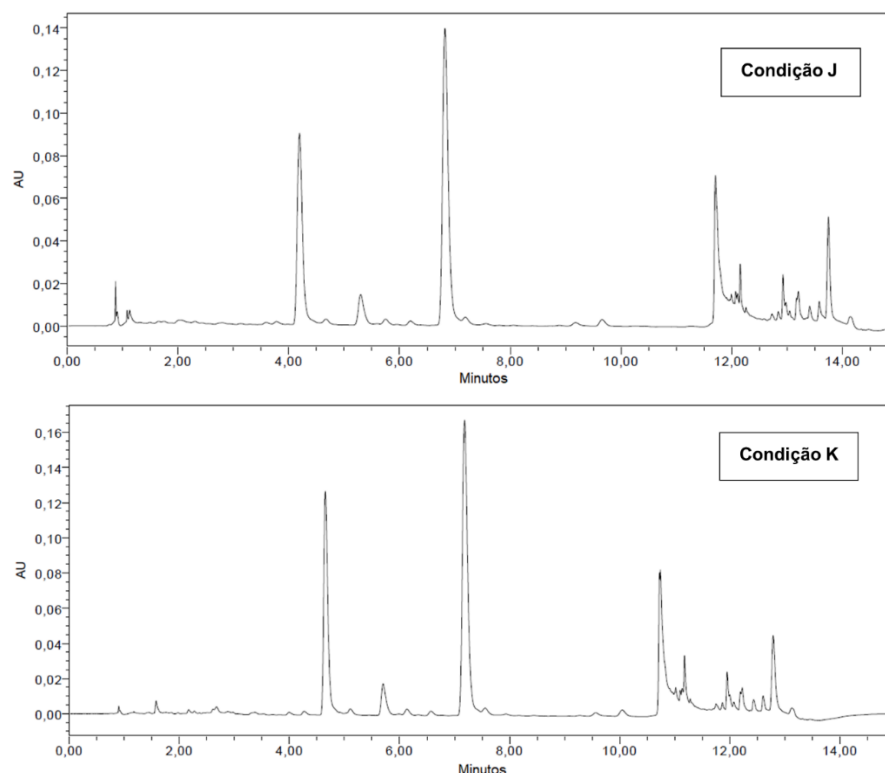
Legenda: CLUE-UV/DAD = cromatografia líquida de ultra eficiência-ultravioleta/arranjo diodo. Condições cromatográficas: vide item 4.2.1, Tabela 6.

Ainda seguindo a observação de que os picos de interesse eluem em proporção de 15% de ACN, foram propostas as condições **H** e **I**, com menor quantidade de modificador orgânico, ACN a 5% e redução do tempo do primeiro eluente, 5 e 1 minutos, respectivamente, na tentativa de se reduzirem também os tempos de retenção dos picos, mas mantendo a inclinação do gradiente próxima de  $0,7\% \text{ min}^{-1}$ . Conforme demonstra a **Figura 20**, os picos eluíram em menores tempos de retenção, com boa resolução dos picos (3,19; 2,11 e 2,24) na condição **I**, mantendo-se a fase móvel em 95:5 por curto período de tempo. Diante do resultado obtido, observou-se que a fase móvel inicial não exerceu interferência significativa na eluição dos picos de interesse. Assim, para a condição **J**, novamente se iniciou a corrida cromatográfica com fase móvel a 15% de ACN. Nesta condição, todos os picos de interesse eluíram até 8 minutos, mantendo boa resolução entre eles (2,89; 2,51 e 2,14). Na proposta, então, de nova condição **K**, a inclinação do gradiente foi mantida próxima a  $0,7\% \text{ min}^{-1}$  até 9 minutos, com resoluções de pico 3,35; 2,14 e 2,28.

**FIGURA 20** – Cromatogramas obtidos por CLUE-UV/DAD (335 nm) para o extrato etanólico de *Campomanesia lineatifolia*, nas condições cromatográficas H, I, J e K.



Continuação FIGURA 20



Legenda: CLUE-UV/DAD = cromatografia líquida de ultra eficiência-ultravioleta/arranjo diodo.

Nota: condições cromatográficas: vide item 4.2.1, Tabela 6.

Nas condições seguintes (**L**, **M**, **N**, **O** e **P**), foram propostas modificações relacionadas às variações de temperatura do forno (35 °C e 45 °C) e fluxo de injeção do solvente (0,27 mL/min e 0,33 mL/min), individuais e em combinação.

O controle da temperatura da coluna em cromatografia líquida passou a ocorrer principalmente após o desenvolvimento das fases reversas (inicialmente C-18 e C-8), uma vez que o mecanismo predominante neste tipo de separação é a partição, que depende da solubilidade relativa do analito entre duas fases e esta depende da temperatura. Assim, maior atenção passou a ser dada a este parâmetro de forma a se obter melhor reprodução dos tempos de retenção. Em geral, o aumento da temperatura da coluna auxilia na transferência do analito da fase estacionária para a fase móvel, diminuindo significativamente o tempo de análise e aumentando a eficiência das colunas e a sensibilidade da detecção pelo estreitamento das bandas cromatográficas (LANÇAS, 2009). Com relação ao fluxo de injeção, a redução pode promover aumento da interação dos analitos com a fase estacionária e, por isso, melhorar a separação entre os picos, porém as alterações devem ser cuidadosas visto que fluxos muito baixos geram alargamento dos picos, o que pode causar um efeito contrário na resolução. Já quando se

aumenta a velocidade linear média da fase móvel, pode-se observar uma redução significativa no tempo de eluição dos analitos, mas, ao mesmo tempo, pode haver sobreposição de picos que apresentem semelhança química estrutural. Apesar das vantagens descritas, as novas condições propostas não representaram diferenças significativas em comparação com a condição **K**.

Definida a condição experimental mais eficiente (**condição K**), nos parâmetros avaliados em função da separação, assimetria e resolução dos picos, modificador orgânico e tempo de análise, foi proposta a avaliação do preparo da solução a ser injetada, utilizando-se a mesma proporção da condição da fase móvel inicial, ou seja, H<sub>2</sub>O:ACN (85:15, v/v). Em análises por CLUE, é importante considerar a compatibilidade da solução empregada para a solubilização final das amostras com a fase móvel. A fim de se evitar alargamentos ou distorções dos picos, o solvente de diluição deve ser miscível com a fase móvel (SNYDER *et al.*, 2010). Observou-se que, o preparo da solução de extrato EtOH R em mistura de solventes correspondente à fase móvel inicial empregada no sistema de eluição, não alterou o perfil quantitativo e os tempos de retenção das substâncias flavonoídicas majoritárias de interesse, comparado com o preparo da mesma solução de extrato EtOH R em metanol.

#### 4.4 Conclusões

A condição experimental final foi definida pela **condição K**, com preparo da solução a ser injetada utilizando-se a mistura de solventes H<sub>2</sub>O:ACN (85:15, v/v). Esta condição será aquela utilizada para a validação do método analítico cromatográfico, bem como para a quantificação dos marcadores flavonoídicos selecionados.

#### Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (**AOAC**). Appendix K, Part I: Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2019.
- CDER reviewer guidance: validation of chromatographic methods, US Food and Drug Administration, Centre for Drugs and Biologics, Department of Health and Human Services. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>. November 1994.

- CORDELL, GA; SHIN, YG. (1999). Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural products extracts. *Pure Appl. Chem.*, 71(6): 1089-1094.
- FUNARI, CS, CASTRO-GAMBOA, I, CAVALHEIRO, AJ, BOLZANI, VS. (2013). Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Quim. Nova*, 36(10): 1605-1609.
- LANÇAS, FM. (2009). Estratégias para diminuição do tempo de análise em Cromatografia Líquida Moderna. *Scientia Chromatographica*, v. 1(4): 39-47.
- NOVÁKOVÁ, L, SPÁCIL, Z, SEIFRTOVÁ, M, OPLETAL, L, SOLICH, P. (2010). Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. *Talanta* 15;80(5):1970-1979.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. 2.ed. *New York: Wiley-Interscience Publication*, 1997, 765 p.
- SNYDER, LR, KIRKLAND, JJ, DOLAN, JW. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3.ed. *New Jersey John Wiley & Sons*, 2010, 912 p.
- TISTAERT, C, DEJAEGHER, B, VANDER HEYDEN, H. (2011). Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. *Anal. Chim. Acta*, 690(2): 148-161.
- YARIWAKE, JH, PEREIRA, CAM, MCCULLAGH, M. (2006). Análise de extratos de passiflora por UPLC (cromatografia líquida de ultra-alta pressão). *Anais. São Paulo: SBQ*, 2006. Disponível em: <https://bdpi.usp.br/item/001524587>. Acesso em 05 Mai. 2019.
- ZHONG, XK, LI, DC, JIANG, JG. (2009). Identification and quality control of Chinese medicine based on the fingerprint techniques. *Curr. Med. Chem.*, 16(23): 3064-3075.

---

## CAPÍTULO 5: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NO EXTRATO

---

### 5.1 Introdução

Diversas espécies do gênero *Campomanesia* sp. foram estudadas quanto a sua caracterização química e atividades farmacológicas, tendo em vista a variedade dos metabólitos secundários presentes.

Estudos prévios têm descrito uma grande variedade de substâncias fenólicas, dentre eles flavonoides, estilbenos e taninos, saponinas, monoterpenos e sesquiterpenos. No entanto, poucos estudos reportaram o perfil fitoquímico de *C. lineatifolia* (TABELA 2, item 2.3). Neste cenário, destaca-se a importância de se realizar o isolamento e identificação dos constituintes de *C. lineatifolia*, para a seleção de possíveis marcadores químicos para o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação destes marcadores e a padronização do extrato em relação à atividade antiúlcera gástrica.

Além dos métodos tradicionais cromatográficos, *i.e.*, cromatografia em camada delgada (CCD), CLAE e CLUE, a técnica de cromatografia em contracorrente torna-se uma ferramenta importante nos processos de fracionamento e purificação de padrões químicos de produtos naturais (LEITE *et al.*, 2005; LEITÃO *et al.*, 2012 apud LEITÃO *et al.*, 2017; FRIESEN *et al.*, 2015). Esta técnica de cromatografia líquido-líquido é ideal para a separação de agliconas e glicosídeos flavonoídicos, presentes em *C. lineatifolia*, tendo em vista que os problemas de adsorção irreversível e rastro (encontrados com os adsorventes comumente usados) estão ausentes, além de ser possível a recuperação quantitativa de amostras (MARSTON & HOSTETTMANN, 1994).

Os objetivos deste capítulo foram descrever o isolamento e caracterização das substâncias majoritárias do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*, utilizando-se métodos cromatográficos, como cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC); CLAE; CLUE; CCD e métodos espectroscópicos (UV-VIS, RMN, Espectrometria de Massas - EM).

## 5.2 Materiais e métodos

Os estudos de isolamento e purificação em HSCCC foram realizados sob supervisão do Prof. Dr. Fabio Boylan, *Trinity College Dublin*, Irlanda, no *Trinity Biomedical Science Institute*.

### 5.2.1 Material vegetal e obtenção do extrato bruto

A coleta das folhas de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. foi realizada em fevereiro de 2017, em um remanescente de mata, no campus da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG (GPS 19° 52' 9.87'' S; 43° 58' 12.04'' W). O material vegetal foi identificado pelo Dr. Marcos Sobral e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número BHCB 150606. O registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi realizado e tem o código A216C7C.

Após a coleta, as folhas de *C. lineatifolia* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar e temperatura de 40 °C, por 72 horas. Em seguida, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas. Porções do material vegetal seco e pulverizado (droga vegetal) foram submetidas aos métodos extrativos por maceração em banho de ultrassom (EtOH US, item 3.2.2.1) e sob refluxo (EtOH R, item 3.2.2.2) e analisadas posteriormente.

### 5.2.2 Fracionamento do extrato bruto por sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água

4,0 g do extrato EtOH R foram solubilizados com auxílio de banho de ultrassom (Bransonic® Ultrasonic Cleaner 3510E-DTH), durante 5 minutos, em 50 mL da mistura de solventes (Fisher Scientific®) Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água (HAMAg), na proporção de 1:1:1:1, v/v. Em seguida, as duas fases obtidas, fase orgânica ou superior (FS) e fase aquosa ou inferior (FI), foram separadas, secas em rotaevaporador (IKA® RV 10, banho de aquecimento HB digital e bomba Fischer Scientific®) em temperatura de 50 °C, pressão de 100 mBar e analisadas posteriormente em CCD e CLAE.

### 5.2.3 Extração por infusão e partição líquido-líquido

Dois litros de água ultrapura fervente foram vertidos em 250g da droga vegetal, e a solução submetida a banho de ultrassom, durante 20 minutos, para solubilização. Em seguida, foram realizadas duas filtrações consecutivas, utilizando-se algodão e papel de filtro, respectivamente, obtendo-se um volume final de 1 litro do chá, o qual foi submetido a uma partição líquido-líquido, utilizando-se o solvente acetato de etila. Nesta última extração, 100 mL de acetato de etila foram adicionados aos 1000 mL do chá num funil de separação e suas respectivas frações, acetato de etila e aquosa, coletadas separadamente. Esta etapa foi repetida 9 vezes, totalizando um volume de 1000 mL de acetato de etila. Posteriormente, a fração acetato de etila foi seca em rotaevaporador (IKA® RV 10, banho de aquecimento HB digital e bomba Fischer Scientific®) em temperatura de 50°C, pressão de 100 mBar e analisada posteriormente em CCD e HSCCC.

### 5.2.4 Cromatografia em camada delgada

O extrato etanólico otimizado EtOH R, suas frações polares e apolares obtidas a partir do sistema bifásico HAMAg, as frações resultantes da HSCCC e cromatografia por exclusão molecular, o chá e sua fração acetato de etila, foram submetidas à CCD utilizando-se placas de alumínio 20x20 (Sigma-Aldrich), eluídas em câmara de fluxo laminar vertical fechada. Após a eluição, aguardou-se a evaporação total dos solventes e as placas foram visualizadas em luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Em seguida, as placas foram reveladas com reagente fluorogênico, ácido sulfúrico a 10% e aquecidas a 200°C para visualização das bandas. Os estudos para triagem de fenólicos e terpenos foram realizados segundo método proposto por Wagner e Bladt (2001).

A escolha do sistema de eluição (fase móvel) para as placas de CCD foi previamente avaliada, utilizando-se diferentes misturas de solventes: (i) Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v); (ii) Acetato de etila: Piridina: Água: Metanol (80:20:10:5, v/v); (iii) Tolueno: Piridina: Ácido fórmico (36:9:5, v/v); (iv) Clorofórmio: Metanol: Água (65:35:10, v/v); (v) Butanol: Ácido acético: Água (3:1:1, v/v); (vi) Clorofórmio: Ácido acético: Água (30:15:2, v/v) e (vii) Metanol: Ácido acético: Água (18:1:1, v/v). Adicionalmente, também foram testados sistemas mais apolares: (a) Hexano: Etanol (1:1, v/v), (b) Acetato de

etila e (c) Clorofórmio: Metanol: Água (9:1:1, v/v). Nesta análise preliminar, 5,0 mg do extrato EtOH R foram solubilizados em metanol e plotados ponto-a-ponto em placas de CCD.

#### 5.2.5 Cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC)

O equipamento de HSCCC utilizado foi o Quattro HT-Prep (AECS-Bridgend, United Kingdom) equipado com duas bobinas contendo dois espirais em multicamadas de politetrafluoroetileno, acoplados a uma bomba ECP2000 (ECOM) e um degaseificador Waters In-line Degasser AF. Para a análise, utilizou-se o sistema de solventes HAMAg, em eluição isocrática, em fase normal (cauda-cabeça). As amostras submetidas à separação por HSCCC foram: fração apolar e polar (obtidas a partir do extrato EtOH R) e fração acetato de etila obtida do chá.

Para a separação da fração apolar (FS), preparou-se 1000 mL do sistema bifásico, utilizando-se o sistema de solventes HAMAg 4:1:4:1, v/v, em um funil de separação. Agitou-se e aguardou-se a separação das duas fases. As fases foram recolhidas em frascos individuais e degaseificados em banho de ultrassom (Branson<sup>®</sup> Ultrasonic Cleaner 3510E-DTH), durante 5 minutos. A fase inferior obtida do preparo dos solventes foi utilizada como fase estacionária e a fase superior, utilizada como fase móvel, na HSCCC.

A coluna da HSCCC (136 mL) foi preenchida primeiramente com a fase estacionária, totalizando um volume de 150 mL, em um fluxo de 7,0 mL/min. Em seguida, a rotação foi ligada e, após 5 minutos, ao atingir uma rotação de 865 rpm, a fase móvel foi bombeada, sob fluxo de 2,0 mL/min, até que fosse observado o equilíbrio entre as fases do sistema, *i.e.*, mesmo volume de fase estacionária e móvel coletado.

Para o preparo da amostra a ser injetada, 1,0 g da fração apolar (FS) foi solubilizada em 24 mL de solventes HAMAg 4:1:4:1, v/v e a fase superior obtida injetada ao sistema, depois de atingido o estado de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária ( $V_{\text{estacionária}} = 136 \text{ mL}$ ,  $V_{\text{móvel}} = 25 \text{ mL}$  e Eficiência de retenção = 81,6%), sob fluxo de 2,0 mL/min. Foram coletados manualmente um total de 80 tubos, contendo 4mL/cada. As primeiras 50 frações foram coletados sob rotação (sem extrusão) do sistema e fluxo contendo a fase móvel. As últimas 30 frações foram coletadas com a rotação do sistema desligada e sob fluxo contendo a fase

estacionária. As 80 frações coletadas foram posteriormente analisados em CCD e agrupadas conforme similaridade de seus tempos de retenção e padrão de eluição. O tempo de separação foi de 160 min.

Para a separação da fração polar (FI), foi preparado 1000 mL do sistema bifásico, utilizando-se o sistema de solventes HAMAg 1:4:1:4, v/v, em um funil de separação. Da mesma forma, 1,0 g da FS foi solubilizada em 24 mL de solventes HAMAg 1:4:1:4, v/v e a fase superior obtida injetada ao sistema, depois de atingido o estado de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária ( $V_{\text{estacionária}} = 136 \text{ mL}$ ,  $V_{\text{móvel}} = 25 \text{ mL}$  e Eficiência de retenção = 81,6%), sob fluxo de 2,0 mL/min. As fases subsequentes foram realizadas de maneira idêntica ao descrito anteriormente para a FS.

Para a separação da fração acetato de etila obtida a partir da partição líquido-líquido do chá da droga vegetal, todas as etapas foram executadas identicamente àquela da separação da fração polar (FI).

#### *5.2.6 Otimização da Cromatografia em contracorrente de alta velocidade (HSCCC) para a fração polar*

As separações por HSCCC em condições otimizadas foram realizadas segundo metodologia adaptada de Kamto *et al.* (2017).

Os sistemas de solventes utilizados foram, nessa ordem: (i) Hexano-Etanol-Água (4:2:2), em fase reversa cabeça-cauda e sistema de eluição isocrático; (ii) Acetato de etila-Água (1:1), em fase reversa cabeça-cauda e sistema de eluição isocrático, e (iii) Acetato de etila- *n*-Butanol-Água (sistema gradiente, com diferentes concentrações) em fase normal cauda-cabeça. Cada mistura de solvente foi completamente equilibrada em um funil de separação, à temperatura ambiente. As duas fases resultantes foram separadas pouco antes do uso e degaseificadas por sonicação por 15 minutos. Em cada operação de separação, a coluna da bobina foi totalmente preenchida com a fase estacionária do sistema de solvente selecionado. A rotação da coluna foi ligada e, após alcançar o equilíbrio hidrodinâmico, a fase móvel foi bombeada para a coluna, na taxa de fluxo apropriada. As frações foram coletadas, analisadas por CCD e agrupadas de acordo com suas similaridades.

A massa de 1,9323 g da fração polar (FI), obtida conforme descrito no item 5.2.2, foi solubilizada em 8,0 mL de ambas as fases móvel e estacionária do sistema de solventes Hexano-Etanol-Água (4:2:2) e, em seguida, injetada na coluna (previamente equilibrada com as fases estacionária e móvel da mistura de solventes, com  $V_{\text{estacionária}} = 136$  mL,  $V_{\text{móvel}} = 34$  mL e Eficiência de retenção = 75%). A fase orgânica foi usada como fase estacionária, enquanto a fase aquosa foi usada como fase móvel, em modo de eluição cabeça-cauda (fase reversa), em um fluxo de 4mL/min. As 30 frações coletadas (12 mL/cada) foram submetidas a CCD e agrupadas conforme similaridade, obtendo-se as frações A (0,4 mg, 21 min), B (1,481 g, 33 min), C (25,2 mg, 45 min), D (8,9 mg, 57 min) e E (8,6 mg, 90 min). O tempo de separação foi de 90 minutos. A fração B foi submetida à nova separação (descrita a seguir) em sistema de eluição isocrático e as frações C e D foram plotadas em CCD preparativa.

A fração B (1,481 g) foi solubilizada em 8,0 mL de ambas as fases móvel e estacionária do sistema de solventes Acetato de etila-Água (1:1) e, em seguida, injetada na coluna (previamente equilibrada com as fases estacionária e móvel da mistura de solventes, com  $V_{\text{estacionária}} = 136$  mL,  $V_{\text{móvel}} = 40$  mL e Eficiência de retenção = 70,6%). A fase orgânica foi usada como fase estacionária, enquanto a fase aquosa foi usada como fase móvel, em modo de eluição cabeça-cauda (fase reversa), em um fluxo de 4mL/min. As 20 frações coletadas (12 mL/cada) foram submetidas a CCD e agrupadas conforme similaridade, obtendo-se as frações B1 (975,4 mg, 36 min), B2 (79,5 mg, 42 min) e B3 (35,1 mg, 60 min). O tempo de separação foi de 60 minutos. A fração B1 foi submetida à nova separação (descrita a seguir) em sistema de eluição em gradiente e as frações B2 e B3 foram purificadas em coluna de Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich).

A fração B1 (975,4 mg) foi solubilizada em 8,0 mL de ambas as fases móvel e estacionária do sistema de solventes Acetato de etila- *n*-Butanol-Água (9,5:0,5:10) e, em seguida, injetada na coluna (previamente equilibrada com as fases estacionária e móvel da mistura de solventes, com  $V_{\text{estacionária}} = 136$  mL,  $V_{\text{móvel}} = 40$  mL e Eficiência de retenção = 70,6%). A fase aquosa foi usada como fase estacionária, enquanto a fase orgânica foi usada como fase móvel, em modo de eluição cauda-cabeça (fase normal), em um fluxo de 2mL/min. A cada 10 frações coletadas (4 mL/cada), a bomba foi parada e a fase móvel modificada, em sistema de eluição gradiente em mais 9 etapas, nas seguintes proporções: Acetato de etila- *n*-Butanol-Água (9:1:10); (8,5:1,5:10); (8:2:10); (7,5:2,5:10); (7:3:10); (6,5:3,5:10); (6:4:10); (5,5:4,5:10) e (5:5:10).

Após tempo de separação de 200 minutos, as 100 frações obtidas foram submetidas a CCD e agrupadas conforme similaridade, obtendo-se as frações B1a (0,7 mg, 18 min), B1b (1,0 mg, 56 min), B1c (5,2 mg, 64 min), B1d (8,8 mg, 68 min), B1e (130,7 mg, 76 min), B1f (10,9 mg, 80 min), B1g (10,5 mg, 104 min), B1h (11,8 mg, 128 min) e B1i (84,1 mg, 200 min). As frações B1f, B1g, B1h e B1i foram plotadas em CCD preparativa.

#### *5.2.7 Cromatografia por exclusão molecular*

Uma coluna QUICKfit 24/29 de 500mL, preenchida por Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich), eluída com metanol (Fisher Scientific) numa velocidade média de 0,5mL/min, foi utilizada para a completa purificação de amostras selecionadas que foram obtidas por HSCCC. Cada fração foi submetida a uma passagem pela coluna de Sephadex LH-20 e, para cada análise por exclusão molecular, foram coletados 50 tubos contendo, aproximadamente, 10mL/cada, os quais foram posteriormente evaporados e analisados por CCD.

#### *5.2.8 Cromatografia em camada delgada preparativa*

Para a realização da CCD em camada preparativa, foram utilizadas placas de sílica gel 50 de 20x20cm (UNIPLATE, Analtech). Para eluição das placas preparativas, foram utilizados os sistemas de solventes Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v) para as frações polares e Clorofórmio: Metanol: Água (9:1:1, v/v) para as frações apolares.

As placas foram eluídas numa câmara de fluxo laminar vertical fechada e visualizadas à luz UV ( $\lambda$  254 e 365 nm), para demarcação e raspagem da sílica das bandas de eluição. Cada banda de interesse obtida pela raspagem sílica da placa de CCD foi agitada em metanol (para as amostras polares) ou clorofórmio (para as amostras apolares) por 1h para solubilização da substância, em seguida filtrada em papel de filtro circular de 55 mm (Whatman), seca em rotaevaporador (IKA® RV 10, banho de aquecimento HB digital e bomba Fischer Scientific®) em temperatura de 50°C, pressão de 100 mBar e analisada por CCD.

### 5.2.9 Análises por CLAE do extrato bruto e frações polar e apolar do sistema HAMAg

As análises por CLAE foram realizadas em equipamento Waters® 2695 acoplado a um detector duplo de absorvância  $\lambda$  2487 e software Waters 717 plus. A coluna utilizada foi uma Kromasil® 100-5-C18 (4,6mm de diâmetro interno, 250mm de comprimento e tamanho de partícula 5 $\mu$ m). A taxa de fluxo foi de 1 mL/min e volume de injeção de 10 $\mu$ L. Os solventes utilizados como fase móvel foram 0,25% de ácido ortofosfórico em água ultrapura (solvente A) e metanol grau CLAE (solvente B), num sistema gradiente de: 40% B por 5 minutos, 55% B de 5 a 10 minutos, 65% B de 10 a 15 minutos, 50% B de 15 a 20 minutos, 40% B de 20 a 25 min e 30% B de 25 a 30 minutos. A detecção foi realizada usando comprimentos de onda de 254nm, 280nm e 335 nm. A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema de tratamento de água deionizada da PureLab Option e o metanol grau CLAE obtido da Sigma-Aldrich®.

Para as análises qualitativas, 5,0 mg do extrato e frações foram solubilizados em 1 mL de metanol grau CLAE, obtendo-se uma solução de concentração final de 5mg/mL.

Para as análises quantitativas, foram preparadas soluções com concentrações decrescentes das substâncias puras isoladas e do extrato: 5mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL; 0,3125 mg/mL; 0,15625 mg/mL e 0,078125 mg/mL.

### 5.2.10 Análise por RNM das substâncias isoladas

10,0 mg das substâncias polares puras isoladas foram solubilizadas individualmente em 0,75 mL de dimetilsulfóxido-deuterado (DMSO-D<sub>6</sub>) e transferidas para tubos de análise para RMN 5mm (Fisher®). A ressonância magnética nuclear para elucidação da estrutura química das substâncias isoladas foi realizada utilizando-se um equipamento Agilent Technologies 400 NMR. Os espectros do hidrogênio e do carbono foram registrados em um sistema de espectrometria de NMR BRUKER TOPSPIN 2.1 (1H-NMR: 400 e 600MHz e 13C-NMR: 125MHz) usando o padrão Bruker de sequência de pulso. Medidas bidimensionais (H-H COSY, HMBC, HMQC) foram obtidas no mesmo instrumento com as sequências de pulso usuais. Os picos foram visualizados a partir de software ACD/NMR Processor Academic Edition. Todos os espectros foram medidos a 25°C, em DMSO-D<sub>6</sub> utilizando Tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

A mesma análise foi realizada para as substâncias apolares puras isoladas, mas essas foram solubilizadas em clorofórmio-deuterado ( $\text{CHCl}_3\text{-D}$ ) e seus espectros obtidos por RMN na mesma solução.

#### 5.2.11 Análise por CLAE-ESI-Q-TOF-EM

O equipamento CLAE-ESI-Q-TOF-EM da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA) foi utilizado para a análise da composição e as medições de massas precisas. Este equipamento é composto por um cromatógrafo CLAE (Série 1200) equipado com uma bomba binária (G1312C), um degaseificador (G1322A), um amostrador automático (G1329B), um detector de matriz de fotodiodo - DAD (G1315D) e um espectrômetro de massa (G6530B). Antes da análise, cada extrato foi dissolvido em metanol a 50% até a concentração de 10 mg / mL e filtrado em um filtro de seringa de náilon (0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro) para os frascos do amostrador automático. As seguintes condições de cromatografia de CLAE foram utilizadas: volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , a temperatura do termostato de 25  $^{\circ}\text{C}$ , a taxa de fluxo de 0,2 mL / min, os comprimentos de onda de detecção de UV de 210, 254, 280, 320 e 365 nm, a operação do detector de UV com intervalo de comprimento de onda de 190–600 nm. O sistema de solventes foi composto por acetonitrila acidificada em 0,1% de ácido fórmico (solvente B) e em 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A). Foi aplicado o seguinte gradiente de eluição: 0 min: 1% de B; 2 min: 10% de B; 6 min: 40% de B; 35-36 min: 95% de B, 37 min: 1% de B. O tempo de execução foi estabelecido em 45 min. A coluna cromatográfica Agilent Technologies Zorbax Eclipse Plus RP-18 (150 mm x 2,1 mm;  $\text{dp} = 3,5 \mu\text{m}$ ) (Santa Clara, CA, EUA) foi usada para a separação dos analitos.

As configurações do espectrômetro de massa (voltagem capilar, temperatura do gás, voltagem de fragmentação e energia de colisão) foram primeiro otimizadas para fornecer a resposta mais alta possível. Como resultado, as seguintes configurações foram selecionadas: a tensão capilar de 3500 V, as temperaturas do gás e do gás da bainha de 350 e 325  $^{\circ}\text{C}$ , o fluxo de gás de 12 L/min, a tensão do fragmentador de 120 V, as energias de colisão: 10 e 20 V, a voltagem do skimmer de 65 V e a pressão do nebulizador de 35 psig. Os espectros foram registrados dentro do intervalo  $m/z$  de 50–1200 Da em ambos os modos de ionização negativo e positivo. Para dois dos picos mais intensos, os espectros de EM-EM foram adquiridos automaticamente. No entanto, após a coleta de 2 espectros, os picos dados foram excluídos durante os 0,2 min

seguintes da fragmentação para obter mais dados de EM-EM para os sinais menos intensos. O software Agilent MassHunter Workstation (versão B.08.00) foi usado para adquirir os espectros e analisar os dados.

A identificação dos componentes dos extratos/frações foi realizada graças à análise de seus padrões de fragmentação, medição de massa de alta resolução, dados de literatura e bancos de dados abertos (Metlin e MassBank).

#### *5.2.12 Ensaios de injeção e coinjeção com padrões*

Os padrões de catequina, quercitrina e isoquercitrina (Sigma Aldrich, 98% pureza) foram injetados individualmente por CLUE-UV/DAD, preparadas em soluções em metanol grau CLAE, na concentração de 1mg/mL, conforme descrito a seguir. Pesou-se 1,0 mg dos padrões em microtubos plásticos e adicionou-se 1,0 mL de metanol grau CLAE. A dissolução foi realizada com o auxílio de um banho ultrassônico por 20 minutos. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 10.000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para *vials* de 2 mL. Os perfis cromatográficos obtidos dos padrões foram comparados ao do extrato EtOH R, em função dos seus espectros UV e respectivos tempos de retenção.

Após a análise inicial com as SQR, procederam-se aos experimentos de coinjeção por CLUE-UV/DAD. Foi analisada solução do extrato EtOH R, na concentração de 5 mg/mL (preparada conforme descrito no item 3.2.4) fortificada com 100  $\mu$ L de solução padrão de quercitrina (0,5 mg/mL).

Para a análise cromatográfica destes ensaios, empregaram-se as condições cromatográficas descritas para a condição C (Tabela 6, item 4.2.1). O volume de injeção foi de 2  $\mu$ L e o extrato foi solubilizado em metanol grau CLAE.

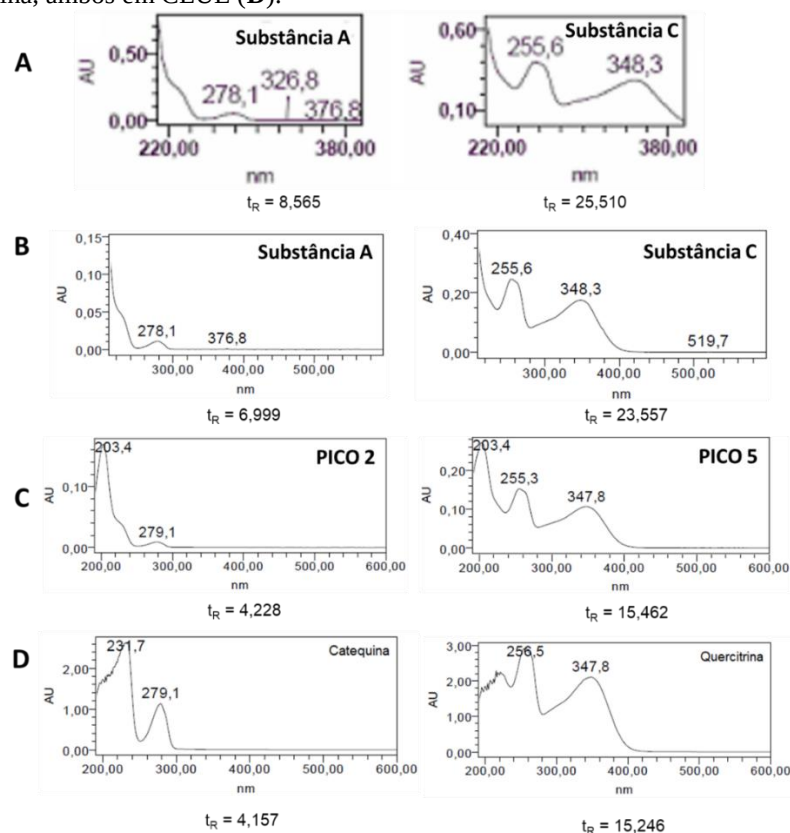
### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 Identificação dos marcadores selecionados do extrato etanólico por meio de análises cromatográficas, espectroscópicas e ensaios de injeção e coinjeção com padrões

Conforme demonstrado anteriormente, os perfis espectrais em UV das substâncias majoritárias do extrato de folhas de *C. lineatifolia* sugerem a presença de flavonoides e outros componentes fenólicos. Não obstante, os resultados obtidos por Barbosa *et al.* (2009) confirmaram a presença de catequina e quercitrina.

Objetivando-se a correlação das substâncias majoritárias identificadas por CLUE (1 a 5) com aquelas selecionadas previamente por CLAE (A, B e C) e os espectros obtidos por Barbosa (2009) para os extratos etanólicos, os seus respectivos espectros UV obtidos foram comparados. A partir da análise dos espectros, obteve-se a correlação das substâncias A e C, com os picos 2 e 5 e as substâncias identificadas por Barbosa (2009), catequina (A) e quercitrina (C), respectivamente. Além disso, foram injetados os padrões autênticos de catequina e quercitrina, e seus respectivos tempos de retenção e espectros de absorção UV/VIS foram comparados, conforme pode ser verificado na **Figura 21**.

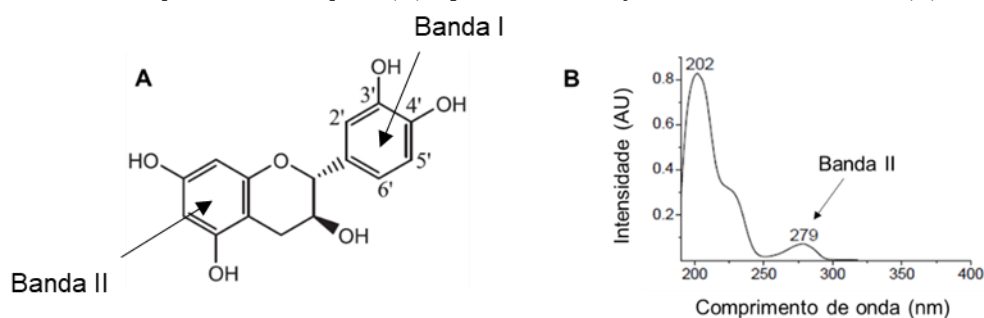
**FIGURA 21** – Espectros no UV comparados do extrato etanólico obtido por Barbosa (2009) (A), extratos etanólicos obtidos por maceração auxiliada por ultrassom (US) e por sistema contínuo de refluxo (R) de *Campomanesia lineatifolia*, em CLAE (B) e CLUE (C) (270 nm), respectivamente e padrões autênticos de catequina e quercitrina, ambos em CLUE (D).



Legenda: UV = ultravioleta; AU = absorvância, CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência, CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência; EtOH = etanol. Condições cromatográficas em materiais e métodos, item 3.2.3 e 4.2.1 (Tabela 6, condição C).

A catequina, monômero de tanino condensado (flavan-3-ol, **FIGURA 22A**), apresenta principalmente uma absorção máxima no UV em comprimento de onda entre 270-290 nm (**FIGURA 22B**), tendo em vista os grupos hidroxila em C3' e C4' conjugados com o sistema aromático (VIHAKAS, 2014). Diante do exposto, pode-se concluir que a substância A / pico 2, obtidos por CLAE e CLUE, respectivamente, correspondem à catequina.

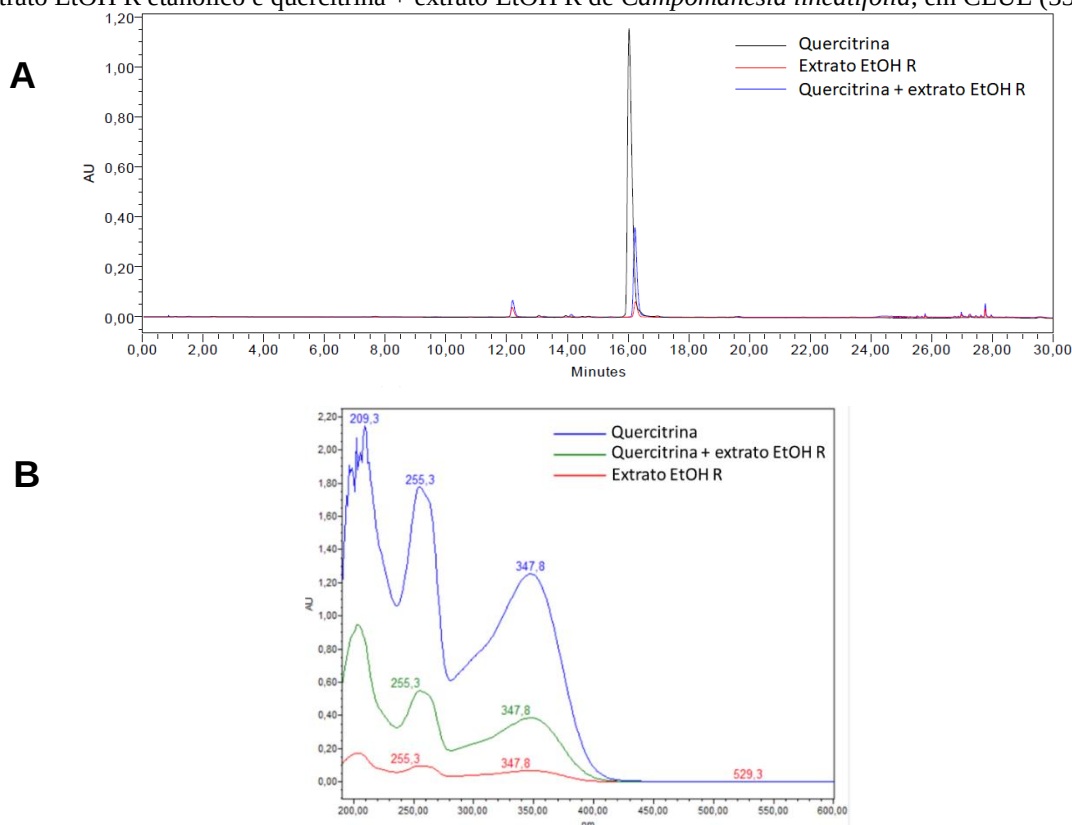
**FIGURA 22** – Estrutura química da catequina (A) e padrão de absorção no ultravioleta-visível (B).



Fonte: Adaptado de Vihakas, 2014, p. 11.

Ainda para a identificação da quercitrina, ensaio de coinjeção do padrão quercitrina, extrato EtOH R e quercitrina+EtOH R também foi realizado, demonstrando sobreposição tanto dos picos no cromatograma, quanto nos espectros UV (**FIGURA 23**).

**FIGURA 23** – Sobreposição dos cromatogramas (**A**) e espectros no UV (**B**) do padrão autêntico de quercitrina, extrato EtOH R etanólico e quercitrina + extrato EtOH R de *Campomanesia lineatifolia*, em CLUE (335 nm).



Legenda: UV = ultravioleta; AU = absorbância; CLUE = cromatografia líquida de ultra eficiência; EtOH = etanol; R = extração obtida por sistema contínuo de refluxo. Condição cromatográfica em materiais e métodos, 4.2.1 (Tabela 6, condição K).

A quercitrina (quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnosídeo), um flavonol, apresenta absorção da Banda I característica no UV/VIS próxima de 350 nm, tendo em vista o padrão de substituição no grupo 3-hidroxil no anel C (O-glicosilação), o que aumenta a densidade eletrônica do cromóforo cinamoíla. A absorção da Banda II de flavonóis usualmente ocorre na região de 240-280 nm, relacionada à hidroxilação do anel A (posições 5 e 7), que produz um notável deslocamento batocrômico do grupo cromóforo benzoíla, mas com efeito menor na Banda I (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Diante do exposto, pode-se concluir que a substância C / pico 5, obtidos por CLAE e CLUE, respectivamente, correspondem à quercitrina.

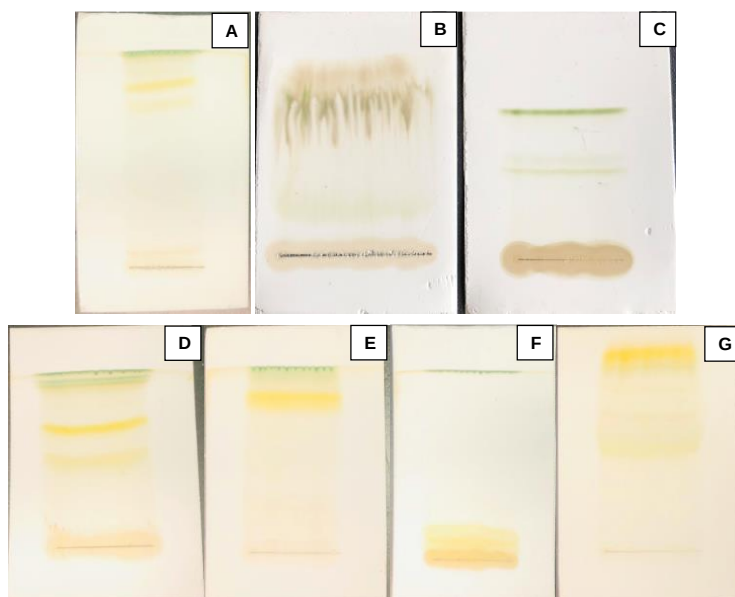
### 5.3.2 Isolamento, purificação e identificação das substâncias químicas do extrato EtOH R por meio de análises por CCD, HSCCC, CLAE, RMN e CLAE-ESI-Q-TOF-EM

Preliminarmente à execução da HSCCC, foi realizada a triagem fitoquímica do extrato EtOH R e também a avaliação de diferentes sistemas de solventes a fim de selecionar aquele que demonstrasse melhor eficiência na separação dos constituintes químicos presentes. Essa avaliação primária foi realizada em CCD, por ser uma técnica cromatográfica mais versátil, de baixo custo, de execução simples e com a possibilidade de se utilizarem diversos sistemas de solventes que permitem a otimização da separação dos constituintes químicos de interesse (SANTIAGO e STROBEL, 2013).

Para tanto, o extrato EtOH R foi solubilizado em metanol e plotado em placa de CCD. Como fase móvel, foram testadas as seguintes misturas de solventes, avaliando-se diferentes polaridades: (A) Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v); (B) Acetato de etila: Piridina: Água: Metanol (80:20:10:5, v/v); (C) Tolueno: Piridina: Ácido fórmico (36:9:5, v/v); (D) Clorofórmio: Metanol: Água (65:35:10, v/v); (E) Butanol: Ácido acético: Água (3:1:1, v/v); (F) Clorofórmio: Ácido acético: Água (30:15:2, v/v) e (G) Metanol: Ácido acético: Água (18:1:1, v/v). Tendo em vista que o extrato otimizado EtOH R de *C. lineatifolia* é um extrato enriquecido em fenólicos, dentre eles substâncias flavonoídicas, como a demonstração prévia (BARBOSA, 2009; MADALOSSO *et al.*, 2011) e de terpenos (OSORIO *et al.*, 2006), a escolha desses sistemas foi baseada na polaridade desses constituintes e seus respectivos perfis de eluição (WAGNER e BLADT, 2001).

Como pode ser observado na **Figura 24**, os **sistemas A e D** foram aqueles que demonstraram mais eficiência em separar os constituintes químicos presentes no extrato, considerando a resolução e separação das respectivas bandas em CCD, após revelação com reagente fluorogênico (ácido sulfúrico). É importante notar que, em A, tem-se um sistema de solventes mais polar e, em D, um sistema com característica mais apolar. O **sistema A** composto por Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v) é descrito por Wagner e Bladt (2001) como sendo adequado para um sistema de triagem para investigação de flavonoides glicosilados em CCD.

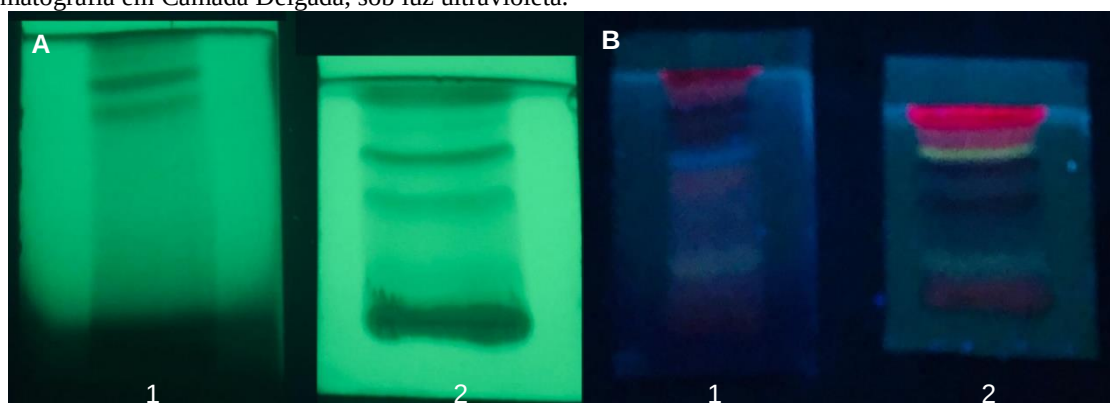
**FIGURA 24** – Análises preliminares em cromatografia em camada delgada, para o extrato etanólico otimizado de *C. lineatifolia*. A – G: diferentes misturas de solventes.



Legenda: (A) Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v); (B) Acetato de etila: Piridina: Água: Metanol (80:20:10:5, v/v); (C) Tolueno: Piridina: Ácido fórmico (36:9:5, v/v); (D) Clorofórmio: Metanol: Água (65:35:10, v/v); (E) Butanol: Ácido acético: Água (3:1:1, v/v); (F) Clorofórmio: Ácido acético: Água (30:15:2, v/v) e (G) Metanol: Ácido acético: Água (18:1:1, v/v). Revelação com ácido sulfúrico 10%.

Na visualização dos constituintes químicos em luz UV em  $\lambda 254$  nm, observou-se a presença de bandas escuras. Em 365 nm, foi detectada a presença de substâncias fluorescentes de coloração amarela, vermelha e azul (**FIGURA 25**).

**FIGURA 25** – Perfil dos constituintes químicos presentes no extrato etanólico otimizado de *C. lineatifolia* em Cromatografia em Camada Delgada, sob luz ultravioleta.



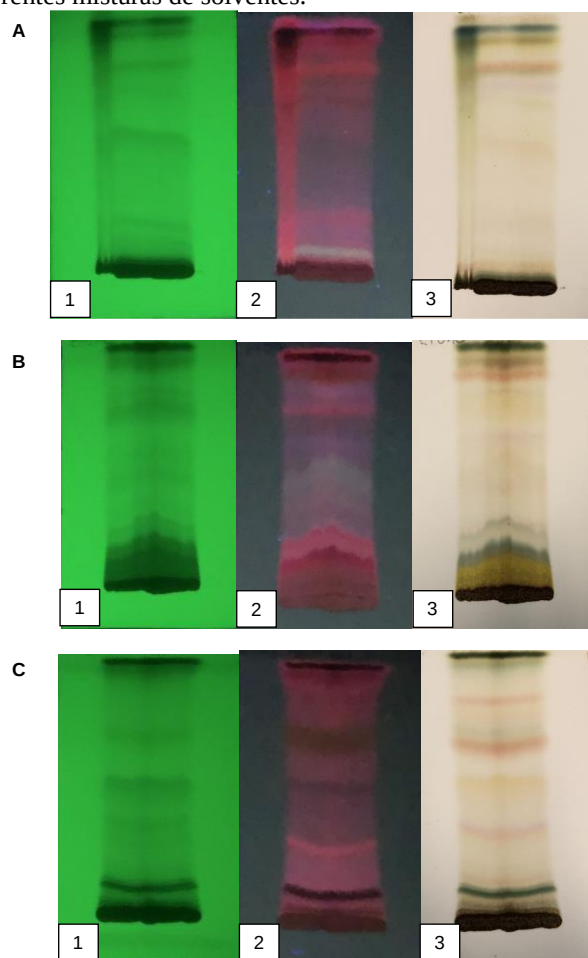
Legenda: (A) Bandas escuras em luz ultravioleta (UV)  $\lambda 254$  nm; (B) Bandas fluorescentes em luz UV  $\lambda 365$  nm. Fase móvel: 1A e 1B = Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v), 2A e 2B = Clorofórmio: Metanol: Água (65:35:10, v/v).

No comprimento de onda UV  $\lambda 254$  nm, todos os flavonoides apresentam fluorescência de extinção (fenômeno de *quenching*). Em UV  $\lambda 365$  nm, dependendo da característica estrutural, os flavonoides apresentam-se com fluorescência amarela escura, verde ou azul que é

intensificada e alterada pelo uso de reagentes reveladores. Flavonoides presentes em extratos geralmente contêm ácidos carboxílicos fenólicos, os quais formam zonas fluorescentes azuis (WAGNER e BLADT, 2001).

Adicionalmente, também foram avaliados sistemas mais apolares de solventes: (a) Hexano: Etanol (1:1, v/v), (b) Acetato de etila e (c) Clorofórmio: Metanol: Água (9:1:1, v/v), com o objetivo de se determinar uma fase móvel mais eficiente para análise em CCD dos constituintes químicos mais apolares presentes no extrato etanólico otimizado. A **Figura 26** mostra o perfil de eluição desses constituintes.

**FIGURA 26** – Análises preliminares em cromatografia em camada delgada, para o extrato etanólico otimizado de *C. lineatifolia*. A – C: diferentes misturas de solventes.



Legenda: Solventes (A) Hexano: Acetato de etila (1:1, v/v); (B) Acetato de etila e (C) Clorofórmio: Metanol: Água (9:1:1, v/v). 1A, 1B e 1C: luz UV  $\lambda$ 254nm; 2A, 2B e 2C: luz UV  $\lambda$ 365 nm; 3A, 3B e 3C: revelação após aplicação de ácido sulfúrico 10%.

Como pode ser observado na **Figura 26**, o **sistema C** (Clorofórmio: Metanol: Água 9:1:1, v/v) demonstrou-se mais eficiente na separação dos constituintes químicos presentes no extrato,

considerando a resolução e separação das respectivas bandas em CCD, melhor visualizada após revelação com reagente fluorogênico (ácido sulfúrico).

Em comprimento de onda UV-365 nm, é possível observar a presença de bandas fluorescentes de coloração amarela-escura, rosa, lilás e marrom. Quando se utiliza reagente de revelação contendo ácido sulfúrico, observa-se a formação de bandas de coloração rosa-violeta, o que pode caracterizar a presença de terpenos glicosilados. Ainda, a presença de bandas de coloração amarelada pode revelar a presença de chalconas e flavanonas glicosiladas (WAGNER e BLADT, 2001). Diversos autores descrevem a presença de chalconas e flavanonas (PAVAN *et al.*, 2009; PASCOAL *et al.*, 2014; LIMA E SILVA *et al.*, 2018), e também de terpenos (OSÓRIO *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2009) em espécies de *Campomanesia*.

Após a detecção da presença de flavonoides e terpenos na triagem fitoquímica preliminar do extrato, a etapa seguinte foi a realização da HSCCC. Nesse método cromatográfico de contracorrente (CCC), o requisito básico para um adequado sistema de solvente é que este seja composto por duas fases imiscíveis, ou seja, um sistema de solvente bifásico. A boa separação de um analito depende da sua distribuição relativa entre as fases móvel e estacionária do sistema cromatográfico. Em linhas gerais, se uma substância é mais solúvel na fase móvel selecionada para a CCC, ela eluirá mais rapidamente na coluna, apresentando-se como uma banda larga e de baixa resolução no cromatograma; enquanto se for igualmente distribuída em ambas as fases do sistema bifásico, a eluição acontecerá em volume adequado e a retenção da fase estacionária será satisfatória, permitindo uma boa resolução e separação dos analitos (PENG *et al.*, 2005; FRIESEN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015).

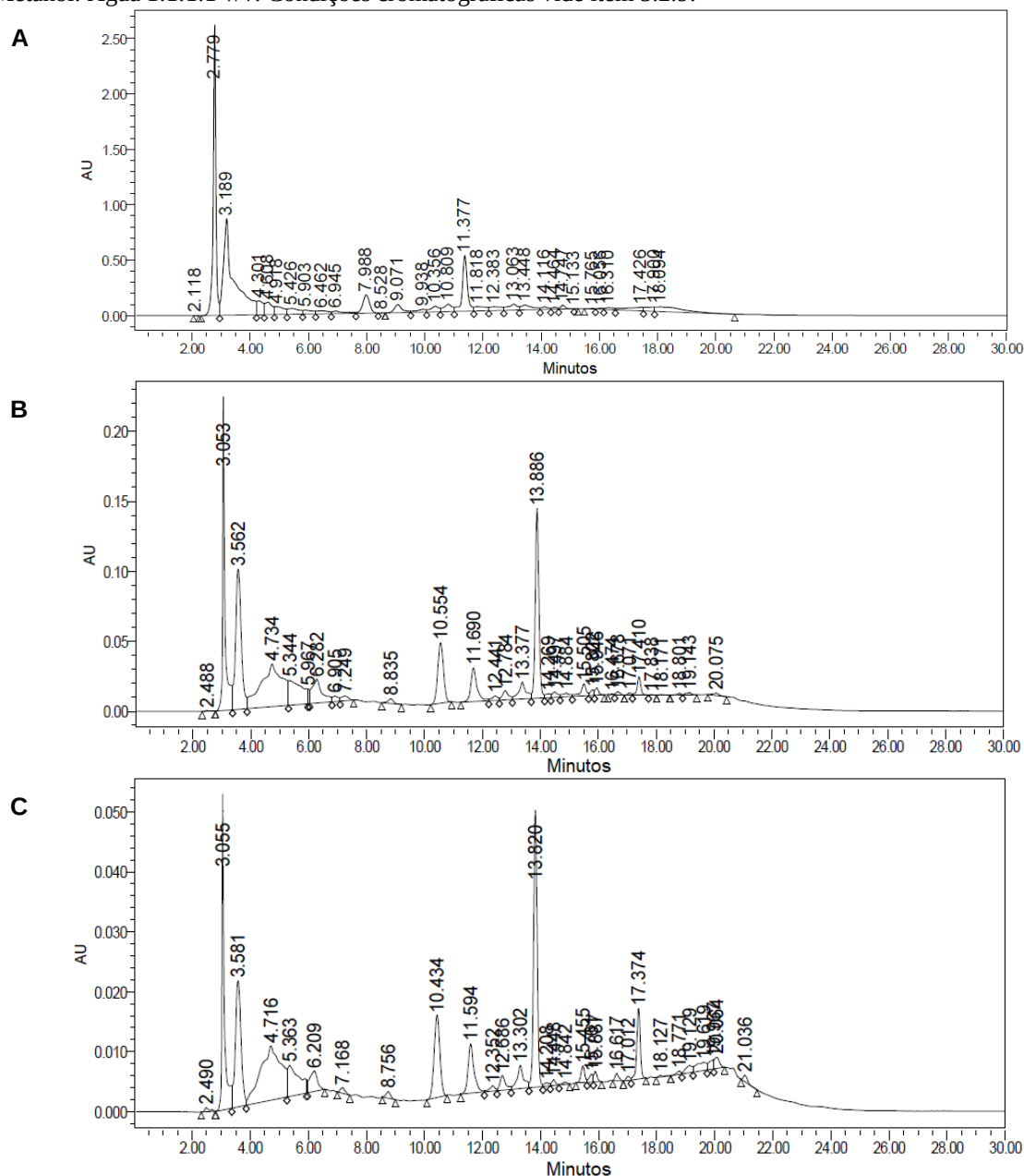
Os sistemas de solventes mais comuns para separação de produtos naturais são aqueles constituídos por hexano, acetato de etila, metanol e água (HAMAg; do inglês, *HEMWat* – *Hexane, Ethyl acetate, Methanol, Water*). Esse sistema de solventes contém dois solventes com polaridades extremamente diferentes, o hexano e a água, com acetato de etila como modificador lipofílico e o metanol como modificador hidrofílico (FRIESEN *et al.*, 2015). Uma revisão conduzida por Costa e Leitão (2010) descreve o sistema de solventes HAMAg como o mais frequentemente utilizado para o isolamento de flavonoides livres em extratos vegetais. Em outro estudo, as mesmas autoras descrevem detalhadamente o comportamento dos flavonoides em diferentes sistemas de solventes e citam o sistema bifásico HAMAg como um sistema

versátil por oferecer uma ampla gama de polaridades, modificando-se apenas a proporção do volume dos quatro solventes (COSTA e LEITÃO, 2011). Yang, Wu e Wu (2016) demonstraram a importância do sistema de solventes HAMAg utilizado sistematicamente para extração seletiva de flavonoides, separados posteriormente por CCC. Esse mesmo sistema de solventes também foi descrito em outros estudos para o isolamento de terpenoides em HSCCC de extratos vegetais (PENG *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2010).

Com base no exposto, foi adotada uma estratégia semiempírica para a seleção do sistema de solventes (LIU *et al.*, 2015). Essa estratégia baseia-se no método G.U.E.S.S. (*Generally Useful Estimate of Solvent Systems*) proposto por Friesen e Pauli (2005), que envolve a utilização do perfil de mobilidade observado na CCD como um indicador de seletividade para separação em CCC, fornecendo um meio conveniente de estimar o valor de *K* (coeficiente de distribuição de uma substância nas fases móvel e estacionária) em um sistema de solvente.

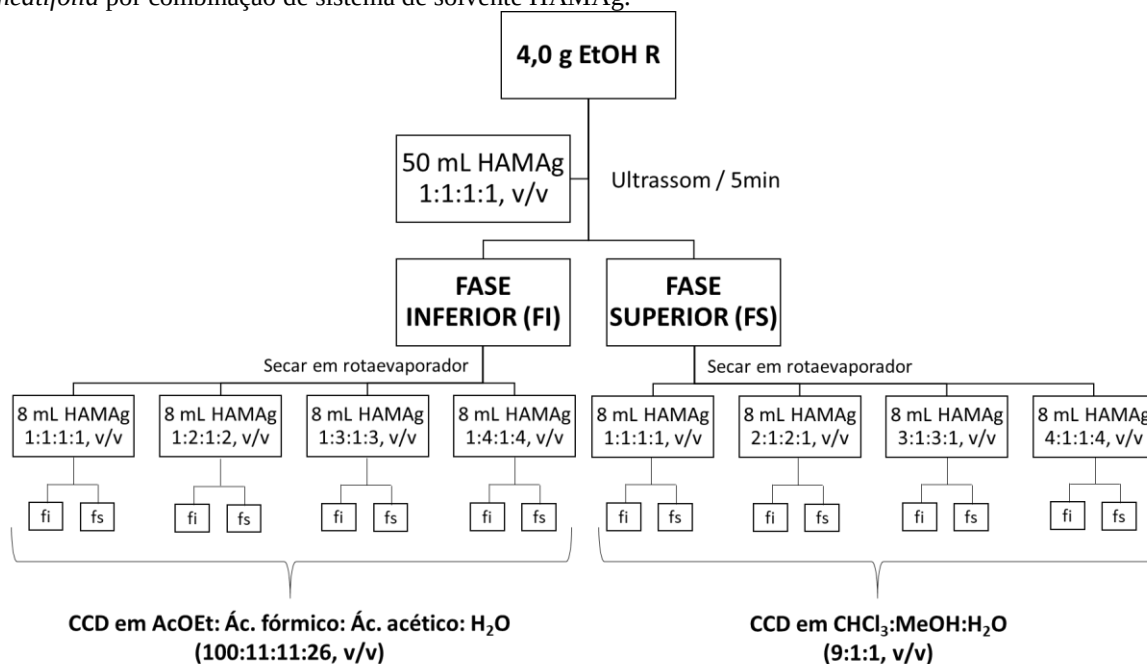
Dessa forma, o extrato EtOH R foi então solubilizado em uma mistura de solventes contendo HAMAg, na proporção de 1:1:1:1 v/v, obtendo-se uma solução de duas fases: fase inferior (FI) ou fração polar e fase superior (FS) ou fração apolar. Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE de ambas as fases e do extrato EtOH R são mostrados na **Figura 27**.

**FIGURA 27** – Perfil cromatográfico por CLAE (280 nm) para o extrato etanólico otimizado de *Campomanesia lineatifolia* (A) e suas frações polar (B) e apolar (C), obtidas por sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água 1:1:1:1 v/v. Condições cromatográficas vide item 5.2.9.



Pequenas porções da FI e FS foram, respectivamente, solubilizadas em diferentes misturas de solventes HAMAg, nas proporções 1:1:1:1; 1:2:1:2; 1:3:1:3 e 1:4:1:4 e 1:1:1:1; 2:1:2:1; 3:1:3:1 e 4:1:4:1, v/v, obtendo-se novamente uma solução de duas fases: fase superior (fs) ou orgânica e fase inferior (fi) ou aquosa, as quais foram aplicadas ponto-a-ponto em placa de CCD. A fase móvel utilizada para a corrida da FS foi o sistema polar de solventes A (Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água, 100:11:11:26, v/v) e para a FS, o sistema apolar de solventes (Clorofórmio: Metanol: Água, 9:1:1, v/v), selecionados previamente (**FIGURA 28**).

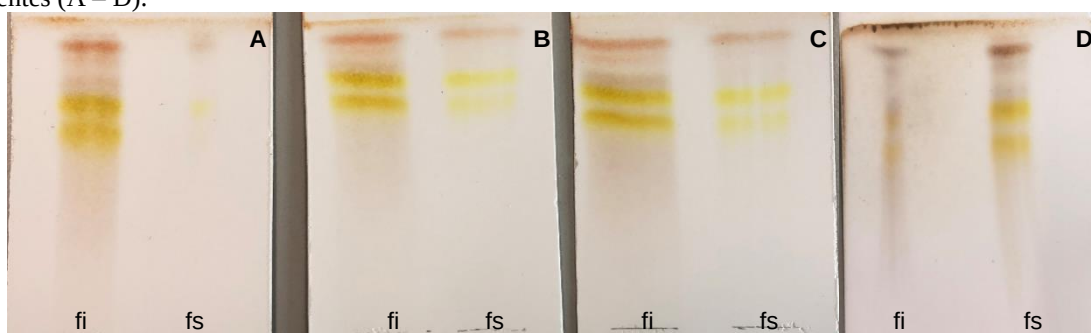
**FIGURA 28** – Protocolo de fracionamento seletivo para o extrato etanólico otimizado de *Campomanesia lineatifolia* por combinação de sistema de solvente HAMAg.



Legenda: EtOH R = extrato etanólico obtido em sistema contínuo de refluxo; HAMAg = hexano:acetato de etila:metanol:água; FS/fs = fase superior; FI/fi = fase inferior; CCD = cromatografia em camada delgada; AcOEt = acetato de etila; CHCl<sub>3</sub> = clorofórmio; MeOH = metanol; H<sub>2</sub>O = água.

Como pode ser demonstrado na **Figura 29**, a mistura HAMAg na proporção 1:4:1:4 v/v foi a que resultou em melhor separação dos constituintes químicos em ambas as fases do sistema de solventes, sendo selecionado como sistema bifásico para a realização da HSCCC da FI (fração polar do extrato EtOH R).

**FIGURA 29** – Perfil das substâncias químicas presentes na fração polar obtida a partir do extrato etanólico otimizado de *C. lineatifolia* em Cromatografia em Camada Delgada, solubilizado em diferentes misturas de solventes (A – D).

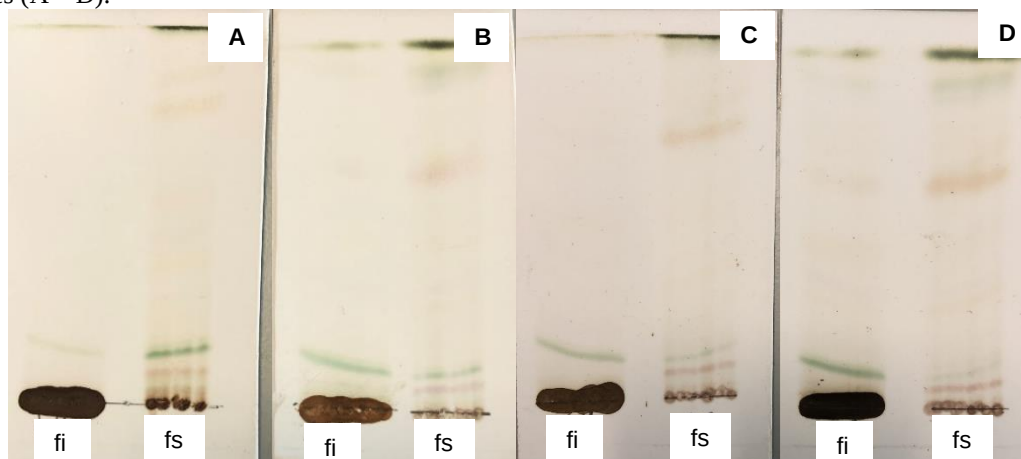


Legenda: Solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água, nas proporções v/v (A) 1:1:1:1; (B) 1:2:1:2; (C) 1:3:1:3 e (D) 1:4:1:4. Fase móvel: Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água, 100:11:11:26, v/v. fi = fase inferior; fs = fase superior. Revelação com ácido sulfúrico 10%. Para obtenção da fração polar do extrato, vide item 5.2.2.

Para a FS (fração apolar do extrato EtOH R), a mistura HAMAg na proporção 4:1:4:1 v/v (**FIGURA 30**) foi a que resultou em melhor separação dos constituintes químicos em ambas as

fases do sistema de solventes, sendo selecionado como sistema bifásico para a realização da HSCCC.

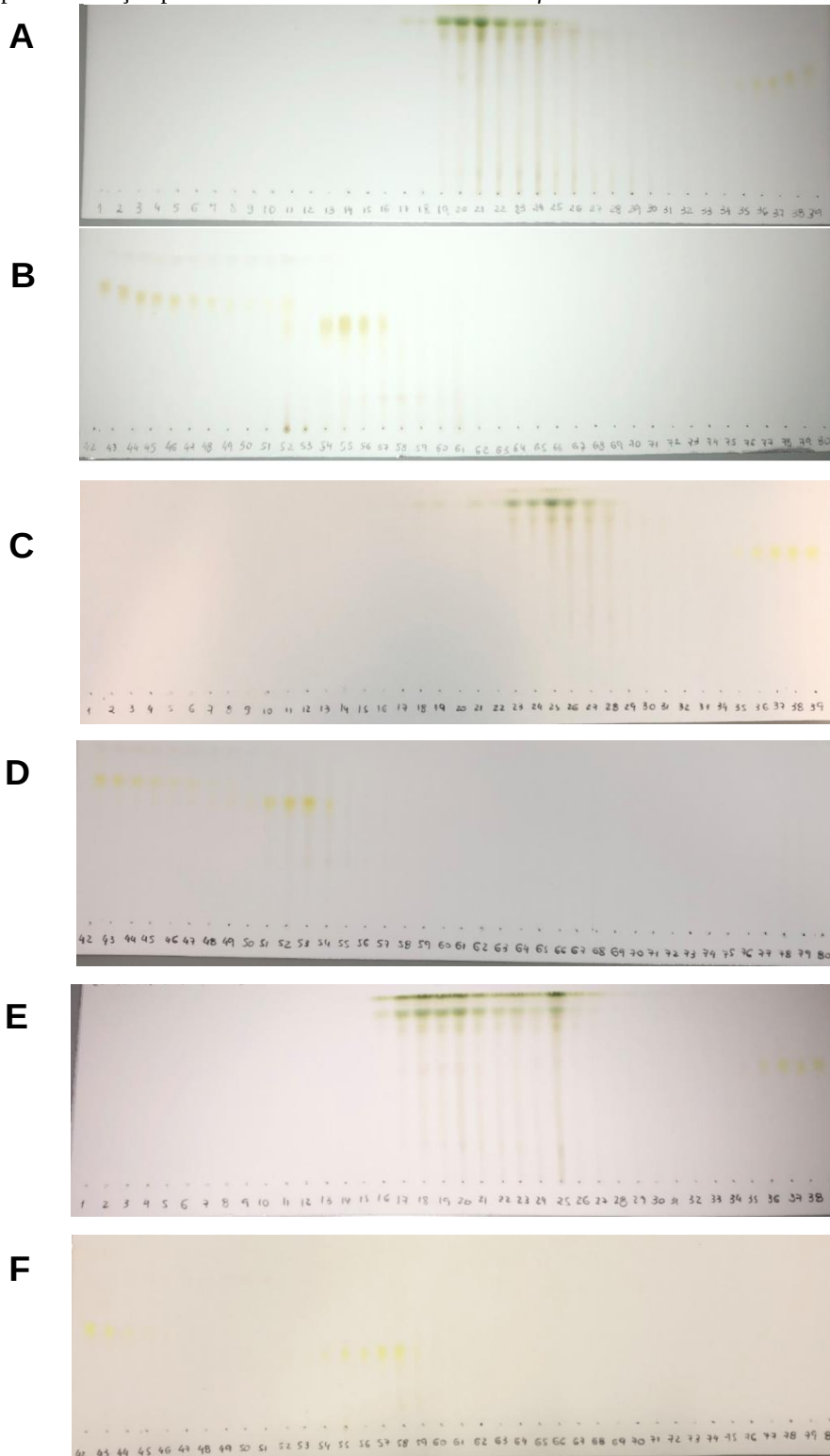
**FIGURA 30** – Perfil das substâncias químicas presentes na fração apolar obtida a partir do extrato etanólico otimizado de *C. lineatifolia* em Cromatografia em Camada Delgada, solubilizado em diferentes misturas de solventes (A – D).



Legenda: Mistura de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água, nas proporções v/v (A) 1:1:1:1; (B) 2:1:2:1; (C) 3:1:3:1 e (D) 4:1:4:1. Fase móvel: Clorofórmio: Metanol: Água, 9:1:1 v/v. fi = fase inferior; fs = fase superior. Revelação com ácido sulfúrico 10%. Para obtenção da fração apolar do extrato, vide item 5.2.2.

A fração polar do extrato EtOH R (FI) obtida a partir da solubilização do extrato etanólico otimizado em HAMAg 1:1:1:1 v/v foi separada por HSCCC, utilizando-se o sistema bifásico constituído por HAMAg 1:4:1:4 v/v. Foram obtidas 80 frações como resultado da HSCCC, as quais foram analisados em CCD, conforme demonstrado na **Figura 31**.

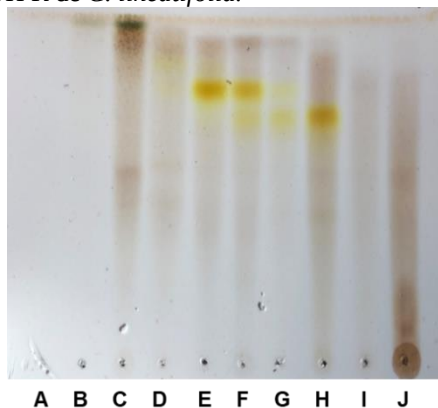
**FIGURA 31** – Cromatografia em camada delgada das 80 frações obtidas em três diferentes separações por HSCCC, a partir da fração polar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



Legenda: (A) corrida 1, frações 1 a 39; (B) corrida 1, frações 42 a 80; (C) corrida 2, frações 1 a 39; (D) corrida 2, frações 42 a 80; (E) corrida 3, frações 1 a 39 e (F) corrida 3, frações 42 a 80. Eluição realizada em sistema de solventes Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v), seguida de revelação com ácido sulfúrico 10%. Vide item 5.2.2 para método de obtenção da fração polar do extrato.

A partir da análise das CCD obtidas para as três separações em HSCCC, as frações foram reunidas de acordo com a similaridade de seus padrões de eluição e valores do fator de retenção ( $R_f$ ), obtendo-se 10 frações finais, nomeadas de A a J (**FIGURA 32**).

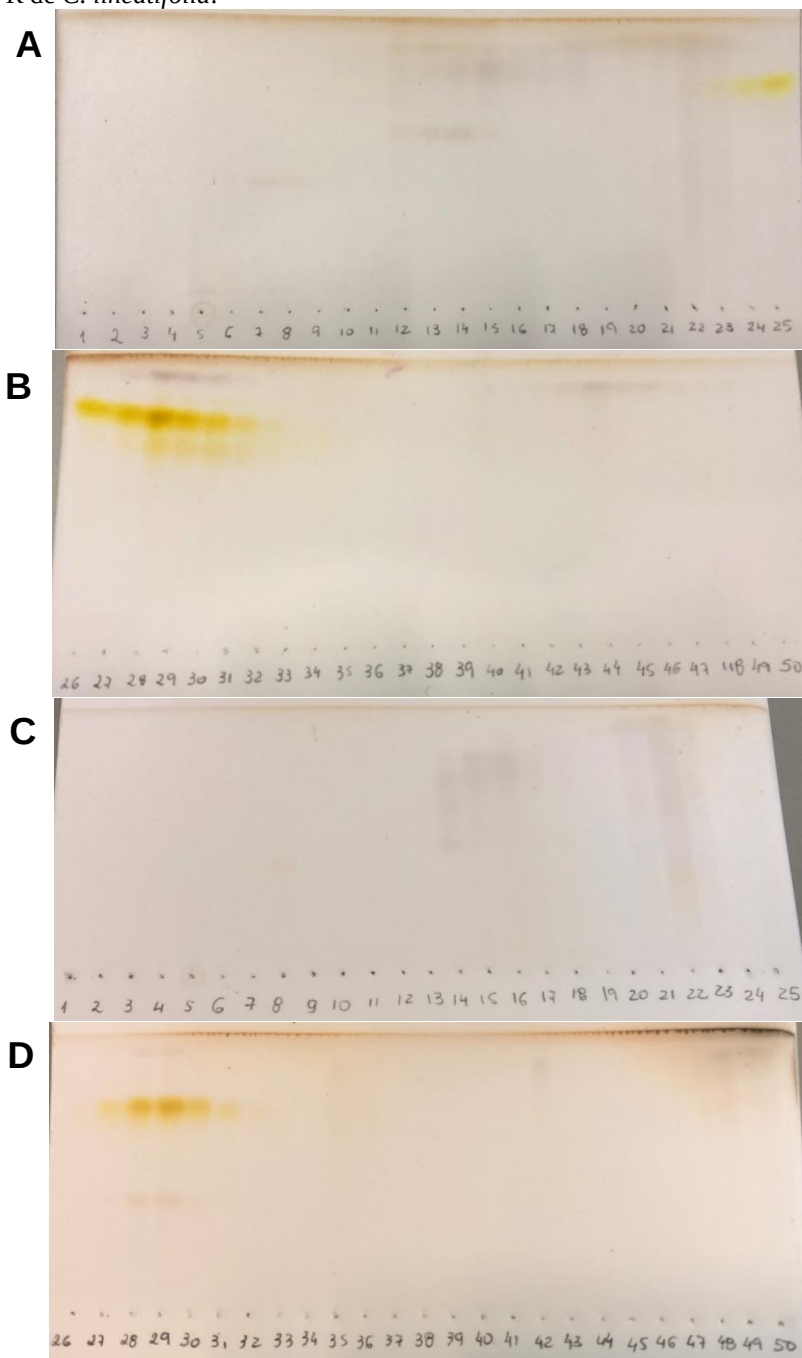
**FIGURA 32** – Cromatografia em camada delgada das frações reunidas obtidas por HSCCC, a partir da fração polar do extrato etanólico otimizado EtOH R de *C. lineatifolia*.



Legenda: HSCCC = cromatografia em contracorrente de alta velocidade. Eluição realizada em sistema de solventes Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v), seguida de revelação com ácido sulfúrico 10%. Vide item 5.2.2 para método de obtenção da fração polar do extrato.

Objetivando-se o isolamento e a purificação dos flavonoides presentes nas frações E e G, estas foram submetidas à separação por cromatografia por exclusão molecular, utilizando-se coluna de Sephadex LH-20. As 50 novas frações obtidas para cada fração foram analisadas em CCD, como pode ser observado na **Figura 33**.

**FIGURA 33** – Cromatografia em camada delgada das 50 frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular, em coluna de Sephadex LH-20, a partir da fração E (A e B) e G (C e D) da fração polar do extrato etanólico otimizado EtOH R de *C. lineatifolia*.

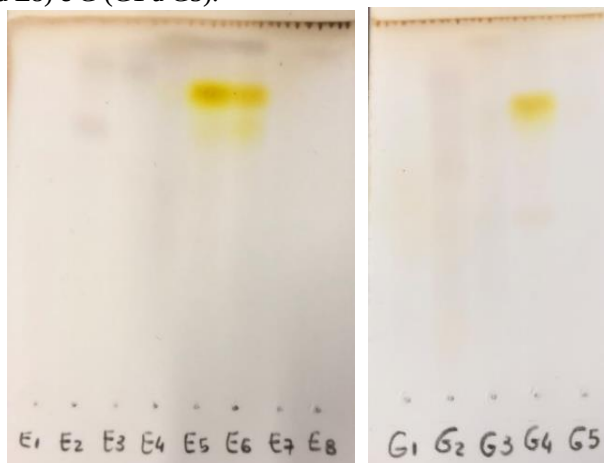


Nota: eluição realizada em sistema de solventes Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v), seguida de revelação com ácido sulfúrico 10%.

De acordo com o perfil cromatográfico obtido, as frações da junção E foram reunidas em 8 frações, nomeadas E1 (frações 1 a 11); E2 (frações 12 a 15); E3 (frações 16 a 18); E4 (frações 19 a 23); E5 (frações 24 a 27); E6 (frações 28 a 33); E7 (frações 34 a 41) e E8 (frações 42 a 50). As frações da junção G foram reunidas em 5 frações, nomeadas G1 (frações 1 a 12); G2 (frações 13 a 20); G3 (frações 21 a 26); G4 (frações 27 a 32) e G5 (frações 33 a 50). Todas as

frações reunidas foram analisadas novamente em CCD, conforme perfil demonstrado na **Figura 34**.

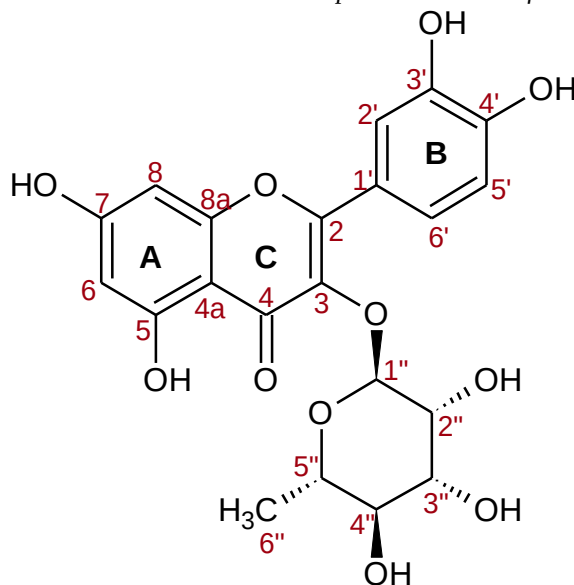
**FIGURA 34** – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas por cromatografia por exclusão molecular, das junções E (E1 a E8) e G (G1 a G5).



Nota: eluição realizada em sistema de solventes Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v), seguida de revelação com ácido sulfúrico 10%.

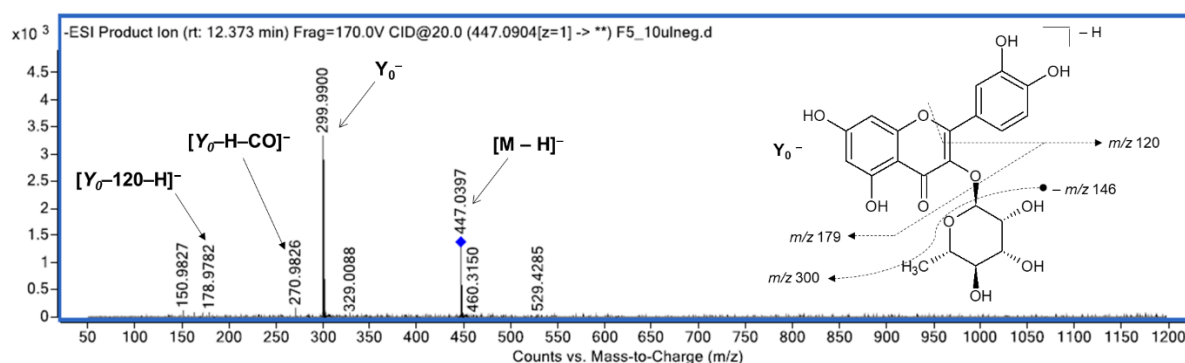
Para a fração E, a passagem pela coluna de Sephadex LH-20 não resultou em completa purificação do constituinte químico selecionado. Nesse caso, para obtenção das substâncias puras, foi realizada a CCD em camada preparativa como última etapa de purificação. A **substância E** isolada e purificada foi identificada pela análise de seus dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais e informações da literatura, como quercetina-3-O-ramnosídeo, ou quercitrina (**FIGURA 35**).

**FIGURA 35** – Substância 5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavonol-3-O-ramnosídeo (quercitrina) isolada do extrato etanólico das folhas de *Campomanesia lineatifolia*.



A cromatografia em camada delgada realizada previamente para a fração E (**FIGURA 34**) revelou a presença de um flavonoide. O espectro de absorção no UV/Vis mostra picos específicos de absorção em  $\lambda$  255 e 348 nm, compatíveis com os padrões de substituição nos anéis A (grupo benzoíla) e B (grupo cinamoíla) de flavonol (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Análise em CLAE-ESI-MS exibiu o íon molecular precursor desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  447, podendo sugerir uma massa molecular de 448, com fórmula molecular de  $C_{21}H_{20}O_{11}$ . O espectro de massas de segunda ordem (**FIGURA 36**) do íon precursor  $m/z$  447  $[M-H]^-$  produziu o íon  $Y_0^-$  de  $m/z$  300  $[M-146-2H]^-$  como resultado da clivagem da unidade de açúcar, típica de deoxihexoses (LI e CLAEYS *et al.*, 1994) e atribuída ao derivado 3-O-ramnosídeo (HILBERT *et al.*, 2015), bem como um íon  $[Y_0-H-CO]^-$  de  $m/z$  271 típico de flavon-3-O-monoglicosídeo (ABLAJAN *et al.*, 2006) e de  $m/z$  179 a partir da reação de retro Dies-Alder do anel A.

**FIGURA 36** – Espectro do íon de segunda geração obtido para o íon precursor da substância E ( $m/z$  447), obtidos em EM-EM.



**Substância E (quercitrina; quercetina 3-O-ramnosídeo):** UV,  $\lambda_{\max}$  255 e 348 nm; CLUE-ESI-MS,  $m/z$  447  $[M-H]^-$ , com fórmula molecular:  $C_{21}H_{20}O_{11}$ . Os dados dos espectros de RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_H$  em ppm [mult ( $J$  em Hz), H] e RMN de  $^{13}C$  (125 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$  em ppm, estão descritos na **Tabela 7** e os espectros mostrados nas **Figuras 37 a 43**.

**Tabela 7** – Dados do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) e  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) para a substância E, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

| Posição | E<br>$\delta_{\text{C}}$ , em ppm | Literatura <sup>1</sup><br>Quercitrina<br>$\delta_{\text{C}}$ , em ppm | E<br>$\delta_{\text{H}}$ , em ppm,<br>multiplicidade<br>(J em Hz) | Literatura <sup>1</sup><br>Quercitrina<br>$\delta_{\text{H}}$ , em ppm,<br>multiplicidade<br>(J em Hz) | E<br>HMBC |
|---------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2       | 156,9                             | 156,2                                                                  |                                                                   |                                                                                                        | 8         |
| 3       | 134,6                             | 134,2                                                                  |                                                                   |                                                                                                        | 1''       |
| 4       | 178,2                             | 177,7                                                                  |                                                                   |                                                                                                        |           |
| 4a      | 104,5                             | 104,10                                                                 |                                                                   |                                                                                                        | 6, 8      |
| 5- OH   | 161,7                             | 161,3                                                                  | 12,67 (s)                                                         | 12,66 (s)                                                                                              | 6         |
| 6       | 99,16                             | 98,7                                                                   | 6,21 (d, 2,0)                                                     | 6,21 (d, 1,9)                                                                                          | 8         |
| 7       | 164,7                             | 164,2                                                                  |                                                                   |                                                                                                        | 6, 8      |
| 8       | 94,1                              | 93,3                                                                   | 6,39 (d, 2,0)                                                     | 6,39 (d, 1,9)                                                                                          | 6         |
| 8a      | 157,7                             | 157,3                                                                  |                                                                   |                                                                                                        |           |
| 1'      | 121,1                             | 121,9                                                                  |                                                                   |                                                                                                        | 5'        |
| 2'      | 115,9                             | 115,4                                                                  | 7,30 (d, 2,0)                                                     | 7,30 (d, 2,1)                                                                                          | 6'        |
| 3'      | 145,6                             | 145,2                                                                  |                                                                   |                                                                                                        | 2', 5'    |
| 4'      | 148,9                             | 148,4                                                                  |                                                                   |                                                                                                        | 6'        |
| 5'      | 116,1                             | 115,6                                                                  | 6,88 (d, 8,0)                                                     | 6,88 (d, 8,4)                                                                                          |           |
| 6'      | 121,5                             | 120,1                                                                  | 7,27 (dd, 8,4; 2,0)                                               | 7,26 (dd, 8,4; 2,1)                                                                                    | 2'        |
| 1''     | 102,2                             | 101,8                                                                  | 5,26 (d, 1,6)                                                     | 5,26 (d, 1,7)                                                                                          |           |
| 2''     | 70,5                              | 70,3                                                                   | 3,98 (dd)                                                         | 3,98 (dd, 1,7; 3,0)                                                                                    |           |
| 3''     | 70,8                              | 70,6                                                                   | 3,52 (dd, 2,8; 9,0)                                               | 3,52 (dd, 3,0; 9,1)                                                                                    | 1''       |
| 4''     | 71,6                              | 71,2                                                                   | 3,15~3,21 (m)                                                     | 3,15~3,23 (m)                                                                                          | 3'', 2''  |
| 5''     | 71,0                              | 70,0                                                                   | 3,15~3,21 (m)                                                     | 3,15~3,23 (m)                                                                                          |           |
| 6''     | 17,9                              | 17,5                                                                   | 0,82 (d, 6,0)                                                     | 0,82 (d, 6,1)                                                                                          | 4''       |

<sup>1</sup>Mok e Lee, 2013.

Sinais típicos de flavonoides foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância G4. A presença de hidrogênios aromáticos ( $\delta$  6-7 ppm), juntamente com um singlete em  $\delta$  12,67 ppm (5-OH do anel A), confirmam a estrutura de um flavonoide (MOK e LEE, 2013).

#### Caracterização do anel A:

Os hidrogênios em C-6 e C-8 de flavonóis apresentam um padrão comum de 5,7-dihidroxi substituição que dão origem a dois dubletos, com constante de acoplamento *meta* ( $J \sim 2,0$  Hz) e sinais na região de 6,0–6,5 ppm (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Dois sinais (par de dubletos) em  $\delta$  6,39 e 6,21 ppm relativos aos H-8 e H-6, respectivamente, com constante de acoplamento *meta* ( $J = 2,0$  Hz) foram observados no espectro, caracterizando a dissustituição do anel A. Ainda, a presença de um singlete em região mais desblindada,  $\delta$  12,67 ppm, indica a presença de uma hidroxila na posição C-5 (MOK e LEE, 2013).

#### Caracterização do anel B:

Os sinais de hidrogênios em C-2' e -6' em flavonoides com padrão 3',4'-oxigenados apresentam deslocamentos químicos entre  $\delta$  7,2-7,5 ppm e 7,3-7,7 ppm, respectivamente

(MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Um duplo duplete de um hidrogênio foi observado entre  $\delta$  7,25-7,27, com constante de acoplamento *meta* ( $J = 2,0$  Hz) e *orto* ( $J = 8,4$  Hz), caracterizando o H-6', demonstrado pelo seu acoplamento *meta* com H-2' e *orto* com H-5'. Para o H-2', foi observado um duplete de um hidrogênio em  $\delta$  7,30 ppm, com constante de acoplamento *meta* ( $J = 2,0$  Hz) com o H-6'. Sinais semelhantes ao observado neste trabalho foi demonstrado nos estudos de Mok e Lee (2013) e Hong *et al.* (2013), confirmando o padrão de um flavonol dissustituído no anel B.

#### Caracterização do anel C:

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , o sinal em  $\delta$  178,2 ppm caracteriza a presença do grupo carbonila em C-4, característico de anel C de flavonol (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Ainda, o sinal observado em  $\delta$  156,9 ppm indica a presença de ligação dupla, atribuída ao carbono C-2.

#### Açúcar:

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a blindagem do sinal para C-3 ( $\delta$  134.6 ppm) quando comparada ao sinal correspondente a C-5 ( $\delta$  161.7 ppm) e C-7 ( $\delta$  164.7 ppm) dá suporte ao fato de que a ligação glicosídica acontece na posição C-3 da estrutura flavonoídica, em flavonóis contendo açúcar (CASTILLO-MUÑOZ *et al.*, 2009). Um flavonol 3-O-glicosilado se caracteriza no espectro RMN de  $^1\text{H}$  pela presença de um sinal referente a um hidrogênio anomérico entre 4,0 e 6,0 ppm (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  indicam 21 sinais de carbono, com padrões típicos de quercetina 3-O-ramnopiranosídeo, com o açúcar caracterizado pela presença de: carbono anomérico  $\delta_{\text{C}}$  102,2 ppm (C-1'') e hidrogênio anomérico  $\delta_{\text{H}}$  5,26 ppm (H-1''); carbonos hidroxissustituídos em 2'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,98 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  70,5 ppm), 3'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,52 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  70,8 ppm) e 4'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,15~3,21 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  71,6 ppm); carbono 5'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,15~3,21 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  71,0 ppm) com substituição de grupo metila 6'' ( $\delta_{\text{H}}$  0,82 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  17,9 ppm) (MOK e LEE, 2013).

**FIGURA 37** – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) obtido para a substância E (quercitrina), isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

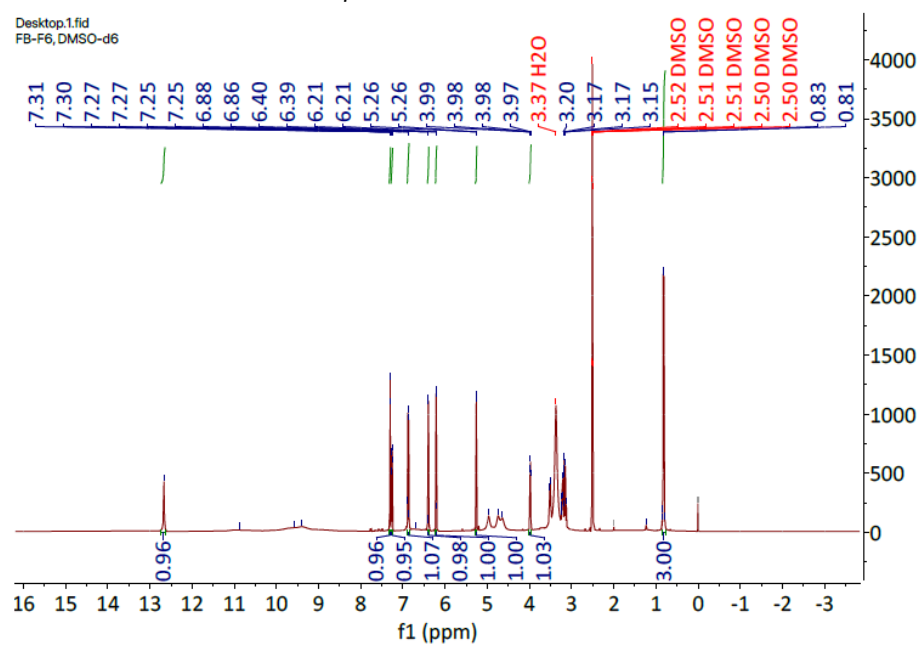


**FIGURA 38** – Expansões do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

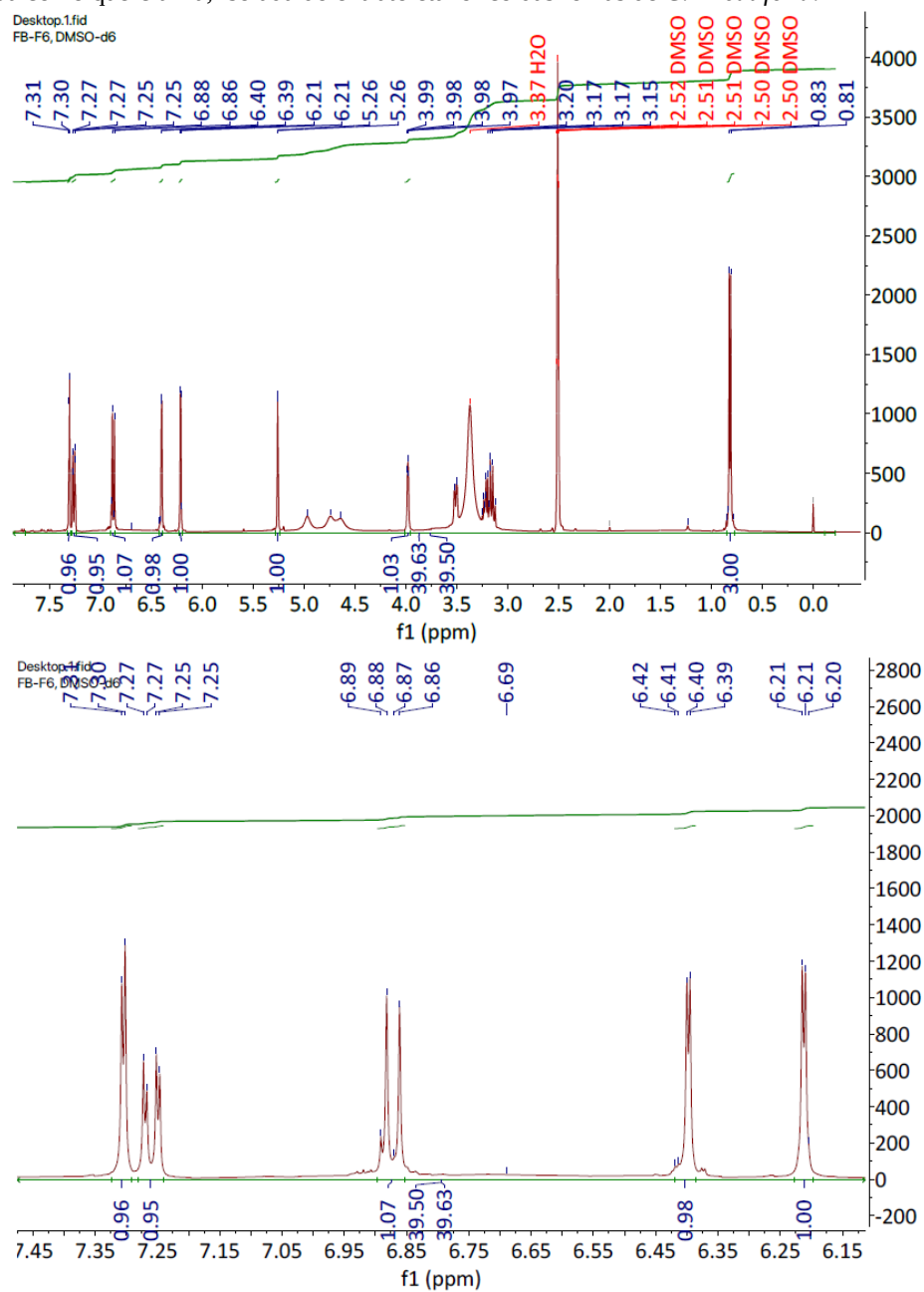


**FIGURA 39** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

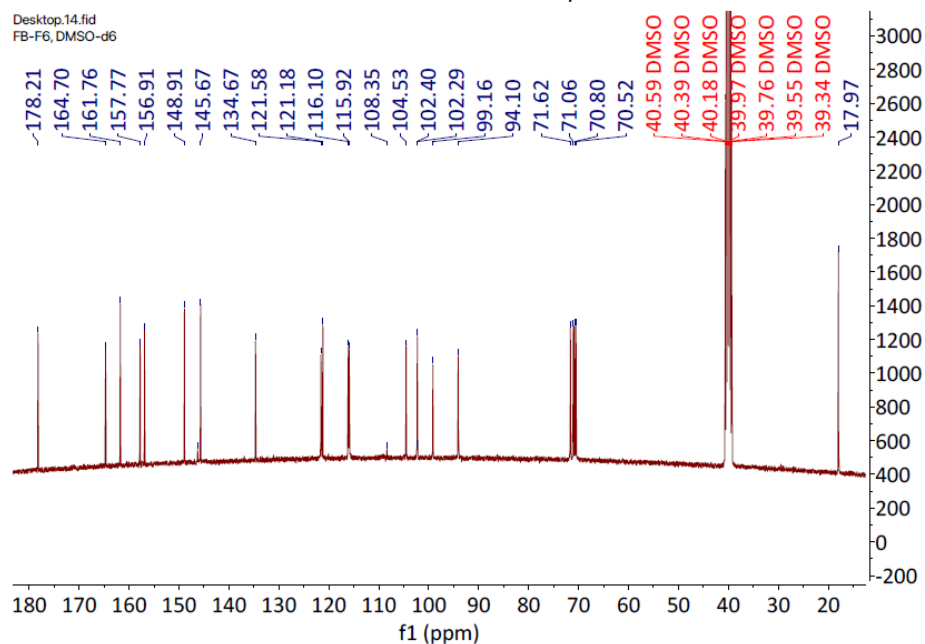


**FIGURA 40** – Espectro DEPT 135° (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

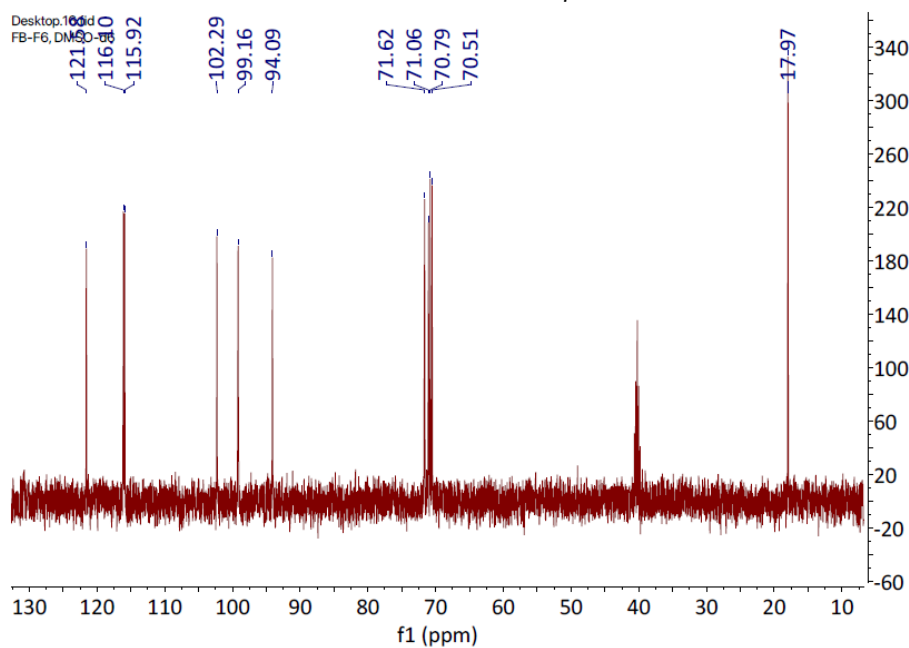


**FIGURA 41** – Mapa de correlação heteronuclear HSQC (1H x 13C) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

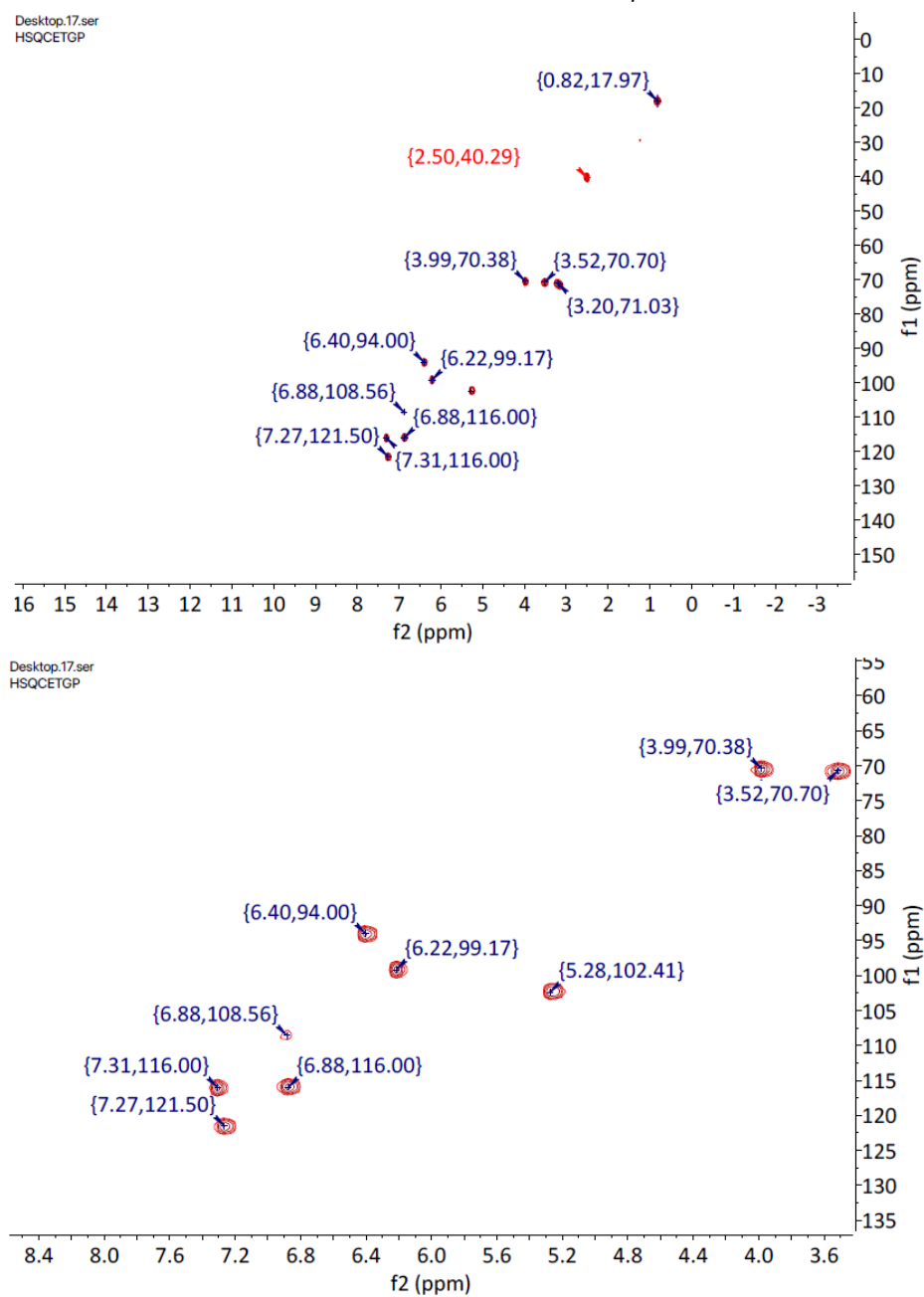


**FIGURA 42** – Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

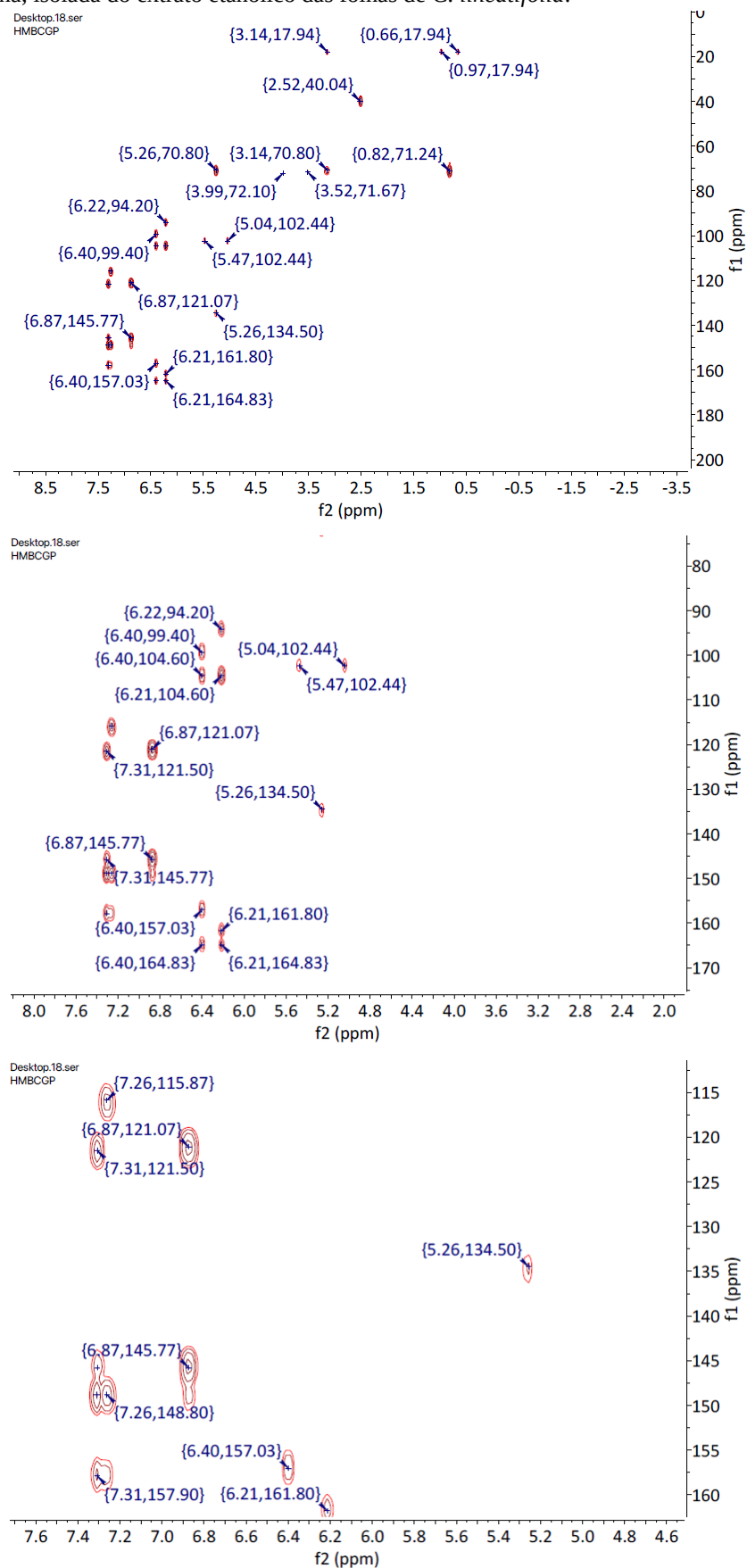
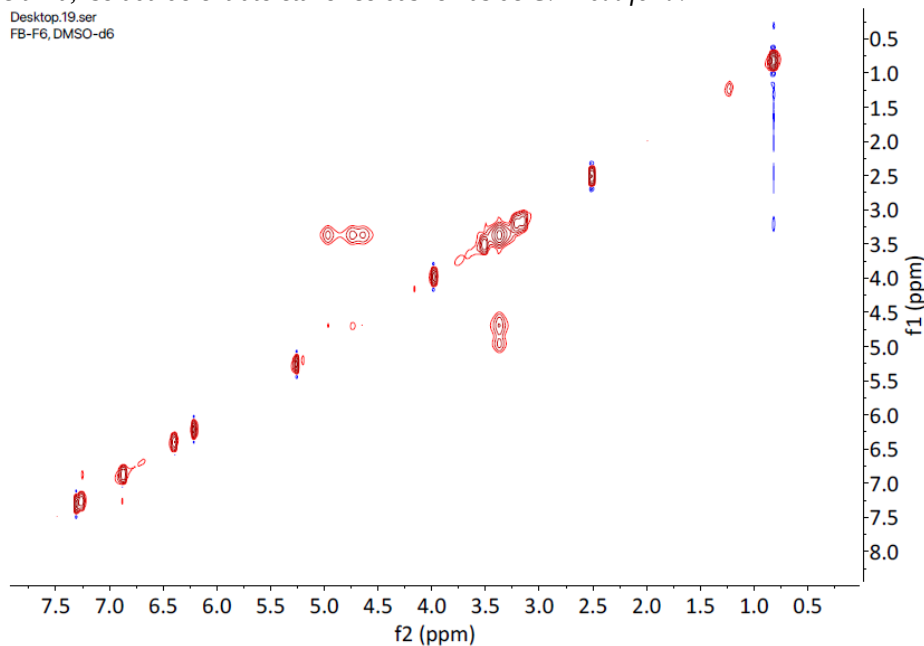


**FIGURA 43** – Mapa de correlação homonuclear COSY ( $1\text{H} \times 1\text{H}$ ) obtido para a substância E, identificada como quercitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.



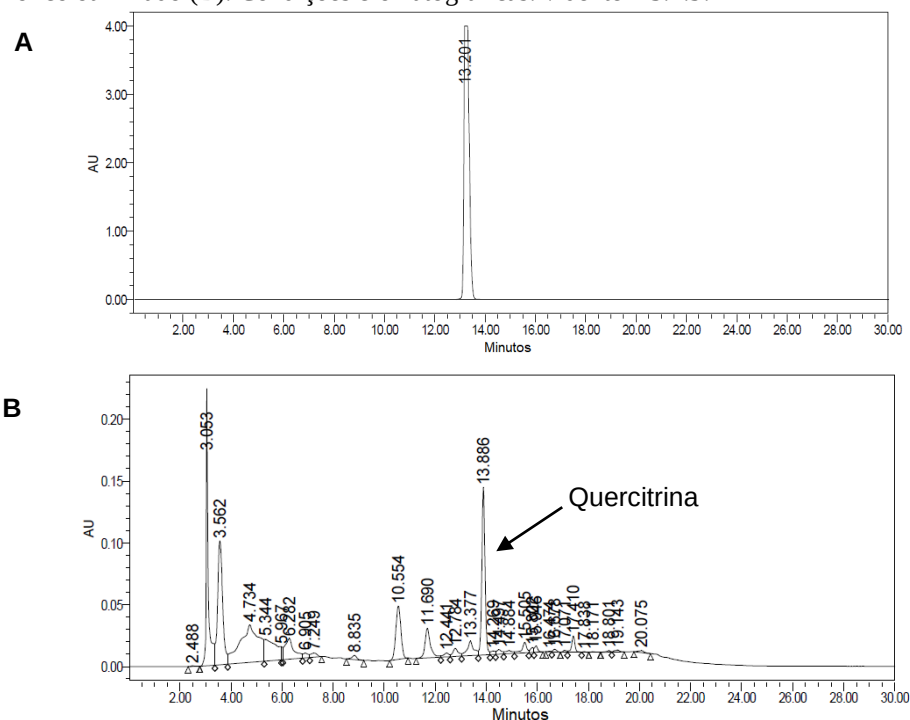
**Características físicas:** a substância E apresentou-se como sólido amarelo (**FIGURA 44**) solúvel em metanol.

**FIGURA 44** – Sólido amarelo (substância E, quercitrina) isolado e purificado do extrato etanólico das folhas de *Campomanesia lineatifolia*.



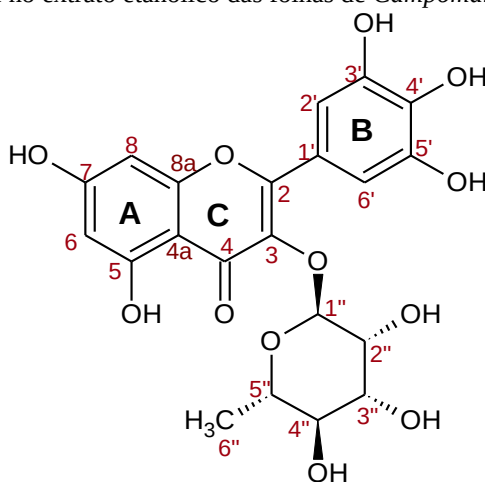
**Análise em CLAE:** a quercitrina isolada apresentou tempo de retenção igual a 13,201 min, correspondendo à substância de tempo de retenção de 13,886 min na fração polar do extrato etanólico otimizado obtido a partir da extração pelo sistema HAMAg, conforme demonstrado na **Figura 45** abaixo:

**FIGURA 45** – Perfil cromatográfico em CLAE (335 nm) para quercitrina isolada (**A**) a partir da fração polar do extrato etanólico otimizado (**B**). Condições cromatográficas: vide item 5.2.9.



A **substância G4** isolada e purificada foi identificada pela análise de seus dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais, perfil cromatográfico em CCD e CLAE, espectros no UV/Vis, CLAE-ESI-EM e EM-EM, comparando-se com dados da literatura, sendo possível propor a estrutura miricetina-3-*O*-ramnosídeo (**FIGURA 46**).

**FIGURA 46** – Substância 5,7,3',4',5'-pentahidroxi-flavonol-3-*O*-ramnosídeo (miricitrina) isolada e identificada no extrato etanólico das folhas de *Campomanesia lineatifolia*.



**Substância G4 (miricitrina; miricetina 3-*O*-ramnosídeo):** UV,  $\lambda_{\text{max}}$  261, 348 nm; CLUE-ESI-MS,  $m/z$  463  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , com fórmula molecular:  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ . Os dados dos espectros de RMN

de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  em ppm [mult ( $J$  em Hz), H] e RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  em ppm, estão descritos na **Tabela 8** e os espectros nas **Figuras 48 a 54**.

**Tabela 8** – Dados do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) e  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) para a substância G4, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

| Posição | G4<br>$\delta_{\text{C}}$ , em ppm | Literatura <sup>1</sup><br>Miricitrina<br>$\delta_{\text{C}}$ , em ppm | G4<br>$\delta_{\text{H}}$ , em ppm,<br>multiplicidade<br>( $J$ em Hz) | Literatura <sup>1</sup><br>Miricitrina | G4<br>HMBC            |
|---------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| 2       | 156,87                             | 156,4                                                                  |                                                                       | -                                      |                       |
| 3       | 134,73                             | 134,3                                                                  |                                                                       | -                                      |                       |
| 4       | 178,23                             | 177,8                                                                  |                                                                       | -                                      |                       |
| 4a      | 104,46                             | 104,0                                                                  |                                                                       |                                        |                       |
| 5-OH    | 161,77                             | 161,3                                                                  | 12,5 s                                                                | 12,69 (s)                              |                       |
| 6       | 99,13                              | 98,6                                                                   | 6,20 d                                                                | 6,21 (d, 1,5)                          | 4a (fraco), 7 (fraco) |
| 7       | 164,71                             | 164,1                                                                  |                                                                       | -                                      |                       |
| 8       | 93,99                              | 93,5                                                                   | 6,37 d                                                                | 6,37 (d, 1,5)                          |                       |
| 8a      | 157,93                             | 157,5                                                                  |                                                                       |                                        |                       |
| 1'      | 120,05                             | 119,6                                                                  |                                                                       | -                                      |                       |
| 2' e 6' | 108,35                             | 108,0                                                                  | 6,89 s                                                                | 6,89 (s)                               | 2', 6', 4', 2         |
| 3' e 5' | 146,23                             | 145,8                                                                  |                                                                       | -                                      |                       |
| 4'      | 136,92                             | 136,4                                                                  |                                                                       | -                                      |                       |
| 1''     | 102,40                             | 102,0                                                                  | 5,20 d                                                                | 5,20 (d, 1,7)                          | 3''                   |
| 2''     | 70,47                              | 70,4                                                                   | 4,02                                                                  | 3,99 (dd, 1,7, 3,6)                    |                       |
| 3''     | 70,84                              | 70,5                                                                   | 3,57                                                                  | 3,56 (dd, 3,6, 9,5)                    |                       |
| 4''     | 71,73                              | 71,3                                                                   | 3,36                                                                  | 3,14~3,18 (m)                          |                       |
| 5''     | 71,02                              | 70,0                                                                   | 3,16                                                                  | 3,14~3,18 (m)                          |                       |
| 6''     | 17,99                              | 17,5                                                                   | 0,86 (d, 8,0)                                                         | 0,85 (d, 6,0)                          |                       |

– : sinal não observado; <sup>1</sup>Mok e Lee, 2013.

Sinais típicos de flavonoides foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância G4. A presença de hidrogênios aromáticos ( $\delta$  6-7 ppm), juntamente com um singlete em  $\delta$  12,5 ppm (5-OH do anel A), confirmam a estrutura de um flavonoide (MOK e LEE, 2013).

#### Caracterização do anel A:

Os hidrogênios em C-6 e C-8 de flavonóis apresentam um padrão comum de 5,7-dihidroxi substituição que dão origem a dois dubletos, com constante de acoplamento *meta* ( $J \sim 2,0$  Hz) e sinais na região de 6,0–6,5 ppm (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Dois sinais (par de dubletos) em  $\delta$  6,37 e 6,20 ppm relativos aos H-8 e H-6, respectivamente, com constante de acoplamento *meta* ( $J < 2,0$  Hz) foram observados no espectro, caracterizando a dissustituição do anel A. Ainda, a presença de um singlete em região mais desblindada,  $\delta$  12,5 ppm, indica a presença de uma hidroxila na posição C-5 (MOK e LEE, 2013).

#### Caracterização do anel B:

Os sinais de hidrogênios em C-2' e -6' geralmente se sobrepõem na região  $\delta$  6,5-7,5 ppm em flavonoides com padrão 3',4',5'-oxigenados (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Um singlete de dois hidrogênios em  $\delta$  6,89 ppm, relativo aos H-2'(6'), foi observado no espectro RMN de  $^1\text{H}$ , caracterizando o padrão de um flavonol trissubstituído no anel B (HILBERT *et al.*, 2015). No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a presença de um sinal intenso em  $\delta$  108,35 ppm confirma a correspondência aos carbonos C-2' e C-6' (MOK e LEE, 2013).

#### Caracterização do anel C:

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , o sinal em  $\delta$  178,23 ppm caracteriza a presença do grupo carbonila em C-4, característico de anel C de flavonol (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Ainda, o sinal observado em  $\delta$  156,87 ppm indica a presença de ligação dupla, atribuída ao carbono C-2 (MOK e LEE, 2013).

#### Açúcar:

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a blindagem do sinal para C-3 ( $\delta$  134,7 ppm) quando comparada ao sinal correspondente para C-5 ( $\delta$  161,77 ppm) e C-7 ( $\delta$  164,71 ppm) suporta o fato de que a ligação glicosídica acontece na posição C-3 da estrutura flavonoídica, em flavonóis contendo açúcar (CASTILLO-MUÑOZ *et al.*, 2009). Um flavonol 3-O-glicosilado se caracteriza no espectro RMN de  $^1\text{H}$  pela presença de um sinal referente a um hidrogênio anomérico entre 4,0 e 6,0 ppm (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Os dados obtidos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  indicam 21 sinais de carbono, com padrões típicos de miricetina 3-O-ramnopiranosídeo, com o açúcar caracterizado pela presença de: carbono anomérico  $\delta_{\text{C}}$  102,40 ppm (C-1'') e hidrogênio anomérico  $\delta_{\text{H}}$  5,20 ppm (H-1''); carbonos hidroxissubstituídos em 2'' ( $\delta_{\text{H}}$  4,02 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  70,47 ppm), 3'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,57 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  70,84 ppm) e 4'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,36 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  71,73 ppm); carbono 5'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,16 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  71,02 ppm) com substituição de grupo metila 6'' ( $\delta_{\text{H}}$  0,86 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  17,99 ppm) (MOK e LEE, 2013).

Além disso, a cromatografia em camada delgada realizada previamente para a fração G4 revelou a presença de flavonoide (**FIGURA 34**). O espectro de absorção no UV/Vis mostra picos específicos de absorção em 261 e 348 nm, compatíveis com os padrões de substituição nos anéis A (grupo benzoíla) e B (grupo cinamoíla) de flavonol (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970). Análise em CLAE-ESI-MS de primeira ordem exibiu o íon molecular

precursor desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  463, podendo sugerir uma massa molecular de 464, com fórmula molecular de  $C_{21}H_{20}O_{12}$ . A fragmentação (**FIGURA 47**) do íon precursor  $m/z$  463  $[M-H]^-$ , produziu o íon  $Y_0^-$  em  $m/z$  316  $[M-146-2H]^-$  como resultado da clivagem da unidade de açúcar, típica de deoxihexoses (ABLAJAN *et al.*, 2006) e atribuída à derivado 3-O-ramnosídeo (HILBERT *et al.*, 2015). Outros fragmentos como  $[Y_0-H-CO-H_2O]^-$  em  $m/z$  271 e  $[Y_0-136-H]^-$  em  $m/z$  179, estão de acordo com a substância G4 (SALDANHA, VILEGAS e DOKKEDAL, 2013).

**FIGURA 47** – Espectros dos íons de segunda geração obtidos para o íon precursor da substância G4, obtidos em EM-EM.

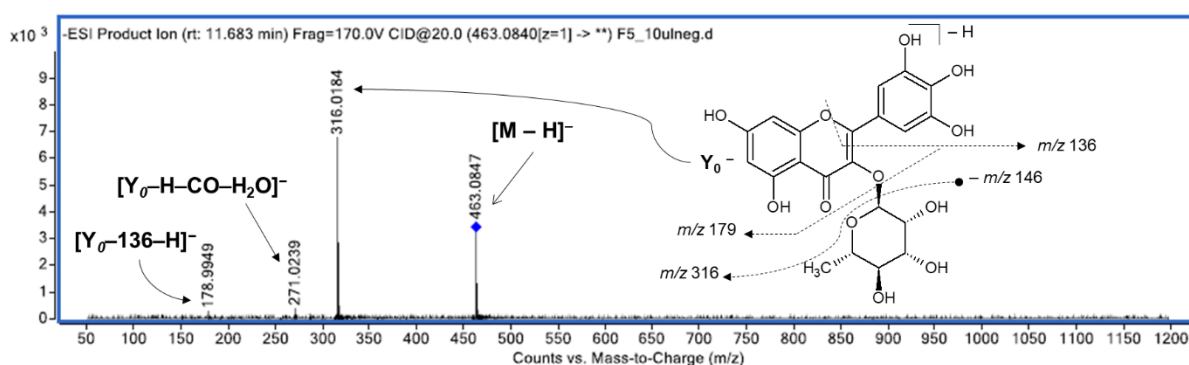


**FIGURA 48** – Espectro de  $^1H$ -RMN (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

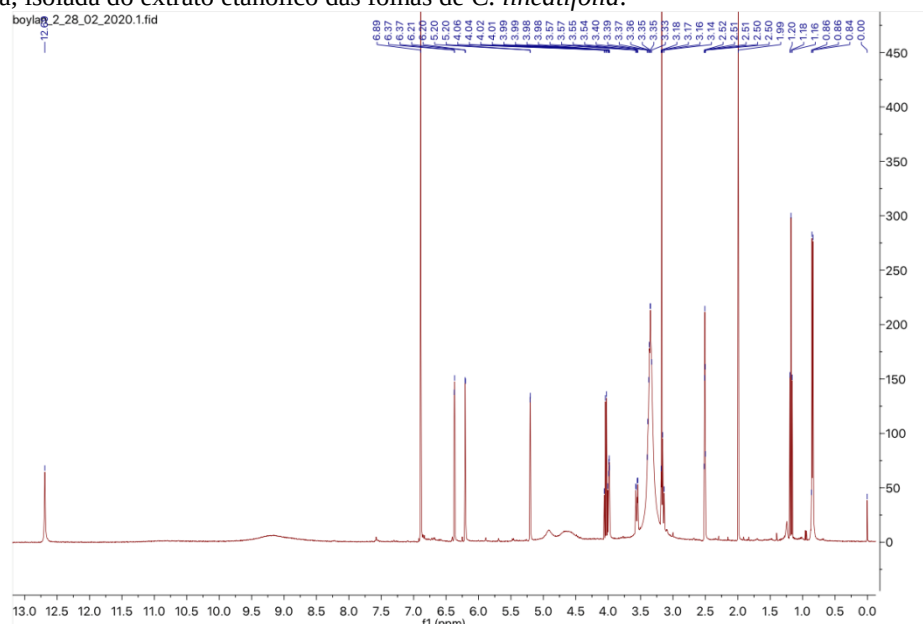


**FIGURA 49** – Expansões do espectro de 1H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

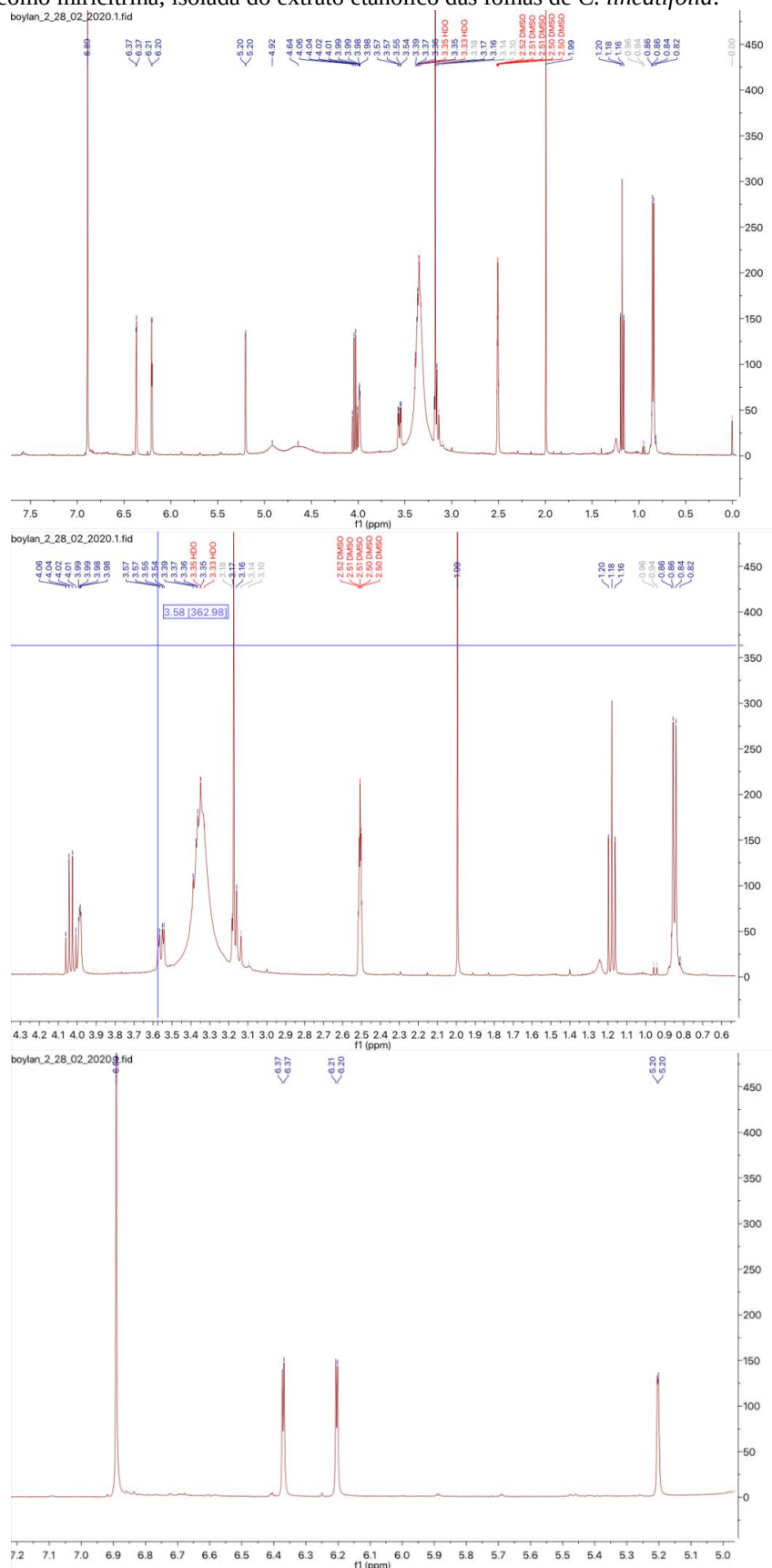


**FIGURA 50** – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 mHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

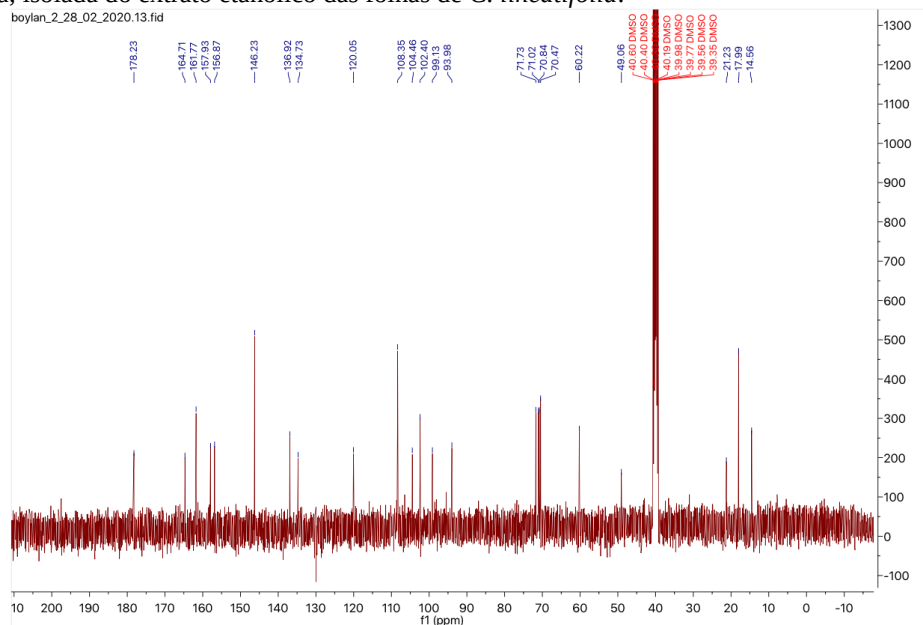


**FIGURA 51** – Espectro DEPT 135° (125 mHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

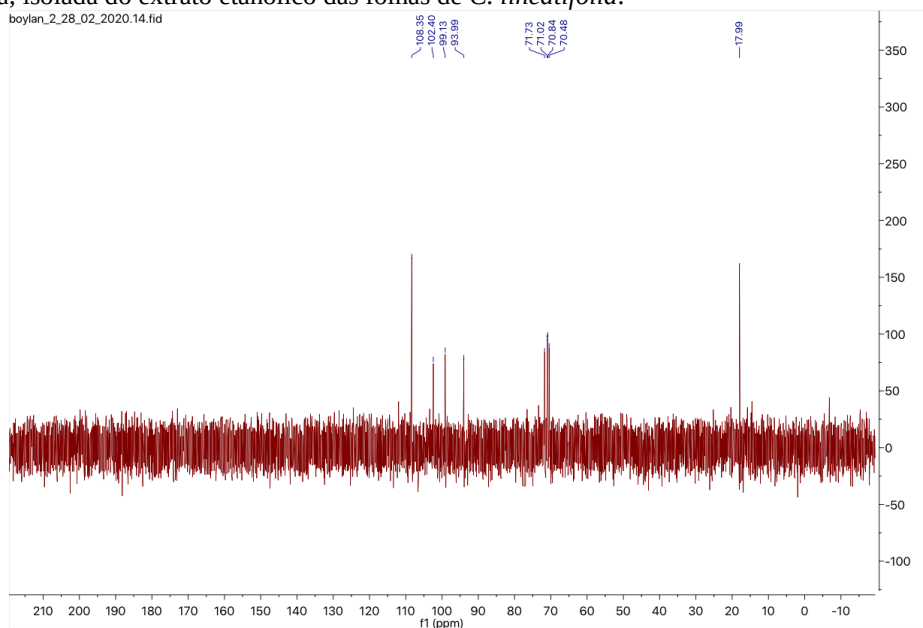


**FIGURA 52** – Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

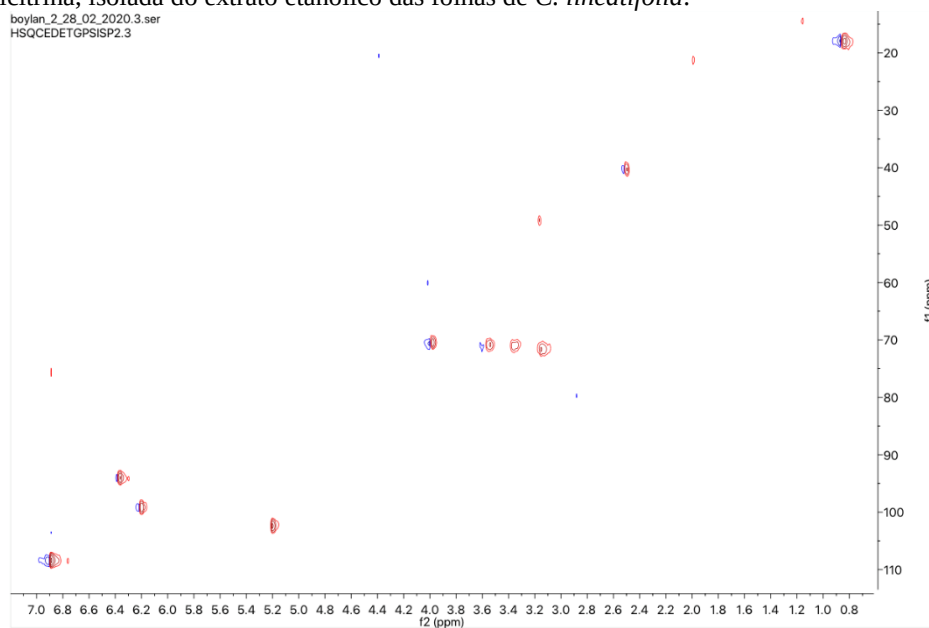


**FIGURA 53** – Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.

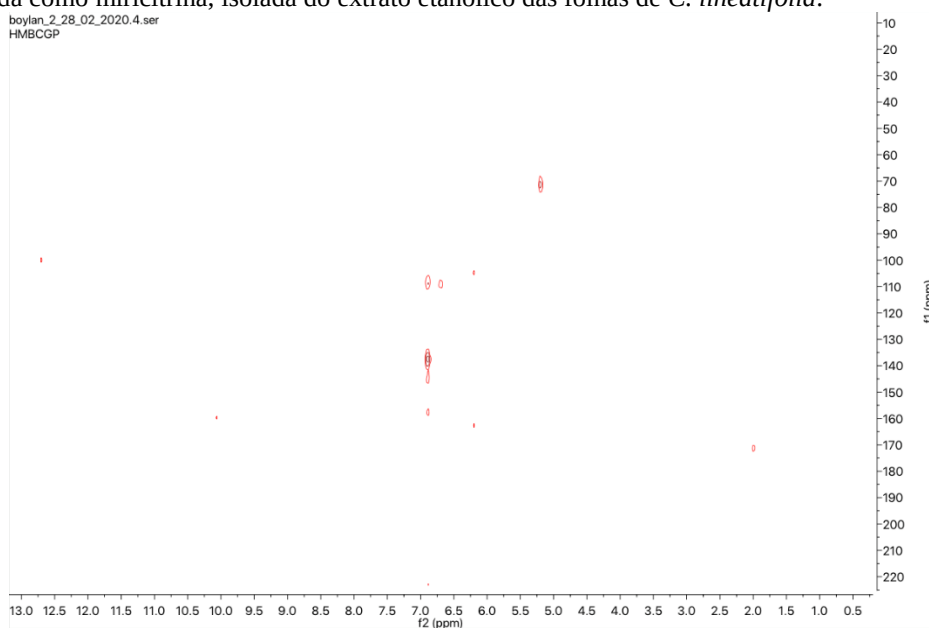
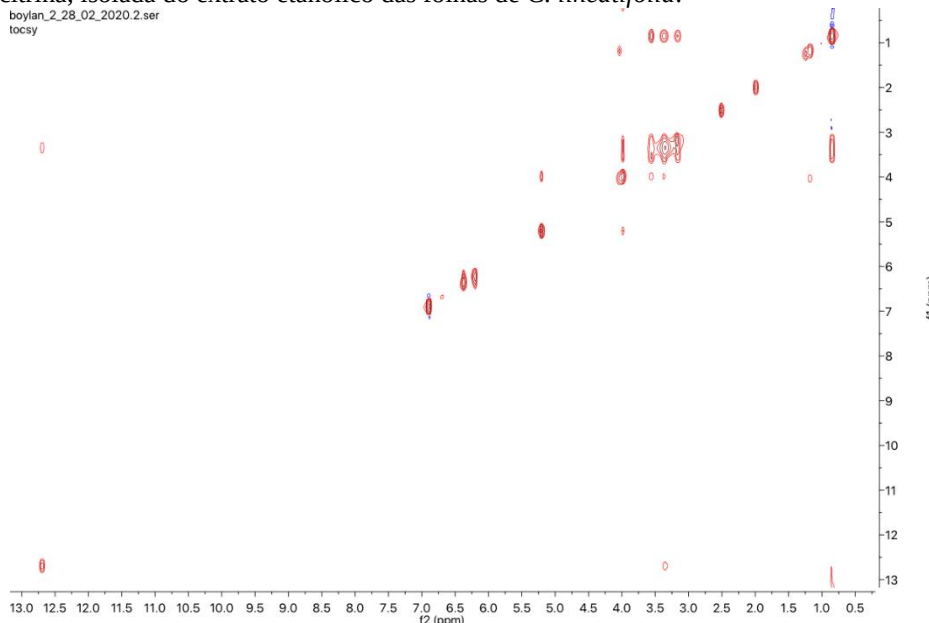


**FIGURA 54** – Mapa de correlação homonuclear COSY (1H x 1H) obtido para a substância G4, identificada como miricitrina, isolada do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*.



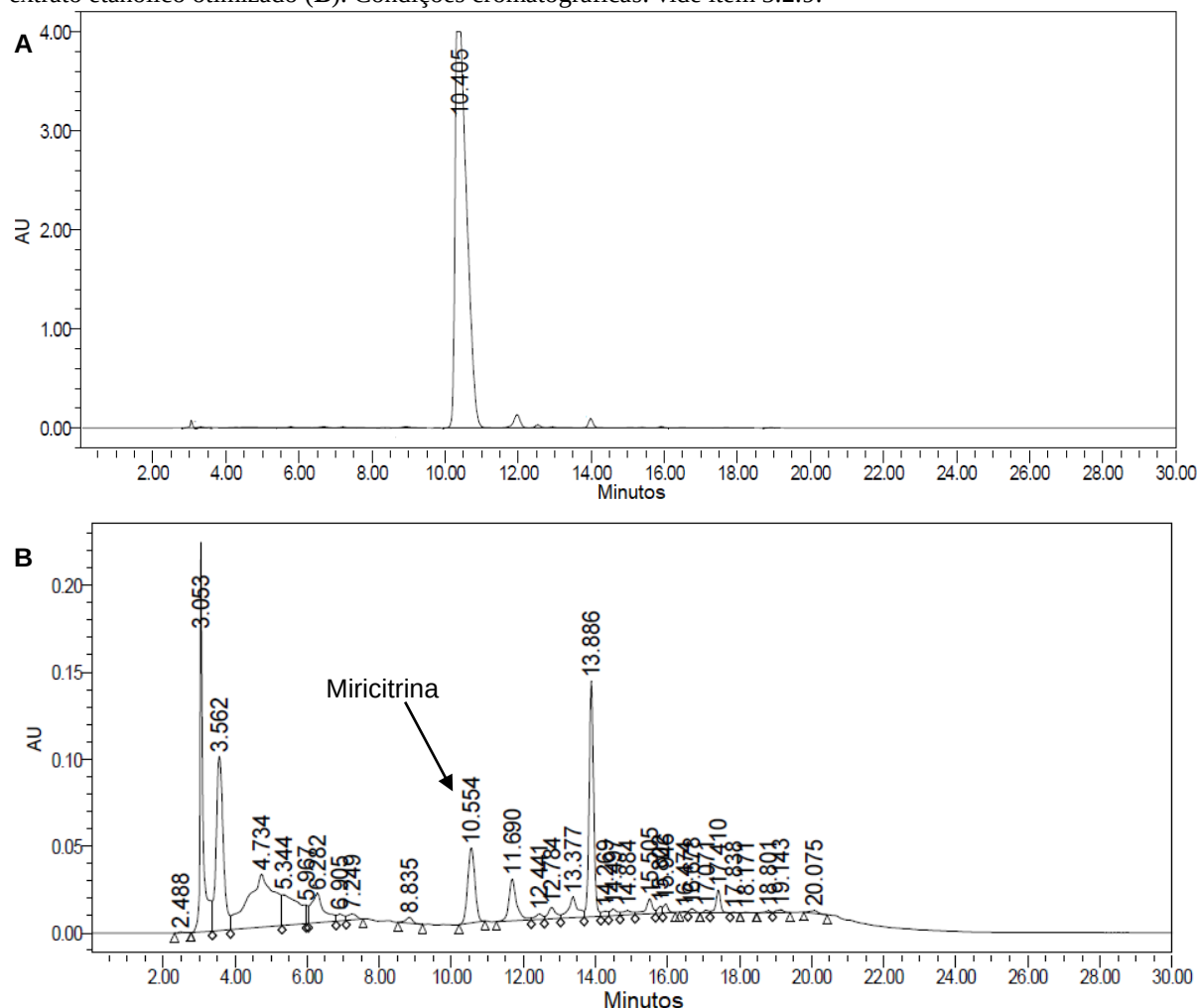
**Características físicas:** a substância G4 apresentou-se como sólido amarelo-dourado (FIGURA 55) solúvel em metanol.

**FIGURA 55** – Sólido amarelo-dourado (substância G4, miricitrina) isolado e purificado do extrato etanólico das folhas de *Campomanesia lineatifolia*.



**Análise em CLAE:** a miricitrina isolada apresentou tempo de retenção igual a 10,405 min, correspondendo à substância de tempo de retenção de 10,554 min na fração polar do extrato etanólico otimizado obtido a partir da extração pelo sistema HAMAg, conforme demonstrado na **Figura 56** abaixo:

**Figura 56** – Perfil cromatográfico em CLAE (335 nm) para miricitrina isolada (**A**) a partir da fração polar do extrato etanólico otimizado (**B**). Condições cromatográficas: vide item 5.2.9.

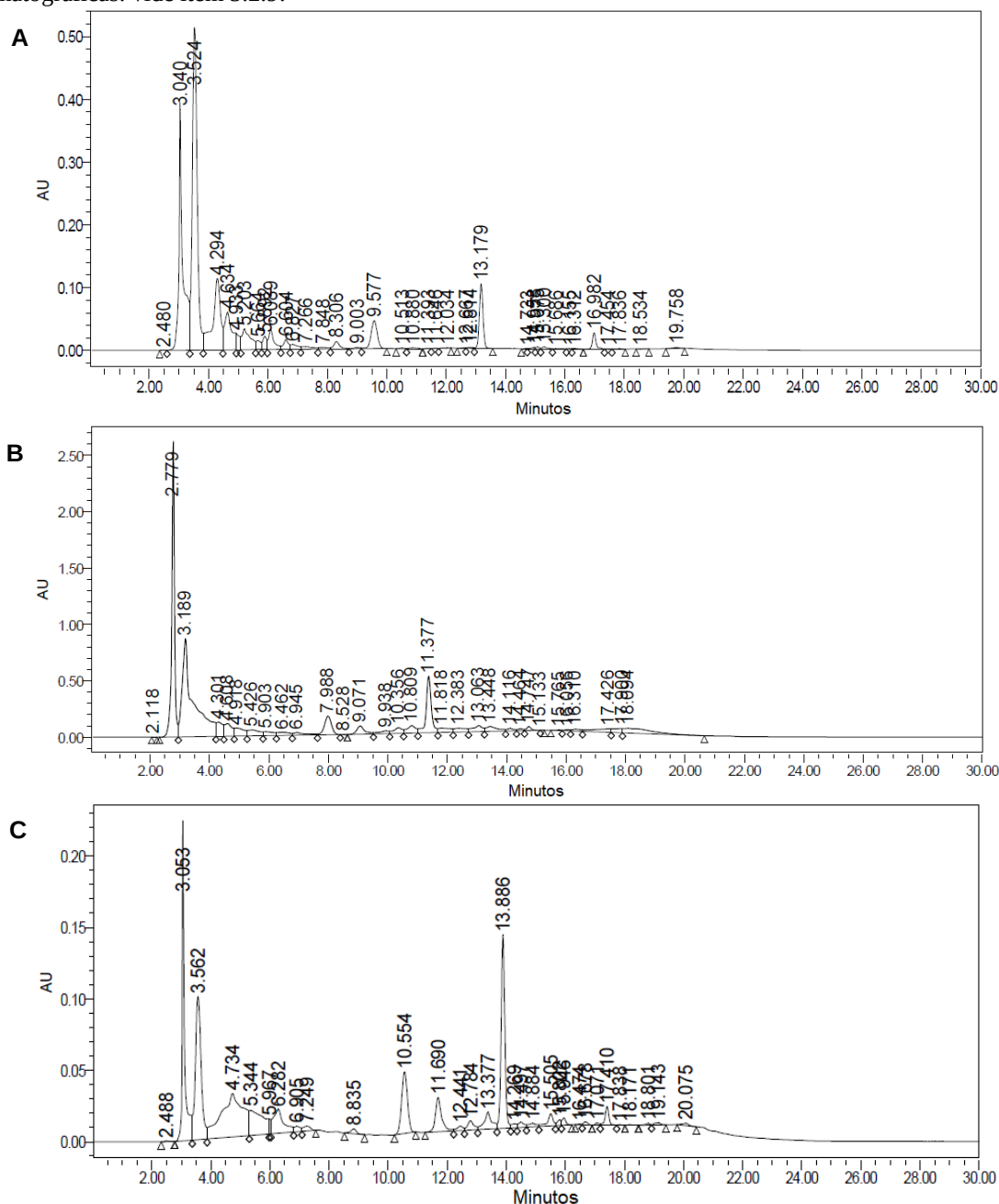


Uma curva-padrão analítica em CLAE foi utilizada para quantificar os flavonoides quercitrina e miricitrina no extrato etanólico otimizado EtOH R, obtendo-se, 0,22 mg/mL e 0,11 mg/mL, que correspondem a 1,34% e 0,65% dessas substâncias na droga vegetal, respectivamente.

A etapa seguinte à identificação dos flavonoides presentes na fração polar foi avaliar o perfil fitoquímico de um extrato obtido por infusão das folhas (chá), a fim de se estabelecer uma comparação com o extrato etanólico otimizado e fração polar obtida. Uma vez que a população utiliza tradicionalmente as folhas de espécies de *Campomanesia* como antidiarreicas e nos tratamentos de problemas estomacais, cistite e uretrites na forma de chás (D'ÁVILA, 1910; PIO CORRÊA, 1952). A análise qualitativa por CLAE demonstrou perfis químicos semelhantes do chá, comparados ao extrato e fração polar (**FIGURA 57**). Como já discutido anteriormente, alguns fatores interferem diretamente na eficiência da extração de substâncias fenólicas, como a temperatura aplicada, o tempo de extração, solvente orgânico utilizado e técnicas de extração

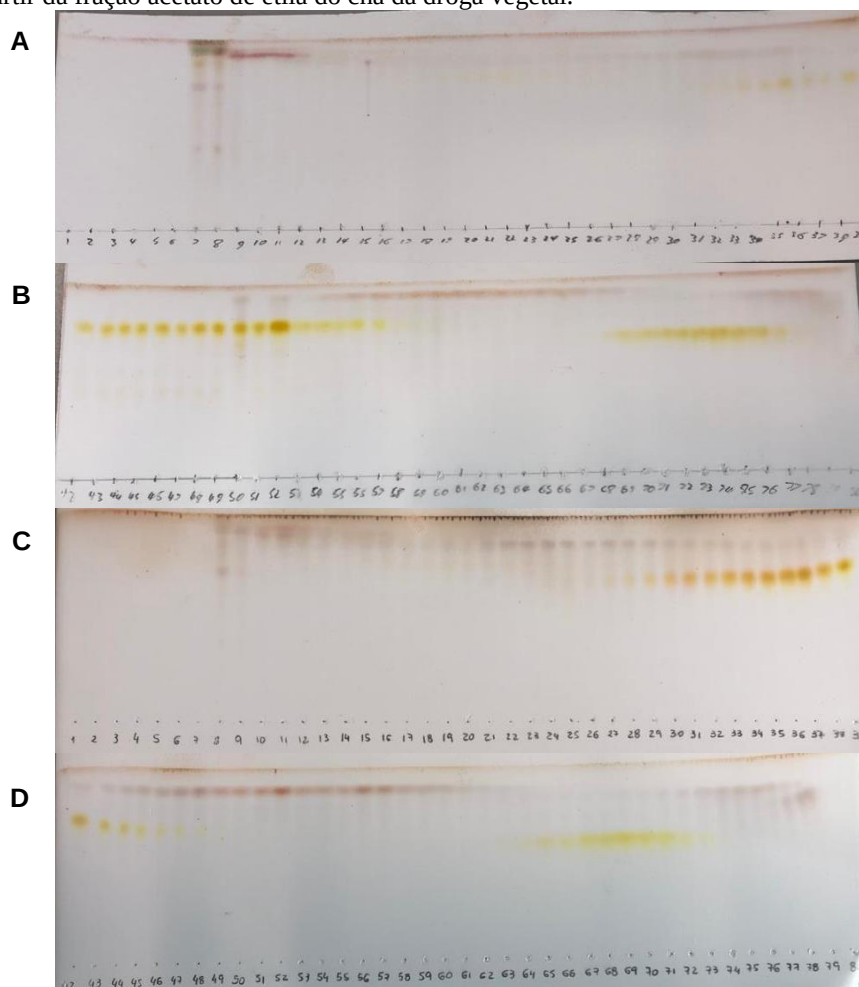
assistidas (BODOIRA *et al.*, 2017; CALEJA *et al.*, 2017; DUBA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015). É de se esperar que a extração em que se utiliza solventes orgânicos como o etanol concentre os constituintes fenólicos presentes na planta, fato este que justifica as maiores concentrações observadas no extrato etanólico otimizado, comparado ao chá e fração polar obtida por extração seletiva por HAMAg.

**FIGURA 57** – Perfil cromatográfico em CLAE (280 nm) das substâncias químicas presentes no chá da droga vegetal (A), extrato etanólico otimizado (B) e fração polar obtida a partir da extração seletiva por sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água 1:1:1:1 v/v (C) de *Campomanesia lineatifolia*. Condições cromatográficas: vide item 5.2.9.



Em seguida, realizou-se uma partição líquido-líquido do chá com acetato de etila, com o objetivo de concentrar as substâncias fenólicas presentes (WAGNER e BLADT, 2001). Seguindo o mesmo raciocínio realizado para a escolha do sistema bifásico para HSCCC da fração polar do extrato otimizado, a fração acetato de etila (Fr AcOEt/chá) foi solubilizada em sistema de solventes HAMAg, nas mesmas proporções testadas 1:1:1:1; 1:2:1:2; 1:3:1:3 e 1:4:1:4 v/v. Da mesma forma, o sistema HAMAg 1:4:1:4 v/v foi aquele mais eficiente em distribuir uniformemente os constituintes químicos em ambas as fases (polar e apolar) obtidas, sendo o escolhido para a análise em HSCCC. Como resultado da cromatografia, foram obtidas 80 frações, as quais foram analisadas em CCD, conforme demonstrado na **Figura 58**. É importante notar que nas placas de CCD da primeira e segunda corridas, os mesmos flavonoides isolados a partir da fração polar do extrato otimizado estão presentes (bandas amarelas).

**FIGURA 58** – Cromatografia em camada delgada das 80 frações obtidas em duas diferentes separações por HSCCC, a partir da fração acetato de etila do chá da droga vegetal.



Legenda: (A) eluição 1, frações 1 a 39; (B) corrida 1, frações 42 a 80; (C) eluição 2, frações 1 a 39; (D) eluição 2, frações 42 a 80. Eluição realizada em sistema de solventes Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v), seguida de revelação com ácido sulfúrico 10%. Vide item 5.2.3 para método de obtenção da fração acetato de etila.

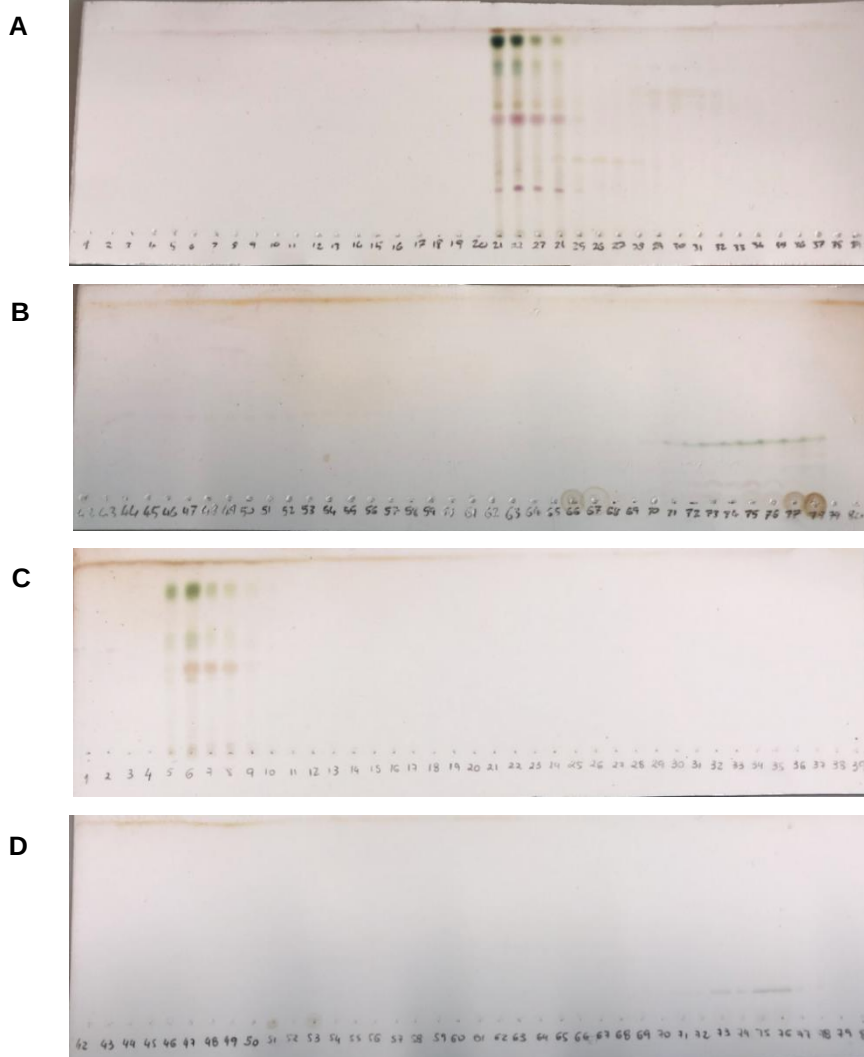
A partir da análise das CCD obtidas para as duas separações em HSCCC, as frações foram reunidas conforme similaridade de seus padrões de eluição e valores do fator de retenção (Rf), obtendo-se 9 frações, nomeadas de a - i. Dessas, aquelas que continham os dois flavonoides (frações “e” e “h”) foram submetidas, individualmente, ao fracionamento em cromatografia por exclusão molecular, utilizando-se coluna de Sephadex LH-20. Os flavonoides então isolados e purificados foram identificados pela análise de seus dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais e informações da literatura, e corresponderam aos mesmos já identificados na fração polar do extrato etanólico otimizado, quercitrina (purificada da fração “e”) e miricitrina (purificada da fração “h”).

Diversos estudos fitoquímicos descrevem a presença de substâncias fenólicas, dentre elas flavonoides, para o gênero *Campomanesia*. Em um estudo de triagem fitoquímica, Adati (2001) revelou a presença de taninos, flavonoides, saponinas e óleo essencial em folhas de *C. phaea* (O. Berg). Sant’Anna *et al.* (2017) demonstraram que o extrato aquoso das folhas de *C. xanthocarpa* apresenta quantidades expressivas de fenólicos, dentre eles flavonoides, com o isolamento e identificação de ácido clorogênico, ácido gálico, quercetina e teobromina. Catelan *et al.* (2018) identificaram a presença de três flavonoides glicosilados e um ácido ciclohexacarboxílico em extrato aquoso das folhas de *C. guazumifolia*: quercetina pentose, quercetina desoxihexosídeo, miricetina desoxihexosídeo e ácido quínico.

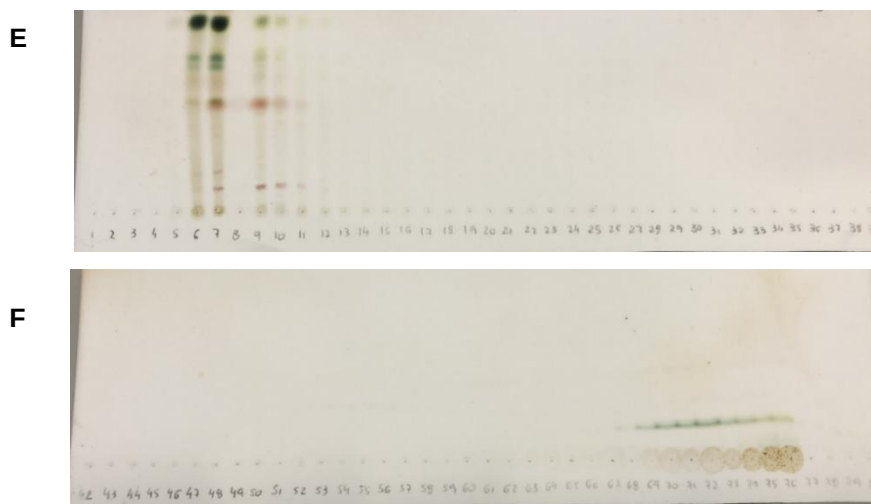
Neste estudo, a partir dos ensaios de coinjeção com padrões e resultados iniciais obtidas pela separação por HSCCC, foram identificados três flavonoides: catequina, quercitrina e miricitrina. Em estudo anterior de nosso grupo de pesquisa, Barbosa *et al.* (2009) isolaram e purificaram a catequina e quercitrina, por meio de fracionamento cromatográfico bioguiado da fração acetato de etila, obtida a partir do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*, o que reafirma a presença desses flavonoides identificados neste estudo. A presença do flavonol miricitrina é descrita em outras espécies de *Campomanesia*, como *C. velutina* (MICHEL *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2016); *C. adamantium* (FERREIRA *et al.*, 2013) e *C. pubescens* (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995). Nesse estudo, a miricitrina foi isolada e identificada pela primeira vez na espécie *C. lineatifolia*.

Em última etapa, a fração apolar obtida a partir da extração seletiva do EtOH R por sistema de solventes HAMAg foi submetida a três separações distintas de HSCCC, obtendo-se 80 frações/separação, as quais foram analisadas em CCD (**FIGURA 59**).

**FIGURA 59** – Cromatografia em camada delgada das 80 frações obtidas em três diferentes separações por HSCCC, a partir da fração apolar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



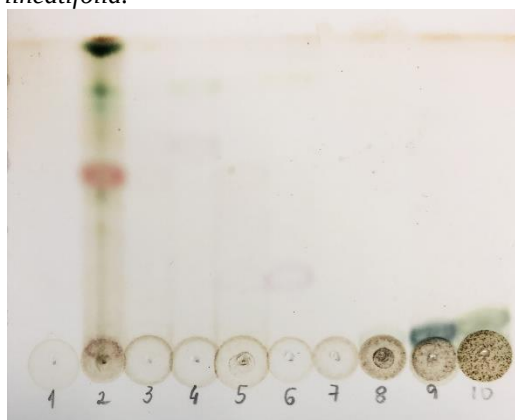
## Continuação Figura 59



Legenda: (A) HSCCC 1, frações 1-39; (B) frações 42-80; (C) HSCCC 2, frações 1-39; (D) frações 42-80; (E) HSCCC 3, frações 1-39 e (F) frações 42-80. Eluição realizada em sistema de solventes Clorofórmio: Metanol: Água (9:1:1, v/v), seguida de revelação com ácido sulfúrico 10%. Vide item 5.2.2 para método de obtenção da fração apolar do extrato.

A partir da análise das CCD obtidas para as três separações em HSCCC, as frações foram reunidas conforme similaridade de seus padrões de eluição e valores de  $R_f$ , obtendo-se 10 frações finais, conforme observado na **Figura 60**.

**FIGURA 60** – Cromatografia em camada delgada das frações reunidas obtidas por HSCCC, a partir da fração apolar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



Legenda: HSCCC = cromatografia em contracorrente de alta velocidade; EtOH R = extrato etanólico obtido em sistema contínuo de refluxo. Eluição realizada em sistema de solventes Clorofórmio: Metanol: Água (9:1:1, v/v), seguida de revelação com ácido sulfúrico 10%. Vide item 5.2.2 para método de obtenção da fração apolar do extrato.

É importante notar que as substâncias químicas presentes nas frações finais (7 – 10) ficaram retidas no ponto de origem da aplicação na placa de CCD. Isso pode ser justificado pelo fato dessas substâncias não apresentarem solubilidade adequada ao sistema de solventes apolar utilizado na eluição da CCD. Dessa forma, foi proposta a repetição da CCD para as frações 7 a

10, em sistema de solventes mais polar: Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v) (**FIGURA 61**).

**FIGURA 61** – Cromatografia em camada delgada das frações 7 a 10 obtidas por HSCCC, a partir da fração apolar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



Legenda: HSCCC = cromatografia em contracorrente de alta velocidade; EtOH R = extrato etanólico obtido em sistema contínuo de refluxo. Eluição em Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v).

As frações 8 e 9 foram analisadas por CLAE-ESI-MS e foi possível identificar um total de oito substâncias. Os tempos de retenção (Tr), peso molecular observado, fragmentos de cada substância química e suas respectivas identificações e classes de ambas as frações são apresentados na **Figura 62** e **Tabela 9**.

**FIGURA 62** – Cromatograma do pico base no modo positivo das frações 8 (**A**) e 9 (**B**) da fração apolar da extração seletiva do EtOH R de *Campomanesia lineatifolia* por sistema de solventes HAMAg em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para condições cromatográficas, vide item 5.2.11.

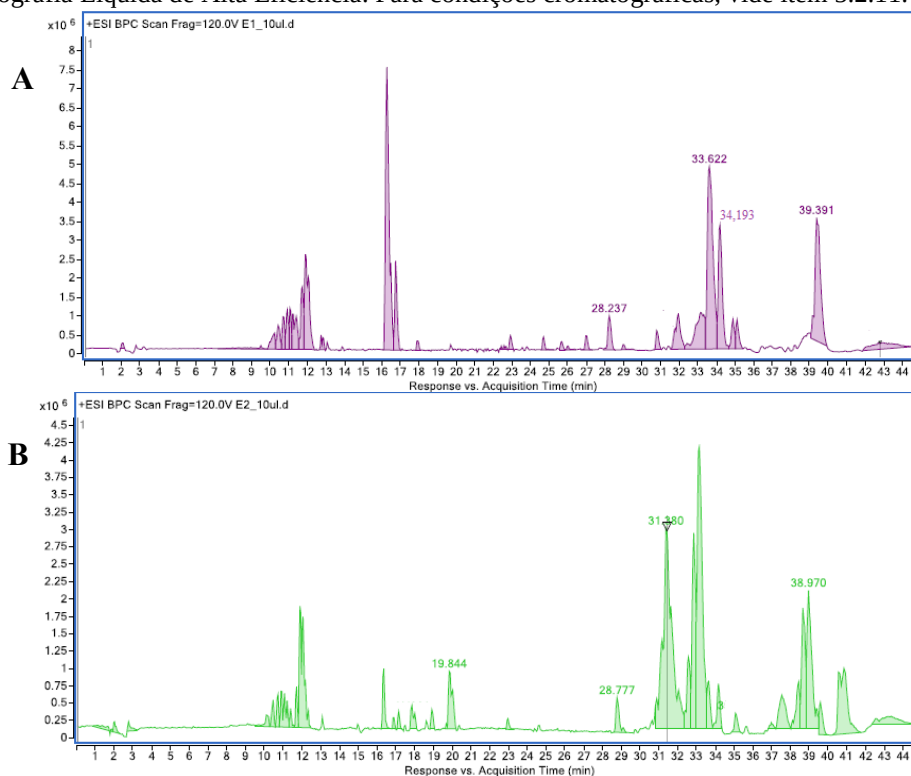
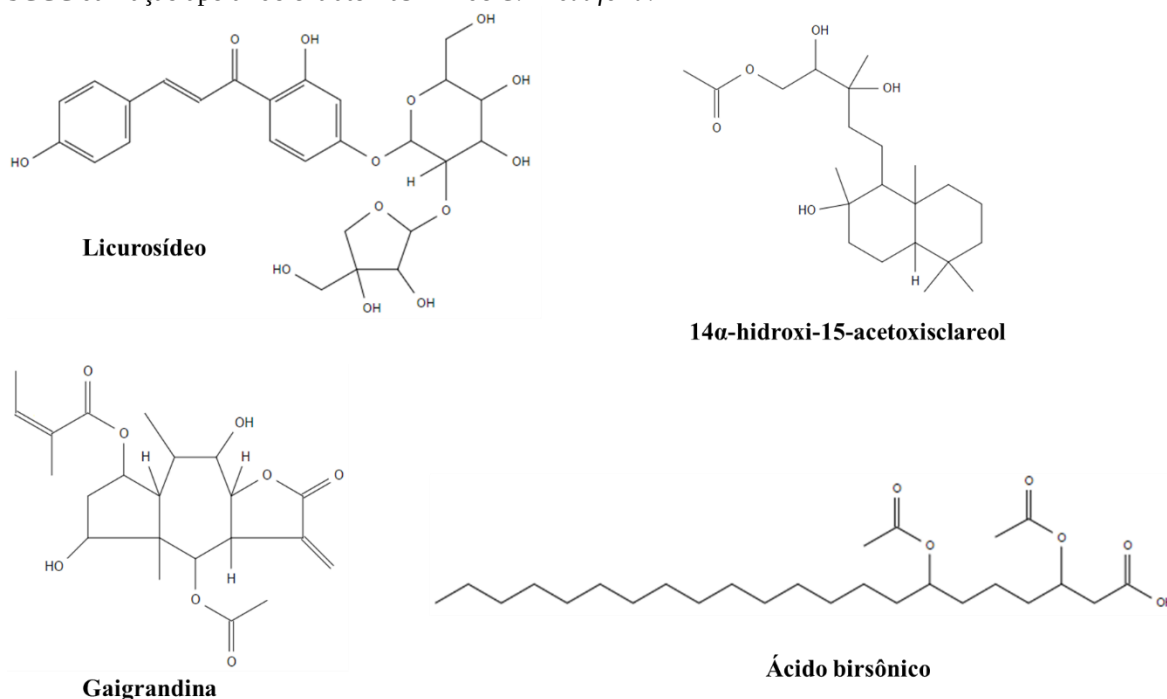


**Tabela 9** – Substâncias químicas identificadas a partir da espectrometria de massa por desreplicação utilizando CLAE-ESI-Q-TOF-EM a partir da fração apolar do extrato etanólico otimizado das folhas de *C. lineatifolia*. Para condições cromatográficas, vide item 5.2.11.

| Amostra  | Tr (min) | [M-H] <sup>-</sup> | [M+H] <sup>+</sup> | Fórmula molecular                               | Erro (ppm) | MS <sup>n</sup>                                                                                                                                                                                                           | Substância química                      | Classe             |
|----------|----------|--------------------|--------------------|-------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|
| Fração 8 | 28,237   | 549,1557           |                    | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub> | -          | MS <sup>1</sup> : -<br>MS <sup>2</sup> : 673, 519, 475, 381, 281, 269, 237, 215, 171, 137                                                                                                                                 | Licurosídeo                             | Chalcona           |
|          | 33,622   |                    | 385,2960           | C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>  | 2,99       | MS <sup>1</sup> : 429, 399, 364<br>MS <sup>2</sup> : 385                                                                                                                                                                  | 14 $\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol | Terpeno            |
|          | 34,193   |                    | 425,2173           | C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>  | 0,72       | MS <sup>1</sup> :<br>MS <sup>2</sup> : 365, 281, 253, 97                                                                                                                                                                  | Gaigrandina                             | Terpeno            |
|          | 39,391   |                    | 457,3554           | C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>  | 6,65       | MS <sup>1</sup> : 695, 501, 473, 435<br>MS <sup>2</sup> : 457                                                                                                                                                             | Ácido birsônico                         | Ácido graxo        |
| Fração 9 | 19,844   |                    | 317,1384           | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>  | 0,16       | MS <sup>1</sup> : 1191, 1086, 1058, 1032, 1004, 978, 917, 882, 820, 738, 631, 595, 533, 503, 474, 439, 413, 344, 302, 261, 211, 187, 165, 123, 81, 59<br>MS <sup>2</sup> : 707, 372, 288, 253, 214, 161, 135, 113, 84, 58 | Champanona D                            | $\beta$ -tricetona |
|          | 28,777   |                    | 473,3494           | C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>  | 0,34       | MS <sup>1</sup> : -<br>MS <sup>2</sup> : 849, 630, 458, 426, 388, 360, 309, 257, 221, 133, 109, 80                                                                                                                        | Ácido heptanoico                        | Ácido graxo        |
|          | 31,180   |                    | 507,3355           | C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub>  | 3,69       | MS <sup>1</sup> : 485, 463<br>MS <sup>2</sup> : 507                                                                                                                                                                       | Decumbesterona A                        | Esteróide          |
|          | 38,970   |                    | 545,4083           | C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub>  | 6,44       | MS <sup>1</sup> : 807, 782, 760, 669, 625, 589, 561<br>MS <sup>2</sup> : 545                                                                                                                                              | Criptocariol C                          | $\alpha$ -pirona   |

Como já discutido anteriormente, utilizando-se reagente de revelação contendo ácido sulfúrico nas placas de CCD, a formação de bandas de coloração rosa-violeta pode caracterizar a presença de terpenos. Ainda, a presença de bandas de coloração amarelada pode revelar a presença de chalconas e flavanonas glicosiladas (WAGNER e BLADT, 2001). Como pode ser observado na **Tabela 9**, na **fração 8** obtida a partir da separação por HSCCC da fração apolar do extrato EtOH R, foram identificadas uma chalcona (licurosídeo), dois terpenos (14 $\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol e gaigrandina), além de um ácido graxo (ácido birsônico). As estruturas químicas das substâncias identificadas nessa fração são mostradas na **Figura 63**.

**FIGURA 63** – Estruturas químicas das substâncias identificadas na fração 8 obtida a partir da separação por HSCCC da fração apolar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



A análise em CLAE-ESI-EM de primeira ordem para fração 8 exibiu o íon molecular precursor desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  549, podendo sugerir uma massa molecular de 550, com fórmula molecular de  $C_{26}H_{30}O_{13}$ . A fragmentação do íon precursor desprotonado produziu o íon de  $m/z$  237  $[M-132-162-H_2O-H]^-$  como resultado da clivagem das unidades de açúcares pentose (132 Da) e hexose (162 Da), somada à perda de uma molécula de água e um hidrogênio (ZHENG *et al.*, 2008). Sendo assim, segundo os padrões de fragmentação observadas e comparando-se aos dados de literatura e bancos de dados abertos (Metlin e MassBank), pode-se sugerir a presença da chalcona licurosídeo na espécie *C. lineatifolia*. O licurosídeo é frequentemente descrito em espécies de *Glycyrrhiza* (WANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2015), mas a presença de chalconas é descrita na literatura para espécies de *Campomanesia*, como *C. adamantium* (PAVAN *et al.*, 2009; LESCANO *et al.*, 2018), *C. pubescens* (CARDOSO *et al.*, 2013) e *C. reitziana* (NESELLO *et al.*, 2016).

Para o diterpeno labdano, 14α-hidroxi-15-acetoxisclareol, a análise em CLAE-ESI-MS de primeira ordem exibiu o íon molecular precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  385, podendo sugerir uma massa molecular de 384, com fórmula molecular de  $C_{22}H_{40}O_5$ . A fragmentação do íon precursor como aduto de sódio produziu o íon de  $m/z$  364  $[M-COH_3+Na^+]^+$ , como resultado da clivagem de um grupo acetila da cadeia lateral. A presença deste diterpeno labdano é descrita

em espécies de *Salvia*, família Lamiaceae (MORIDI FARIMANI e MIRAN, 2014; ASKARI *et al.*, 2021). Diterpenos labdanos são encontrados em várias outras espécies, como *Cistus incanus* e *C. creticus* (Cistaceae), *Viburnum suspensum* (Caprifoliaceae), *Juniperus procera* (Cupressaceae), *Premna oligotricha* (Verbenaceae), *Alpinia galanga* (Zingiberaceae), *Aframomum danielli* (Zingiberaceae), *Hedychium coronarium* (Zingiberaceae), *Nicotiana glutinosa* (Solanaceae), *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae), *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae), *Baccharis gaudichaudiana* (Compositae), *Phlomis younghusbandii* e *P. medicinalis* (Labiatae), com suas respectivas atividades biológicas bem descritas, o que mostra uma distribuição ampla em angiospermas (SINGH, PAL e SHARMA, 1999). Na composição química do óleo essencial obtido a partir de folhas e também em extratos de algumas espécies de *Campomanesia*, tais como *C. adamantium*, *C. phaea*, *C. aurea*, *C. guazumifolia*, *C. rhombea*, *C. xanthocarpa* e *C. lineatifolia*, foi demonstrado que estas espécies têm uma quantidade considerável de terpenos (LIMBERGER *et al.*, 2001; OSORIO *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2009; KLAFFE *et al.*, 2012; LORENÇONI *et al.*, 2020). Neste estudo, pode-se sugerir a presença do diterpeno tipo labdano 14 $\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol na espécie *C. lineatifolia* (Myrtaceae).

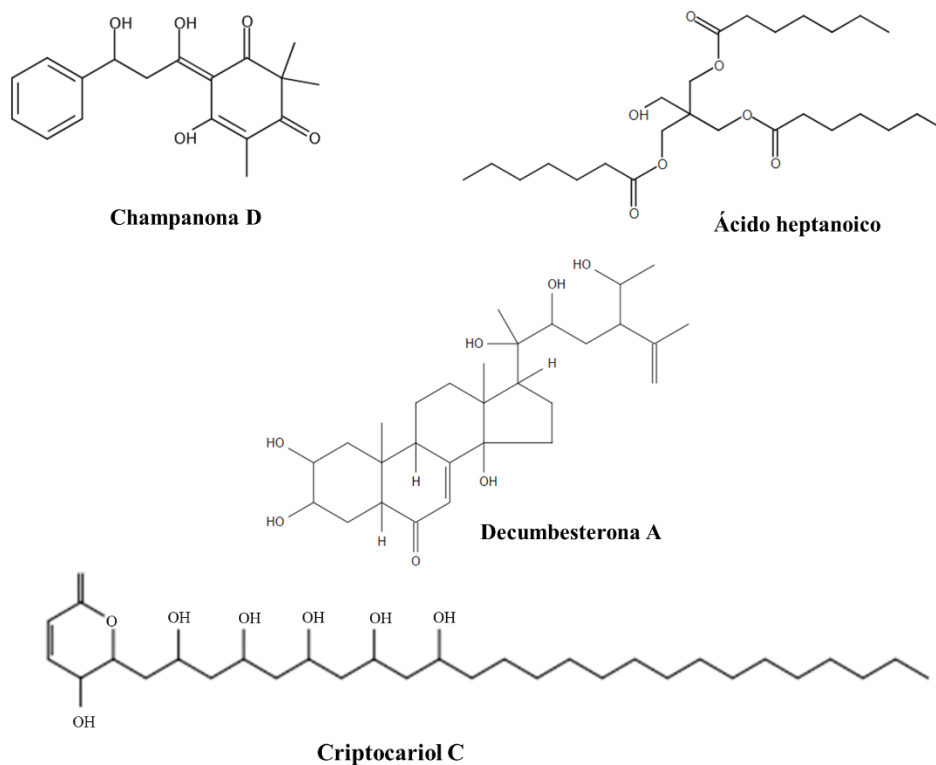
A lactona sesquiterpênica identificada na espécie *C. lineatifolia*, gaigrandina, exibiu o íon molecular precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  425 e, segundo os padrões de fragmentação observados e comparando-se aos dados de literatura (AHMED *et al.*, 2017), pode-se sugerir uma massa molecular de 424, com fórmula molecular de  $C_{22}H_{32}O_8$ . A fragmentação do íon precursor protonado produziu o íon  $Y_0$  de  $m/z$  365  $[M-COCH_3-H_2O+2H]^{2+}$ , como resultado da perda de um grupo acetila (43 Da) e uma molécula de água (18 Da). Outro fragmento de  $m/z$  281  $[Y_0-C_5H_7O-H]^+$  também pode ser observado como resultado da perda adicional do grupo angeloil (83 Da). Na sequência da fragmentação deste último íon, outro fragmento de  $m/z$  253 é observado  $[Y_0-C_5H_7O-C_2H_4]^+$ , como resultado da clivagem do grupo eteno terminal (28 Da). A gaigrandina (9-O-desacetilspatulina-2-O-angelato) foi isolada e identificada nas espécies *Helenium alternifolius* e *Gaillardia grandiflora*, ambas da família Asteraceae. Para estas espécies, foi demonstrada a relação das lactonas sesquiterpênicas com atividade gástrica citoprotetora, reafirmando o uso popular para tratamento de úlceras pépticas (GIORDANO *et al.*, 1990; WHAZIN, GATILOV e ADEKENEV, 1995). A presença de lactonas sesquiterpênicas é descrita em outras espécies de *Campomanesia*, tais como *C. adamantium*

(COUTINHO *et al.*, 2009) e *C. phaea* (LORENÇONI *et al.*, 2020) e, neste estudo, é sugerida a presença da gaigrandina na espécie *C. lineatifolia*.

Ácidos graxos são substâncias comumente encontradas nas plantas, tendo em vista sua participação em processos metabólitos primários (DEWICK, 2009). A análise em CLAE-ESI-MS de primeira ordem exibiu o íon molecular precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  457, podendo sugerir uma massa molecular de 456, com fórmula molecular de  $C_{26}H_{48}O_6$ . O padrão de fragmentação e as análises em bancos de dados sugerem a estrutura do ácido birsônico. Este ácido graxo é descrito na espécie *Byrsonima intermedia* (Malpighiaceae) (REIS *et al.*, 2007), planta esta utilizada tradicionalmente para tratar distúrbios gastrointestinais (SANTOS *et al.*, 2012).

Na **fração 9**, foram identificados uma  $\beta$ -tricetona (champanona D), um segundo ácido graxo (ácido heptanoico), um esteroide (decumbesterona A) e uma  $\alpha$ -pirona (criptocariol C). As estruturas químicas das substâncias nessa fração são mostradas na **Figura 64**.

**FIGURA 64** – Estruturas químicas das substâncias identificadas na fração 9 obtida a partir da separação por HSCCC da fração apolar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



A análise por CLAE-ESI-MS de primeira ordem exibiu o íon molecular precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  317, podendo sugerir uma massa molecular de 316, com fórmula molecular de

$C_{18}H_{20}O_5$ . A fragmentação do íon precursor protonado produziu o íon  $Y_0$  de  $m/z$  302  $[M-CH_3+H]^+$  como resultado da clivagem de um grupo metila (15 Da) e o fragmento de  $m/z$  261  $[Y_0-C_2H_2O+H]^+$ . Em  $MS^2$ , observa-se a presença de íon de  $m/z$  288  $[M-C_2H_4]^+$ , como resultado da clivagem do grupo eteno (28 Da). Todos esses fragmentos são característicos de unidades de  $\beta$ -tricetonas. Em um estudo de caracterização da composição química de extratos voláteis da polpa, cascas, folhas e sementes de *C. lineatifolia* (OSORIO *et al.*, 2006) foi demonstrada a presença de diversas substâncias que consistiram, principalmente, de terpenoides, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres,  $C_{13}$ -norisoprenoides, compostos furânicos e  $\beta$ -tricetonas, sendo esta última classe, detectada como constituintes majoritários em todos os extratos. As  $\beta$ -tricetonas identificadas nesse estudo incluíram o ácido sincárpico e champanonas A-F, confirmando a identificação da champanona D na espécie.

Como já descrito, ácidos graxos são substâncias comumente encontradas nas plantas, tendo em vista sua participação em processos metabólitos primários (DEWICK, 2009). A análise em CLAE-ESI-MS de primeira ordem exibiu o íon molecular precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  473, podendo sugerir uma massa molecular de 472, com fórmula molecular de  $C_{26}H_{48}O_7$ . A fragmentação  $MS^1$  do íon precursor protonado produziu o íon de  $m/z$  458  $[M-CH_3+H]^+$  como resultado da clivagem de um grupo metila (15 Da), um fragmento de  $m/z$  360  $[M-C_7H_{13}O+H]^+$ , como resultado da clivagem do grupo lateral acila (113 Da), outro fragmento de  $m/z$  133  $[M-3C_7H_{13}O]^+$ , característico de triacil graxos. A presença do ácido heptanoico é descrita na espécie *Acanthopanax brachypus* (Araliaceae), a qual é utilizada tradicionalmente na medicina chinesa para diversas patologias, inclusive úlcera gástrica (HU, HU e ZHENG, 2009; HU, ZHENG e HU, 2013). Neste estudo, sugere-se a presença de ácido heptanoico (pentaeritritil triheptanoato) na espécie de *C. lineatifolia*.

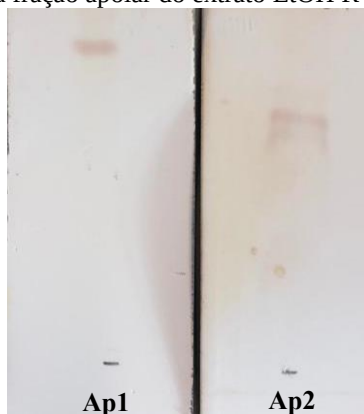
A presença do fitoecdisteroide decumbesterona A é descrita nas espécies *Ajuga decumbens* (Lamiaceae), *Aegiceras corniculatum* (Primulaceae) e *Cyathula officinalis* (Amaranthaceae) (TAKASAKI *et al.*, 1999; OKUZUMI *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2019). Estas espécies são tradicionalmente utilizadas na medicina para tratar condições inflamatórias, disenteria e distúrbios gastrintestinais, dentre outras afecções (TAKASAKI *et al.*, 1999; ISRAILI e LYOUSSEI, 2009). Neste estudo, a presença da decumbesterona A é sugerida na espécie *C. lineatifolia*, de acordo com o perfil de fragmentação em LC/MS observados e comparando-se em bancos de dados, conforme análise em CLAE-ESI-MS de primeira ordem, que exibiu o íon

molecular precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  507, podendo sugerir uma massa molecular de 506, com fórmula molecular de  $C_{29}H_{46}O_7$ . A fragmentação  $MS^1$  do íon precursor protonado produziu o íon de  $m/z$  463  $[M-CO_2+H]^+$  como resultado da clivagem do dióxido de carbono (44 Da), demonstrado a presença do grupo carbonila na molécula.

A  $\alpha$ -pirona, criptocariol C, exibiu o íon molecular precursor protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  545, podendo sugerir uma massa molecular de 544, com fórmula molecular de  $C_{30}H_{56}O_8$ . A presença do íon de  $m/z$  589 sugere a formação de um aduto de ácido fórmico com o íon molecular  $[M+CH_2O_2-H]^+$ . Criptocariols (A-H) são descritos em espécies de *Cryptocarya* (Lauraceae) e esses derivados de  $\alpha$ -pironas mostram atividades anti-inflamatórias importantes, além de potenciais moléculas supressoras de tumor (GRKOVIC *et al.*, 2011). De acordo com os padrões de fragmentação e comparação aos bancos de dados, é possível propor a presença do criptocariol C na espécie *C. lineatifolia*.

Objetivando-se o isolamento e a purificação das substâncias majoritárias presentes na fração 10, esta foi submetida a uma CCD em camada preparativa. Foram isoladas duas substâncias químicas (**FIGURA 65**), nomeadas **Ap1** e **Ap2**, mas em função da quantidade obtida em massa, apenas uma foi identificada (**Ap1**). Análise em CLAE-ESI-MS de primeira ordem exibiu o íon molecular precursor desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  265, podendo sugerir uma massa molecular de 266, com fórmula molecular de  $C_{15}H_{22}O_4$ . Ainda em  $MS^1$ , observou-se a presença de aduto de sódio (23 Da) e ácido fórmico (46 Da) com o íon molecular,  $m/z$  333  $[M+Na+CH_2O_2-H]^-$ , comum em ESI no modo negativo. A fragmentação  $MS^2$  do íon precursor produziu o íon  $Y_0^-$  de  $m/z$  165  $[M-C_5H_9O-CH_3]^-$  como resultado da clivagem do grupo lateral acila e outro grupo metila e o íon de  $m/z$  96  $[Y_0-C_4H_6O]^-$ , resultado da clivagem de um grupo dimetil ceteno, característicos de unidades de  $\beta$ -tricetonas (OSORIO *et al.*, 2006), estão de acordo com a substância **Ap1**, identificada como **(iso)leptospermona**. Como a amostra não estava pura, também foi identificada a miricitrina, já previamente demonstrada na fração polar.

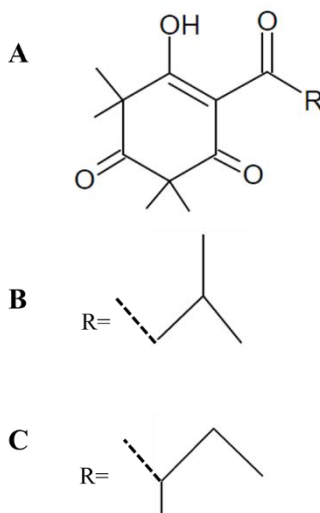
**FIGURA 65** – Cromatografia em camada delgada das substâncias químicas isoladas da fração 10 obtida a partir da fração apolar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



Eluição em Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:26, v/v).

Como já descrito anteriormente, Osorio *et al.* (2006) em um estudo de caracterização da composição química de extratos voláteis da polpa, cascas, folhas e sementes de *C. lineatifolia* demonstrou a presença de  $\beta$ -triketonas como constituintes majoritários em todos os extratos analisados. As  $\beta$ -triketonas são caracterizadas por apresentarem quatro substituintes metila em um anel de seis membros e uma cadeia lateral acila (**FIGURA 66A**) e, raramente, estão presentes em produtos naturais, sendo encontradas principalmente em árvores e arbustos da família Myrtaceae, particularmente, nos gêneros *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Xanthostemon*, *Darwinia*, *Backhousia*, *Baeckea*, *Calytrix* e *Melaleuca* (HELLYER 1968, GHISALBERTI 1996). A leptospermona (**FIGURA 66B**) é uma  $\beta$ -triketona derivada de um anel tetrametilado do floroglucinol e pode co-ocorrer com seu isômero isoleptospermona (**FIGURA 66C**) (VAN KLINK *et al.*, 1999) e, pela primeira vez, foi identificada neste estudo na espécie *C. lineatifolia*.

**FIGURA 66** – Estrutura química das  $\beta$ -triketonas (A): leptospermona (B) e isoleptospermona (C), identificadas na fração apolar do extrato etanólico otimizado das folhas de *C. lineatifolia*.



Finalizadas as análises fitoquímicas para as frações polar, apolar e chá, foi proposto um estudo de otimização da separação por HSCCC, de acordo com a metodologia adaptada de Kamto *et al.* (2017) para a identificação das substâncias fenólicas minoritárias presentes na fração polar do extrato etanólico. Utilizando-se uma combinação de modos de eluição isocrático e gradiente (**Tabela 10**), dezessete substâncias foram isoladas e dessas, oito identificadas por CLAE/EM, tendo em vista o rendimento em massa ter sido muito pequeno para a análise em RMN das outras nove substâncias.

**Tabela 10** – Descrição das condições cromatográficas em HSCCC e rendimentos de massa das frações obtidas a partir da fração polar do extrato etanólico de *Campomanesia lineatifolia*.

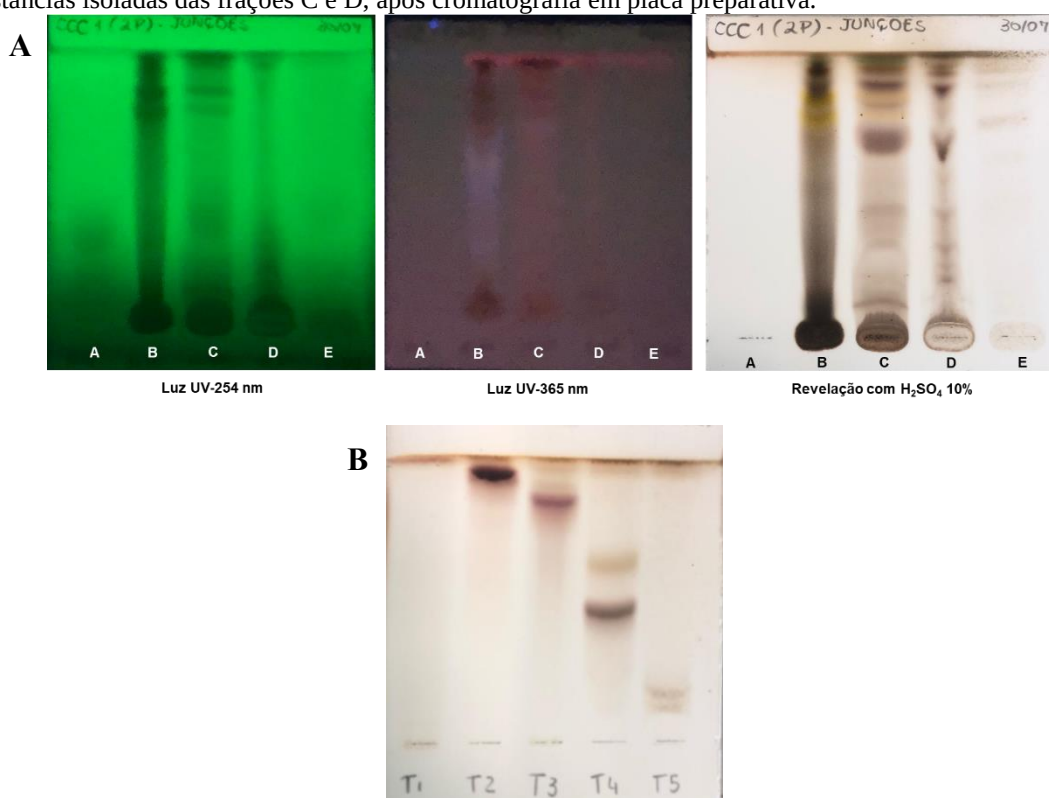
| Massa da amostra                  | Sistema de solventes                            | Fluxo (mL/min) | Modo de eluição/Fase da eluição | Retenção da fase estacionária (%) | Frações | Rendimento de massa (mg) |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------------------|
| Fração polar do EtOH R (1,9323 g) | Hex-EtOH-H <sub>2</sub> O (4:2:2)               | 4              | Isocrático/Fase reversa         | 75                                | A       | 0,4                      |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B       | 1,481                    |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | C       | 25,2                     |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | D       | 8,9                      |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | E       | 8,6                      |
| Fração B (1,481 g)                | AcOEt-H <sub>2</sub> O (1:1)                    | 4              | Isocrático/Fase reversa         | 70,6                              | B1      | 975,4                    |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B2      | 79,5                     |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B3      | 35,1                     |
| Fração B1 (975,4 mg)              | AcOEt- <i>n</i> -BuOH-H <sub>2</sub> O (X:Y:10) | 2              | Gradiente/Fase normal           | 70,6                              | B1a     | 0,7                      |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1b     | 1,0                      |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1c     | 5,2                      |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1d     | 8,8                      |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1e     | 130,7                    |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1f     | 10,9                     |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1g     | 10,5                     |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1h     | 11,8                     |
|                                   |                                                 |                |                                 |                                   | B1i     | 84,1                     |

Legenda: HSCCC = cromatografia em contracorrente de alta velocidade; EtOH R = extrato etanólico otimizado das folhas de *C. lineatifolia*; Hex = hexano; EtOH = etanol; H<sub>2</sub>O = água; AcOEt = acetato de etila; *n*-BuOH = *n*-butanol.

Primeiramente, a fração polar extrato EtOH R de *C. lineatifolia* foi fracionado por meio da HSCCC utilizando-se um sistema genérico de solventes, Hex-EtOH-H<sub>2</sub>O. Este sistema ternário de solventes é composto por dois solventes imiscíveis, hexano e água, os quais são, respectivamente, apolar e muito polar. O etanol atua como um modificador orgânico, o que torna esse sistema de solventes ideal para a separação de matrizes complexas (KAMTO *et al.*, 2017), neste caso, o extrato bruto de *C. lineatifolia*. A proporção selecionada do sistema (4:2:2) permitiu uma boa distribuição das substâncias polares e apolares presentes na fração do extrato nas fases inferior e superior, respectivamente, e a fase inferior foi usada no modo de eluição cabeça-cauda, em fase reversa, num fluxo de 4,0 mL/min. Foram coletadas 30 frações, as quais foram agrupadas conforme similaridade em CCD, resultando em cinco frações nomeadas de

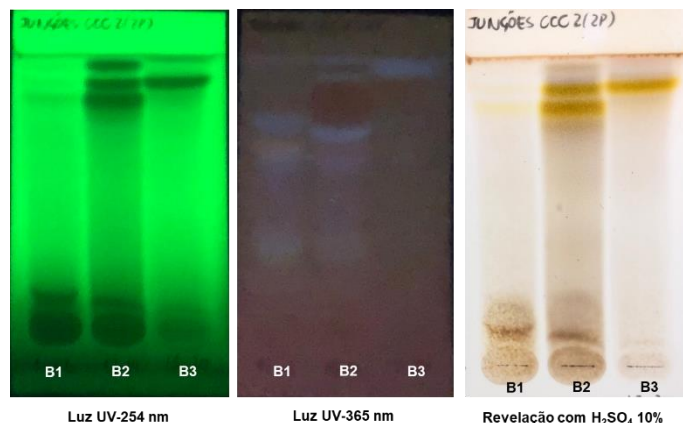
A–E. Como pode ser observado na **Figura 67A e Tabela 10**, a maioria das substâncias foram obtidas nas primeiras frações polares, B e C. A fração B foi submetida à nova separação, em modo isocrático (descrito a seguir) e as frações C e D agrupadas por similaridade e plotadas em cromatografia em placa preparativa. Como resultado da placa preparativa, foram isoladas quatro substâncias (**FIGURA 67B**) que, após revelação com ácido sulfúrico, apresentaram-se com coloração rosa-violeta, o que pode caracterizar a presença de terpenos glicosilados (WAGNER e BLADT, 2001). Tendo em vista o baixo rendimento obtido em massa dessas substâncias, as identificações não foram possíveis.

**FIGURA 67** – Cromatografia em camada delgada das cinco frações agrupadas (**A**), obtidas da fração polar do EtOH R, resultantes da CCC em sistema de solventes Hex-EtOH-H<sub>2</sub>O (4:2:2), em modo de eluição isocrático. (**B**) Substâncias isoladas das frações C e D, após cromatografia em placa preparativa.



Em sequência, a fração B foi fracionada utilizando-se o sistema de solventes EtOAc:H<sub>2</sub>O (1:1) em uma eluição isocrática. Foram coletadas 20 subfrações, as quais foram agrupadas conforme similaridade em CCD, resultando em três subfrações (B1-B3) (**FIGURA 68**). A subfração B1 foi submetida à nova separação, em modo gradiente (descrito a seguir) e as subfrações B2 e B3 foram purificadas em coluna de exclusão molecular (Sephadex LH-20).

**FIGURA 68** – Cromatografia em camada delgada das três subfrações B1, B2 e B3 agrupadas, obtidas da fração B do extrato EtOH R (fração polar) resultantes da CCC em sistema de solventes EtOAc-H<sub>2</sub>O (1:1), em modo de eluição isocrático.



A subfração B1 foi purificada utilizando-se o modo de eluição gradiente, em sistema de solventes AcOEt-*n*-BuOH-H<sub>2</sub>O nas proporções: (9,5:0,5:10), (9:1:10), (8,5:1,5:10), (8:2:10), (7,5:2,5:10), (7:3:10), (6,5:3,5:10), (6:4:10), (5,5:4,5:10) e (5:5:10). As 100 frações obtidas foram agrupadas conforme similaridade em CCD, obtendo-se 9 subfrações (B1a-B1i) (**FIGURA 69**).

**FIGURA 69** – Cromatografia em camada delgada das subfrações resultantes da purificação da subfração B1, obtidas da CCC em sistema de solventes AcOEt-*n*-BuOH-H<sub>2</sub>O (X:Y:10), em modo gradiente de eluição.



Com o objetivo de se purificar as substâncias fluorescentes presentes na CCD, as quatro últimas subfrações (B1f – B1i) foram submetidas à cromatografia em camada preparativa. Como resultado, cinco substâncias fluorescentes foram purificadas, mas, tendo em vista o baixo rendimento em massa obtido, não foi possível a identificação das mesmas.

As bandas amarelas observadas na CCD em B2 e B3 foram purificadas em Sephadex e submetidas à análise por CLAE/EM, confirmando a presença dos flavonoides miricitrina e quercitrina, já identificados previamente. Outras seis substâncias purificadas em Sephadex (provenientes das subfrações B2 e B3), foram identificadas e, seus respectivos tempos de

retenção (Tr), peso molecular observado, fragmentos de cada substância química e suas identificações e classes são apresentados na **Figura 70** e **Tabela 11**.

**FIGURA 70** – Cromatograma do pico base no modo negativo das subfrações B2 (A) e B3 (B) da fração polar da extração seletiva do EtOH R de *Campomanesia lineatifolia* por sistema de solventes HAMAg em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para condições cromatográficas, vide item 5.2.11.

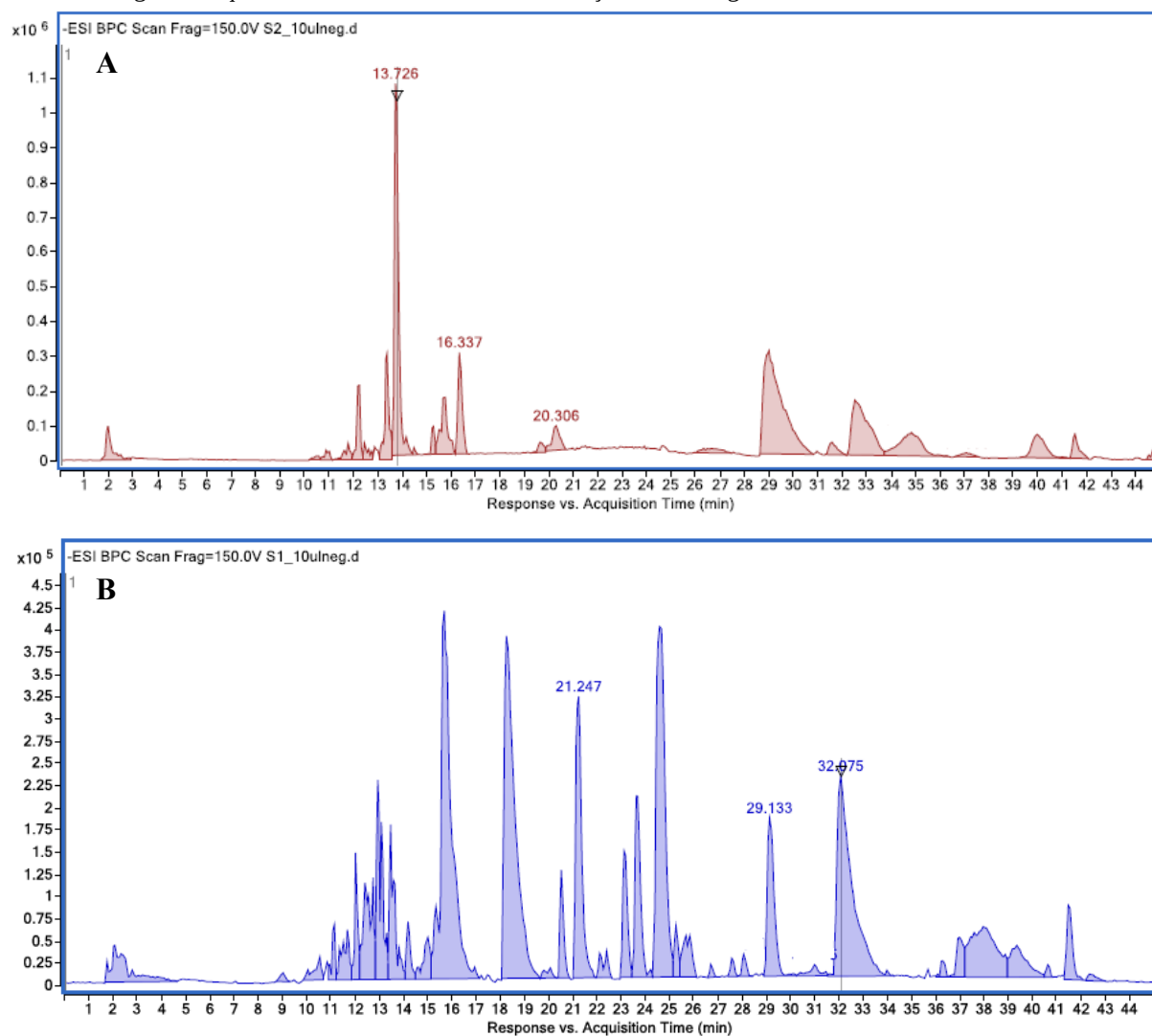
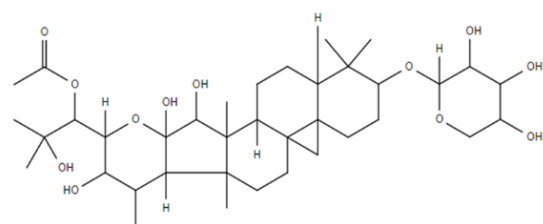


**Tabela 11** – Substâncias químicas identificadas a partir das frações obtidas de HSCCC em sistema de eluição isocrático e gradiente, da fração polar do extrato etanólico otimizado das folhas de *C. lineatifolia*.

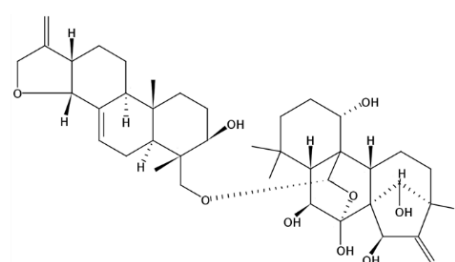
| Amostra | Tr (min) | [M – H] <sup>-</sup> | Fórmula molecular                               | Erro (ppm) | MS <sup>n</sup>                                                                                                                                                                                                           | Substância química                            | Classe      |
|---------|----------|----------------------|-------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------|
| B2      | 13,726   | 695, 4026            | C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> O <sub>12</sub> | 1,8        | MS <sup>1</sup> : 1137, 734, 712, 649, 487, 293<br>MS <sup>2</sup> : 649, 487, 207                                                                                                                                        | Hidroxi-acetil hidrosengmanol xilopiranosídeo | Terpeno     |
|         | 16,337   | 681,4066             | C <sub>40</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>  | -          | MS <sup>1</sup> : 833, 795, 766, 727, 704, 591, 537, 491, 429, 397, 355<br>MS <sup>2</sup> : 664, 635, 415, 397, 305, 283, 235, 179, 113, 89, 59                                                                          | Rubescensina M                                | Terpeno     |
|         | 21,183   | 317, 1384            | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>  | 0,16       | MS <sup>1</sup> : 1191, 1086, 1058, 1032, 1004, 978, 917, 882, 820, 738, 631, 595, 533, 503, 474, 439, 413, 344, 302, 261, 211, 187, 165, 123, 81, 59<br>MS <sup>2</sup> : 707, 372, 288, 253, 214, 161, 135, 113, 84, 58 | Champanona D                                  | Chalcona    |
| B3      | 21,247   | 675,3601             | C <sub>33</sub> H <sub>56</sub> O <sub>14</sub> | 0,55       | MS <sup>1</sup> : 1001, 966, 815, 789, 760, 721, 535, 495, 431, 397, 325, 299, 277<br>MS <sup>2</sup> : 968, 632, 542, 456, 415, 397, 361, 305, 277, 235, 209, 179, 125, 101, 71                                          | Gingerglicolípido A                           | Glicolípido |
|         | 29,133   | 681,3932             | C <sub>40</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>  | 3,8        | MS <sup>1</sup> : 833, 795, 766, 727, 704, 591, 537, 491, 429, 397, 355<br>MS <sup>2</sup> : 664, 635, 415, 397, 305, 283, 235, 179, 113, 89, 59                                                                          | Rubescensina M                                | Terpeno     |
|         | 32,075   | 265,1458             | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>  | 4,76       | MS <sup>1</sup> : 833, 695, 657, 553, 333, 297, 97<br>MS <sup>2</sup> : 165, 97, 80                                                                                                                                       | (iso)leptospermona                            | β-tricetona |

As substâncias champanona D e (iso)leptospermona foram identificadas anteriormente nas frações polar e apolar, respectivamente, e apresentaram semelhantes padrões de fragmentação, confirmando a presença dessas substâncias na espécie *C. lineatifolia*. As estruturas das outras substâncias identificadas são mostradas na **Figura 71**, a seguir.

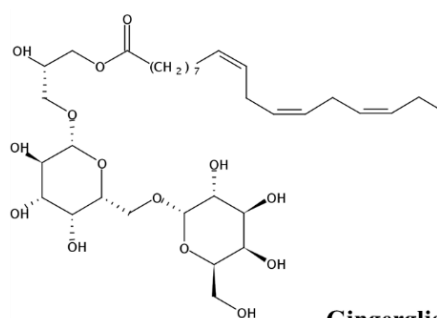
**FIGURA 71** – Estruturas químicas das substâncias identificadas nas frações B2 e B3 obtidas a partir da separação por HSCCC da fração polar do extrato EtOH R de *C. lineatifolia*.



**Hidroxi-acetilhidroshengmanol-xilopiranosídeo**



**Rubescensina M**



**Gingerglicolípido A**

A análise em CLAE-ESI-EM de primeira ordem da fração B2 exibiu o íon molecular precursor desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  695, podendo sugerir uma massa molecular de 696, com fórmula molecular de  $C_{37}H_{60}O_{12}$ . A fragmentação do íon precursor produziu o íon de  $m/z$  649  $[M-CH_3CO-3H]^-$  como resultado da clivagem de um grupo acetila lateral (43 Da). O triterpenoide tipo cicloartano, hidroxi-acetilhidroshengmanol-xilopiranosídeo é descrito na espécie *Cimicifuga acerina* (Ranunculaceae) (ZHANG *et al.*, 2001) e na família Myrtaceae, em *Eucalyptus sideroxylon* (OKBA, GEDAILY e ASHOUR, 2017). Para essas espécies, é descrito o uso na medicina tradicional para o tratamento condições inflamatórias, além de potencial agente antimicrobiano relacionado aos seus constituintes. Neste estudo, conforme padrões de fragmentações e dados da literatura e bancos de dados, sugere-se a presença do triterpeno hidroxi-acetilhidroshengmanol-xilopiranosídeo na espécie *C. lineatifolia*.

Para a rubescensina M, a análise em CLAE-ESI-EM de primeira ordem exibiu o íon molecular precursor desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  681, podendo sugerir uma massa molecular de 682, com fórmula molecular de  $C_{40}H_{58}O_9$ . O padrão de fragmentação observado em  $MS^2$  produziu dois íons, um de  $m/z$  de 397  $[M-C_{19}H_{27}O_2]^-$  e outro de  $m/z$  283  $[M-C_{21}H_{31}O_7-3H]^-$ , como resultado da clivagem da molécula em duas unidades diterpênicas, sugerindo ser um diterpeno tipo abietano, com padrão semelhante à rubescensina, como encontrado na espécie *Isodon rubescens*, família Lamiaceae (HAN *et al.*, 2004). Diterpenos do tipo abietano também são

descritos em outras espécies dessa mesma família, como em *Plectranthus barbatus* (falso-boldo ou boldo-brasileiro) e *Hyptis martiusii* (cidreira-brava), as quais são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de distúrbios gastrintestinais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2004; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Neste estudo, considerando os padrões de fragmentação e em comparação a bancos de dados e literatura, é sugerida a presença da rubescensina M na espécie *C. lineatifolia*.

Para o gingerglicolipídio A, a análise em CLAE-ESI-EM de primeira ordem exibiu o íon molecular precursor desprotonado  $[M-H]^-$  de  $m/z$  675, podendo sugerir uma massa molecular de 676, com fórmula molecular de  $C_{33}H_{56}O_{14}$ . A fragmentação do íon precursor produziu o íon de  $m/z$  325  $[M-CH_{18}H_{29}O-C_3H_6O_3]^-$  como resultado da clivagem da cadeia lateral lipídica ligada ao açúcar (350 Da). Em  $MS^2$ , a fragmentação do íon precursor produziu o íon  $Y_0$  de  $m/z$  415  $[M-CH_{18}H_{29}O]^-$  como resultado da clivagem da cadeia lateral acila. Outros fragmentos podem ser observados em  $m/z$  397  $[Y_0-H_2O]^-$  e  $m/z$  361  $[Y_0-2H_2O]^-$ , correspondendo a perdas sucessivas de moléculas de água. O gingerglicolipídio A é um dos três monoacildigalactosil gliceróis identificados no rizoma de espécies de *Zingiber* (Zingiberaceae), comumente referidos como “ginger”, apesar de ter sido também descrito nas folhas da espécie *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae), uma planta medicinal brasileira usada tradicionalmente como anti-inflamatória e *Capsicum annuum* (Solanaceae), também utilizada na medicina para este fim (GUEVARA *et al.*, 2021). Este glicolipídio tem sido associado como um dos princípios “estomáquicos” presentes no gengibre, com sua utilização no tratamento da úlcera gástrica (YOSHIKAWA *et al.*, 1994; PASSOS OLIVEIRA *et al.*, 2012) e, pela primeira vez, foi identificada na espécie *C. lineatifolia*.

## 5.4 Conclusão

Ensaio de injeção e coinjeção com padrões autênticos, análises cromatográficas e espectroscópicas permitiram identificar a presença dos flavonoides catequina, quercitrina e miricitrina, sendo esta última, descrita pela primeira vez na espécie *C. lineatifolia*.

Com a utilização das técnicas de HSCCC, cromatografia por exclusão molecular e cromatografia em camada delgada preparativa, na fração polar do extrato foi possível o isolamento e purificação de dois flavonoides, os quais foram posteriormente identificados como

sendo quercetrina e miricetrina, por técnicas de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , CLAE-ESI-EM e EM-EM. Para a fração apolar, a partir das mesmas técnicas, foi possível o isolamento de oito substâncias, identificadas como ácido birsônico,  $14\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol, gaigrandina, licurosídeo, decumbesterona A, ácido heptanoico, criptocariol C e champanona D. Além disso, a otimização da técnica por HSCCC permitiu o isolamento de dezessete substâncias, sendo cinco delas identificadas por técnicas de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , CLAE-ESI-EM e EM-EM como champanona D, (iso)leptospermona, hidroxi-acetilhidroshengmanol-xilopiranosídeo, rubescensina M e gingerglicolípido A.

Neste estudo, um total de quinze substâncias químicas foram identificadas na espécie *C. lineatifolia*, sendo doze delas inéditas para a espécie, o que pode contribuir para sua padronização químico-biológica e validar o seu uso tradicional como gastroprotetora e anti-úlceras gástricas.

## Referências

- ABLAJAN K, ABLIZ Z, SHANG XY, HE JM, ZHANG RP, SHI JG. (2006). Structural characterization of flavonol 3,7-di-*O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 41:352–360.
- ADATI, RT. Estudo biofarmacognóstico de *Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum, Myrtaceae. 2001, 125 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- AHMED, EF, ELKHATEEB, WA, TAIE, HAA, RATEB, ME, WALID, F. (2017). Biological capacity and chemical composition of secondary metabolites from representatives Japanese Lichens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 7 (01), pp. 098-103.
- ALBUQUERQUE, RL, KENTOPFF, MR, MACHADO, MIL, SILVA, MG, MATOS, FJA, MORAIS, SM, BRAZ-FILHO, R. (2007). Diterpenos tipo abietano isolados de *Plectranthus barbatus* Andrews. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 8, 1882-1886.
- ARAÚJO, MCPM, FERRAZ-FILHA, ZS, FERRARI, FC, SAÚDE-GUIMARÃES, DA. (2016). *Campomanesia velutina* leaves extracts exert hypouricemic effects through inhibition of xanthine oxidase and ameliorate inflammatory response triggered by MSU crystals. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26: 720–727.
- ASKARI SF, AVAN R, TAYARANI-NAJARAN Z, SAHEBKAR A, EGHBALI S. (2021). Iranian *Salvia* species: A phytochemical and pharmacological update. *Phytochemistry*. 183:112619.

- BARBOSA, J. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2009.
- BODOIRA, R, VELEZ, A, ANDREATTA, AE, MARTÍNEZ, M, MAESTRI, D. (2017). Extraction of bioactive compounds from sesame (*Sesamum indicum* L.) defatted seeds using water and ethanol under sub-critical conditions. *Food Chemistry*, 237, 114–120.
- BODOIRA, R, ROSSI, Y, MONTENEGRO, M, MAESTRI, D, VELEZ, A. (2017). Extraction of antioxidant polyphenolic compounds from peanut skin using water-ethanol at high pressure and temperature conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, 128, 57–65.
- CALEJA, C, BARROS, L, PRIETO, MA, BARREIRO OLIVEIRA, M.F, FERREIRA, ICFR. (2017). Extraction of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* L. by heat-, microwave- and ultrasound-assisted extraction techniques: A comparative study through response surface analysis. *Separation and Purification Technology*, 186, 297–308.
- CARDOSO, CAL, SALVADOR, MJ, CARVALHO, JE, COELHO, RG. (2013). Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 72(4): 309-315.
- CASTILLO-MUÑOZ, N, SERGIO GÓMEZ-ALONSO, S, GARCÍA-ROMERO, E, GÓMEZ, MV, VELDEERS, AH, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. (2009). Flavonol 3-O-Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (1), 209-219.
- CATELAN, TBS, SANTOS RADAI, JA, LEITÃO, MM, BRANQUINHO, LS, VASCONCELOS, PCP, HEREDIA-VIEIRA, SC, KASSUYA, CAL, CARDOSO, CAL. (2018). Evaluation of the toxicity and anti-inflammatory activities of the infusion of leaves of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg. *J Ethnopharmacol*. 15;226:132-142.
- COSTA, FN & LEITÃO, GG. (2010). Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science*, 33(3), 336–347.
- COSTA, FN & LEITÃO, GG. (2011). Evaluation of different solvent systems for the isolation of *Sparattosperma leucanthum* flavonoids by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(36), 6200–6205.
- COSTA-LOTUFO, LV, MORAES, MO, ARAÚJO, ECC, LIMA, MAS, MORAES, MEA. *et al.* (2004). Antiproliferative effects of abietane isolated from *Hyptis martiusii* (Labiatae). *Pharmazie*, v. 59, n. 1, p. 78–79.
- COUTINHO, I. D. *et al.* (2009). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [S.I.], v. 45, n. 4, p. 767-776.

- D'ÁVILLA, M. C. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul. *Faculdade Livre de Medicina e Pharmacia de Porto Alegre*, Porto Alegre, p. 155, 1910.
- DEWICK, PM. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, 3<sup>rd</sup> Edition. 508 p.
- DUBA, KS, CASAZZA, AA, MOHAMED, HB, PEREGO, P, FIORI, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: Experiments and modeling. *Food Bioproducts Processing*, 94, 29–38.
- FERREIRA, LC, GRABE-GUIMARÃES, A, DE PAULA, CA, MICHEL, MC, GUIMARÃES, RG, REZENDE, SA, DE SOUZA FILHO, JD, SAÚDE-GUIMARÃES, DA. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol*. Jan 9;145(1):100-8.
- FRIESEN, JB, MCALPINE, JB, CHEN, SN, PAULI, GF. (2015). Countercurrent separation of natural products: an update. *J. Nat. Prod.* 78, 1765–1796.
- FRIESEN, J.B. e PAULI, G.F. (2005). G.U.E.S.S. - A generally useful estimate of solvent systems for CCC. *J Liq Chromatogr Relat Technol.*; 28:2777–2806.
- GHISALBERTI EL. (1996). Bioactive acylphloroglucinol derivatives from Eucalyptus species. *Phytochemistry*. 41(1):7-22.
- GIORDANO OS, GUERREIRO E, PESTCHANKER MJ (1990). The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J Nat Prod* 53: 803-809.
- GRKOVIC T, BLEES JS, COLBURN NH, SCHMID T, THOMAS CL, HENRICH CJ, MCMAHON JB, GUSTAFSON KR. (2011). Cryptocaryols A-H,  $\alpha$ -pyrone-containing 1,3-polyols from *Cryptocarya* sp. implicated in stabilizing the tumor suppressor Pcd4. *J Nat Prod.* 27;74(5):1015-20.
- GUEVARA L, DOMÍNGUEZ-ANAYA MÁ, ORTIGOSA A, GONZÁLEZ-GORDO S, DÍAZ C, VICENTE F, CORPAS FJ, PÉREZ DEL PALACIO J, PALMA JM. (2021). Identification of Compounds with Potential Therapeutic Uses from Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fruits and Their Modulation by Nitric Oxide (NO). *Int J Mol Sci.* 25;22(9):4476.
- HAN, QB, LI, RT, ZHANG, JX, & SUN, HD. (2004). New ent-Abietanoids from *Isodon rubescens*. *Helvetica Chimica Acta*, 87(4), 1007–1015.
- HAN, QB, YU, T, LAI, F, ZHOU, Y, FENG, C, WANG, WN, FU, XH, LAU, CB, LUO, KQ, XU, HX, SUN, HD, FUNG, KP, LEUNG, PC. (2010). Quick identification of apoptosis inducer from *Isodon eriocalyx* by a drug discovery platform composed of analytical high-speed counter-current chromatography and the fluorescence-based caspase-3 biosensor detection. *Talanta*; 82:1521–1527.
- HELLYER, R. (1968). The occurrence of  $\beta$ -triketones in the steam-volatile oils of some myrtaceous Australian plants. *Australian Journal of Chemistry*, 21(11), 2825.

- HILBERT, G. et al. (2015). Flavonol profiles in berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. *Food Chemistry*, v.169, p.49-58.
- HONG, CO, LEE, HA, RHEE, CH, CHOUNG, SY, LEE, KW. (2013). Separation of the Antioxidant Compound Quercitrin from *Lindera obtusiloba* Blume and Its Antimelanogenic Effect on B16F10 Melanoma Cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 77, Issue 1, Pages 58–64.
- HU HS, HU HB, Zheng XD. (2009). [Study on chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil from *Acanthopanax brachypus*]. *Zhong Yao Cai*. 32(1):67-70. Chinese.
- HU HB, ZHENG XD, HU HS. (2013). Analysis of flavonoids from leaves of *Acanthopanax brachypus* harms. *J. Chil. Chem. Soc.*, 58, nº 1.
- ISRAILI, ZH, LYOUSSEI, B. (2009). Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 22 Issue 4, p425-462. 38p. 8 Diagrams, 5 Charts.
- KAMTO, ELD, CARVALHO, TSC, MBING, JN, MATENE, MCN, PEGNYEMB, DE, LEITÃO, GG. (2017). Alternating isocratic and step gradient elution high-speed counter-current chromatography for the isolation of minor phenolics from *Ormocarpum kirkii* bark. *Journal of Chromatography A*, 1480: 50–61.
- KLAFKE, JZ, ARNOLDI DA SILVA, M, FORTES ROSSATO, M, TREVISAN, G, BANDERÓ WALKER, CI, MARTINS LEAL, CA, OLSCHOWSKY BORGES, D, CHITOLINA SCHETINGER, MR, NOAL MORESCO, R, MEDEIROS FRESCURA DUARTE, MM, SOARES DOS SANTOS, AR, NAZÁRIO VIECILI, PR, FERREIRA, J. (2012). Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:954748.
- LEITÃO, GG. et al. (2017). Isolation of quinoline alkaloids from three *Choisya* species by high-speed countercurrent chromatography and the determination of their antioxidant capacity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 297–301.
- LEITE, A. C. et al. (2005). Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografias em contracorrente. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 983-985.
- LESCANO, C. H. et al. (2018). Effect of Polyphenols From *Campomanesia adamantium* on Platelet Aggregation and Inhibition of Cyclooxygenases: Molecular Docking and in Vitro Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 9:617, 1-13.
- LI, QM, CLAEYS, M. (1994). Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, 23, 406–416.
- LIMA E SILVA, MCB, BOGO, D, ALEXANDRINO, CAF, PERDOMO, RT, FIGUEIREDO, PO, DO PRADO, PR, GARCEZ, FR, KADRI, MCT, XIMENES, TVN, GUIMARÃES,

- RCA, SARMENTO, UC, MACEDO, MLR. (2018). Antiproliferative Activity of Extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and Isolated Compound Dimethylchalcone Against B16-F10 Murine Melanoma. *J Med Food*, Oct;21(10):1024-1034.
- LIMBERGER, R, APEL, M, SOBRAL, M, MORENO, P, HENRIQUES, A. (2001). Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 13, 113-115.
- LORENÇONI, MF, FIGUEIRA, MM, TOLEDO E SILVA, MV, PIMENTEL SCHMITT, EF, ENDRINGER, DC, SCHERER, R, BARTH, T, VILELA BERTOLUCCI, SK, FRONZA, M. (2020). Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *J Ethnopharmacology*. 24;252:112562.
- LIU, Y, FRIESEN, JB, MCALPINE, JB, PAULI, GF. (2015). Solvent System Selection Strategies in Countercurrent Separation. *Planta Med.*; 81(17):1582-1591.
- LUO H, HAO E, TAN D, WEI W, XIE J, FENG X, DU Z, HUANG C, BAI G, HOU Y, CHENG C, YI X, WANG Y, HOU X, DENG J. (2019). Apoptosis effect of *Aegiceras corniculatum* on human colorectal cancer via activation of FoxO signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 110861.
- MABRY, T, MARKHAM, KR., THOMAS, MB. The Systematic Identification of Flavonoids. *Springer-Verlag New York Inc.* 1970.
- MADALOSSO, R. C. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 2011.
- MARSTON, A, & HOSTETTMANN, K. (1994). Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *Journal of Chromatography A*, 658(2), 315–341.
- MARTINS, N, BARROS, L, DUEÑAS, M, SANTOS-BUELGA, C, & FERREIRA, ICFR. (2015). Characterization of phenolic compounds and antioxidant properties of *Glycyrrhiza glabra* L. rhizomes and roots. *RSC Advances*, 5(34), 26991–26997.
- MICHEL, MCP, GUIMARÃES, AG, PAULA, CA, REZENDE, SA, SOBRAL, MEG, GUIMARÃES, DAS. (2013). Extracts from the leaves of *Campomanesia velutina* inhibits production of LPS/INF- $\gamma$  induced inflammatory mediators in J774A.1 cells and exerts anti-inflammatory and antinociceptive effects in vivo. *Braz. J. Pharmacogn.* 23, 927–936.
- MOK, SY & LEE, S. (2013). Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* for. *albiflorum* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Food Chemistry*, 136:969-974.

- MORIDI FARIMANI, M, & MIRAN, M. (2014). Labdane diterpenoids from *Salvia reuterana*. *Phytochemistry*, 108, 264–269.
- NESELLO, LA, CAMPOS, A, WAGNER, T, FELICIANO, AS, DE CAMPOS BUZZI, F, FILHO, VC. (2016). Chemical Composition and Antinociceptive Potential of *Campomanesia reitziana* Fruits. *J Med Food*. May;19(5):518-20.
- OKBA, MM, EL GEDAILY, RA, & ASHOUR, RM. (2017). UPLC–PDA–ESI–qTOF-MS profiling and potent anti-HSV-II activity of *Eucalyptus sideroxylon* leaves. *Journal of Chromatography B*, 1068-1069, 335–342.
- OKUZUMI, K, HARA, N, UEKUSA, H & FUJIMOTO, Y. (2005). Structure elucidation of cyasterone stereoisomers isolated from *Cyathula officinalis*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(7), 1227.
- OSORIO, C. *et al.* (2006). Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 54, n. 2, p. 509-516.
- PASCOAL, AC, EHRENFRIED, CA, LOPEZ, BG, DE ARAUJO, TM, PASCOAL, VD, GILIOLI, R, ANHÊ, GF, RUIZ, AL, CARVALHO, JE, STEFANELLO, ME, SALVADOR, MJ. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules*. Feb 7;19 (2):1843-55.
- PASSOS OLIVEIRA, A, RATH, M, KUSTER, R, ROCHA, L, HAMBURGER, M, & POTTERAT, O. (2012). Metabolite Profiling of the Leaves of the Brazilian Folk Medicine *Sideroxylon obtusifolium*. *Planta Medica*, 78(07), 703–710.
- PAVAN, FR. *et al.* (2009). Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). *Química Nova* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 1222-1226.
- PENG, J. *et al.* (2005). Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1074, p. 111–115.
- PENG, A, LI, R, HU, J. *et al.* (2008). Flow rate gradient high-speed counter-current chromatography separation of five diterpenoids from *Triperygium wilfordii* and scale-up. *J Chromatogr A*;1200(2):129-135.
- PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Imprensa Nacional*, Rio de Janeiro, 1952.
- REIS, MG, DE FARIA, AD, DOS SANTOS, IA, MARIA DO CARMO, EA & MARSAIOLI, AJ. (2007). Byrsonic acid - the clue to floral mimicry involving oil-producing flowers and oil-collecting bees. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 1421- 1429.
- SALDANHA, LL, VILEGAS, W, & DOKKEDAL, AL. (2013). Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS(n) and HPLC-

- PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(7), 8402–8416.
- SANT'ANNA, LS, MERLUGO, L, EHLE, CS, LIMBERGER, J, FERNANDES, MB, SANTOS, MC, MENDEZ, ASL, PAULA, FR, MOREIRA, CM. (2017). Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2017:1591762.
- SANTIAGO, M, & STROBEL, S. (2013). Thin Layer Chromatography. Laboratory Methods in Enzymology. *Cell, Lipid and Carbohydrate*, 303–324.
- SANTOS RC, KUSHIMA H, RODRIGUES CM, SANNOMIYA M, ROCHA LR, BAUAB TM, TAMASHIRO J, VILEGAS W, HIRUMA-LIMA CA. (2012). *Byrsonima intermedia* A. Juss.: gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J Ethnopharmacol.* 27;140(2):203-12.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. (1995). Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia* [S.I.], v. 66, n. 4, p. 373-374.
- SINGH M, PAL M, SHARMA RP. (1999). Biological activity of the labdane diterpenes. *Planta Med.* 65(1):2-8.
- TAKASAKI, M, TOKUDA, H, NISHINO, H, KONOSHIMA, T. (1999). Cancer Chemopreventive Agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*. *J. Nat. Prod.* 62, 7, 972–975.
- VAN KLINK, JW, BROPHY, JJ, PERRY, NB, WEAVERS, RT. (1999).  $\beta$ -Triketones from Myrtaceae: Isoleptospermone from *Leptospermum scoparium* and Papuanone from *Corymbia dallachiana*. *J. Nat. Prod.* 62, 487– 489.
- VIHAKAS, M. Flavonoids and other phenolic compounds: characterization and interactions with lepidopteran and sawfly larvae. Doctoral thesis, 135 p. Laboratory of Organic Chemistry and Chemical Biology November 2014.
- WAGNER, H. & BLADT, S. Plant Drugs Analysis, a Thin Layer Chromatography. 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2001.
- WANG, Y, KONG, L, HU, L, LEI, X, YANG, L, CHOU, G, WANG, Z. (2007). Biological fingerprinting analysis of the traditional Chinese prescription Longdan Xiegan Decoction by on/off-line comprehensive two-dimensional biochromatography. *Journal of Chromatography B*, 860(2), 185–194.
- WANG, Y, YANG, L, HE, Y.-Q, WANG, C.-H, WELBECK, EW, BLIGH, SWA, & WANG, Z.-T. (2008). Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(12), 1767–1778.
- WHAZIN, KA, GATILOV, YB & ADEKENEV, SM. (1995). Gaigranin and gaigrandin — New sesquiterpene lactones from *Gaillardia grandiflora*. *Chem Nat Compd* 31, 63–67.

- XU, H, WANG, W, LIU, X, YUAN, F, & GAO, Y. (2015). Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products*, 76, 946–954.
- YANG, Z, WU, Y, & WU, S. (2016). A combination strategy for extraction and isolation of multi-component natural products by systematic two-phase solvent extraction- <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance pattern recognition and following conical counter-current chromatography separation: Podophyllotoxins and flavonoids from *Dysosma versipellis* (Hance) as examples. *Journal of Chromatography A*, 1431, 184–196.
- YOSHIKAWA, M, YAMAGUCHI, S, KUNIMI, K, MATSUDA, H, OKUNO, Y, YAMAHARA, J, & MURAKAMI, N. (1994). Stomachic Principles in Ginger. III. An Anti-ulcer Principle, 6-Gingesulfonic Acid, and Three Monoacyldigalactosylglycerols, Gingerglycolipids A, B, and C, from *Zingiberis Rhizoma* Originating in Taiwan. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42(6), 1226–1230.
- ZHANG QW, YE WC, CHE CT, ZHAO SX. (2001). [Cycloartane triterpenes and glycosides from *Cimicifuga acerina*]. *Yao Xue Xue Bao*. 36(4):287-91. Chinese.
- ZHENG, X, SHI, P, CHENG, Y, & QU, H. (2008). Rapid analysis of a Chinese herbal prescription by liquid chromatography–time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1206(2), 140–146.

---

## CAPÍTULO 6: ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

---

### 6.1 Introdução

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que os extratos e frações de folhas de *Campomanesia lineatifolia* protegem a mucosa gástrica em modelos experimentais de lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina (MADALOSSO *et al.*, 2012). Além deste resultado, foi demonstrado que os efeitos gastroprotetores parecem estar relacionados com as suas propriedades antioxidantes e seu conteúdo de polifenólicos. Num estudo de plantas medicinais brasileiras, Henriques *et al.* (2016) demonstraram atividade inibitória de extrato etanólico de *C. lineatifolia* para o TNF- $\alpha$ , em modelo *in vitro*. Embora vários estudos tenham mostrado que plantas e extratos/constituintes vegetais apresentem atividade anti-*H. pylori* e ação gastroprotetora, nos últimos anos, poucos trabalhos descreveram os efeitos de óleos essenciais específicos no crescimento e viabilidade da *H. pylori* (KORONA-GLOWNIAK *et al.*, 2020).

Considerando uma relação causal entre a úlcera gástrica e a infecção por *Helicobacter pylori*, foi proposto um estudo para se evidenciar se o óleo essencial de folhas de *C. lineatifolia* (OE) apresenta atividade anti-*Helicobacter pylori*. O objetivo deste estudo foi identificar a composição química do OE e avaliar a atividade anti-*H. pylori* (Capítulo 9), visando a utilização da planta como agente alternativo ou adjuvante da terapia atual para o tratamento das infecções por *H. pylori*. Tanto quanto se conhece na literatura, este estudo investiga, pela primeira vez, a composição química e sua relação com a atividade anti-*H. pylori* do óleo essencial de folhas de *C. lineatifolia*.

### 6.2 Materiais e Métodos

#### 6.2.1 Material vegetal

A coleta das folhas de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. foi realizada em fevereiro de 2020, em um remanescente de mata, no campus da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG (GPS 19° 52' 9.87'' S; 43° 58' 12.04'' W). O material vegetal foi identificado

pelo Dr. Marcos Sobral e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número BHCB 150606. O registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi realizado e tem o código A216C7C.

#### 6.2.2 Extração do óleo essencial

O OE foi extraído das folhas frescas de *C. lineatifolia* por hidrodestilação, utilizando-se um aparelho do tipo Clevenger. A extração foi efetuada durante 3 h, utilizando-se 143 g das folhas frescas e rasuradas em 1000 mL de água destilada. O OE obtido foi seco com sulfato de sódio anidro (Dinâmica Química Contemporânea Ltda), e concentrado sob pressão reduzida por rotaevaporador para evaporar a água. O óleo puro foi armazenado a -25°C até ser novamente analisado. O rendimento do óleo essencial foi de 0,5 mL.

#### 6.2.3 Análise do óleo essencial

Para a identificação dos constituintes químicos do OE utilizou-se um equipamento de cromatografia gasosa, acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). A análise em CG-EM foi realizada em triplicata, usando um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890N acoplado a um detector seletivo de massa 5975B (MSD; Agilent Technologies, EUA), operando a 70 eV numa faixa de massa de 35-500 u.m.a., com velocidade de varredura de 0,34 e equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (5% fenilmetilsiloxano; comprimento-30m, Diâmetro interno-0,25mm, Espessura do filme-0,25µm). A temperatura do forno foi elevada de 70°C para 290°C a uma taxa de aquecimento de 5°C/min e mantida isotérmica por 10 minutos; temperatura do injetor, 250°C; temperatura da interface, 300°C; gás Hélio carreador a 1,0 mL/min. Cada ml de óleo de amostra foi dissolvido em Et<sub>2</sub>O na proporção 1:1000 e injetado em modo de divisão pulsante. O fluxo foi de 1,5 mL/min durante os primeiros trinta segundos (0,50 min), depois modificado para 1,0 mL/min; razão de divisão (*Split ratio*) 40:1. A identificação dos constituintes foi baseada na comparação de seus índices de retenção linear (IR) relativos à série de *n*-hidrocarbonetos (C6-C40) calculados experimentalmente e respectivos dados de espectrometria de massas, ambos comparados àqueles da biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST), Wiley e dados da literatura.

### 6.3 Resultados e Discussão

A análise química em CG/EM do óleo essencial de *C. lineatifolia* mostrou a presença de oito substâncias que representaram 98,09% da composição total (**FIGURA 72**). As substâncias majoritárias identificadas foram, nessa ordem, o 3-hexen-1-ol (46,15%),  $\alpha$ -cadinol (20,35%), 1,1-dietoxietano (13,08%), e 2,3-diciano-7,7-dimetil-5,6-benzonorborenadieno (10,78%), seguidos pelo aromadendreno 2 (3,0%), e [3S-(3 $\alpha$ , 3 $\alpha\alpha$ , 6 $\alpha$ , 8 $\alpha\alpha$ )]-4,5,6,7,8,8a-hexahidro-3,7,7-trimetil-8-metileno-3H-3a,6-metanoazuleno (2,99%). Outras substâncias minoritárias como  $\alpha$ -bisabolol (0,94%) e  $\beta$ -curcumeno (0,8%) também foram detectadas no óleo (**TABELA 12**). As estruturas das substâncias químicas identificadas são apresentadas na **Figura 73**.

**FIGURA 72** – Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *C. lineatifolia*, em cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas.

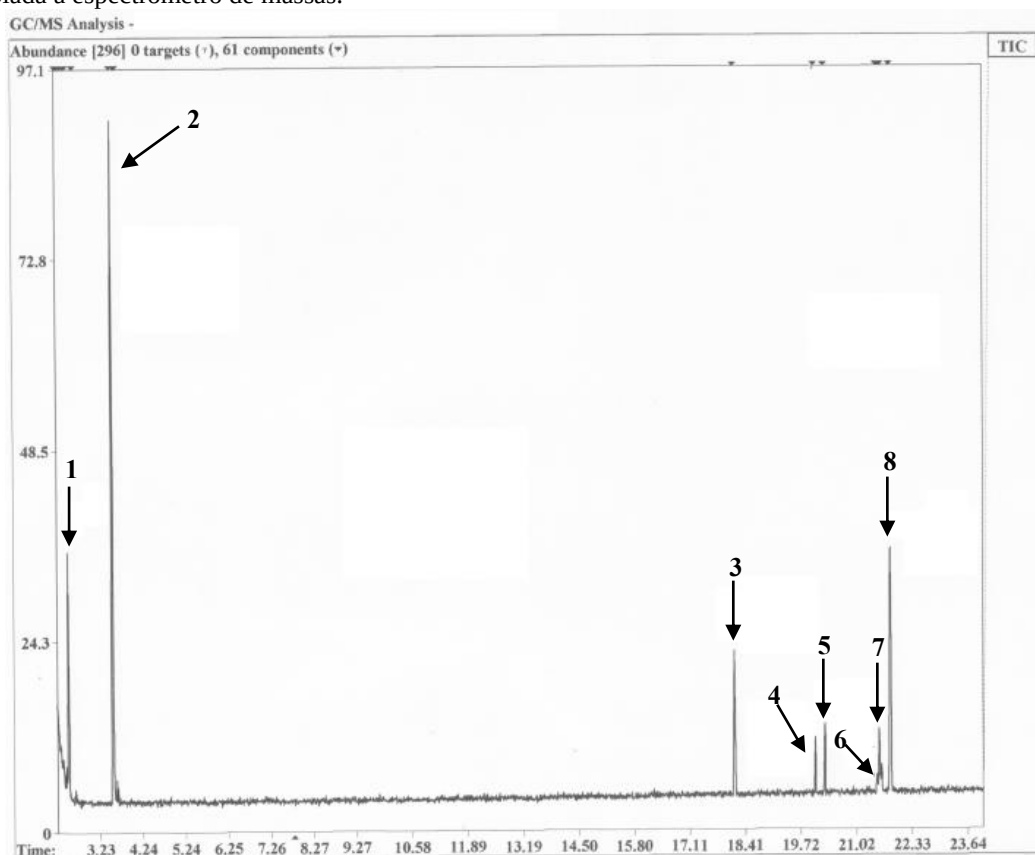
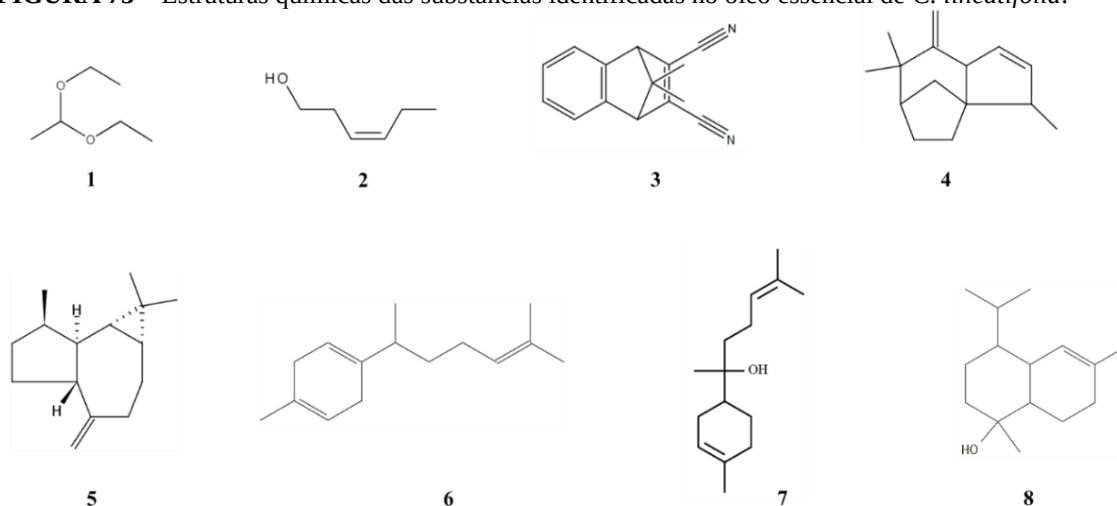


**Tabela 12** – Substâncias químicas identificadas no óleo essencial das folhas de *C. lineatifolia*.

| Substância química (pico)                                                                                                                       | Tr (min) | IR   | Massa molecular | Fórmula molecular                              | %     | MS                                             | ID                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|------|-----------------|------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1,1-dietoxietano ( <b>1</b> )                                                                                                                   | 2,483    | 718  | 118             | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | 13,08 | 103, 75, 73, 61, 47, 45, 43, 31, 29            | NIST + Willner, Granvogl e Schieberle (2013) |
| 3-hexen-1-ol ( <b>2</b> )                                                                                                                       | 3,523    | 850  | 100             | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O               | 46,15 | 82, 79, 72, 69, 67, 65, 57, 55, 53, 51, 41, 39 | NIST + Marongiu <i>et al.</i> (2001)         |
| 2,3-diciano-7,7-dimetil-5,6-benzonorbornadieno ( <b>3</b> )                                                                                     | 18,158   | 1506 | 220             | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> | 10,78 | 223, 221, 207, 206, 205                        | Wiley                                        |
| [3S-(3 $\alpha$ , 3a $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 8a $\alpha$ )]-4,5,6,7,8,8a-hexahidro-3,7,7-trimetil-8-metileno-3H-3a,6-metanoazuleno ( <b>4</b> ) | 20,044   | 1586 | 202             | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>                | 2,99  | 187, 159, 145, 131, 119, 105, 91, 77           | Fragmentação em GC/MS, Kang e Monti (1984)   |
| Aromadendreno ( <b>5</b> )                                                                                                                      | 20,275   | 1596 | 204             | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 3,0   | 161, 133, 119, 105, 93, 91, 81, 79             | NIST + Maghsoodlou <i>et al.</i> , 2015      |
| $\beta$ -curcumeno ( <b>6</b> )                                                                                                                 | 21,547   | 1652 | 204             | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 0,8   | 161, 119, 105, 93, 81, 55, 41                  | Wiley + Lucero, Estell e Fredrickson, 2003   |
| $\alpha$ -bisabolol ( <b>7</b> )                                                                                                                | 21,555   | 1652 | 222             | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 0,94  | 204, 161, 119, 105, 93, 69, 41                 | NIST + Zheng <i>et al.</i> , 2004            |
| $\alpha$ -cadinol ( <b>8</b> )                                                                                                                  | 21,809   | 1664 | 222             | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 20,35 | 204, 189, 161, 134, 121, 109, 105, 95, 81, 71  | NIST + Yu <i>et al.</i> (2004)               |

Tr, tempo de retenção; IR, Índice de Retenção; %, percentual relativo obtido a partir da área do pico; MS, fragmentos do espectro de massas. ID, identificação proposta conforme espectro de massas comparado à biblioteca NIST ou Wiley / literatura e índice de retenção de acordo com a literatura.

**FIGURA 73** – Estruturas químicas das substâncias identificadas no óleo essencial de *C. lineatifolia*.

A análise da composição química do óleo essencial das folhas de *C. lineatifolia* consistiu principalmente de um álcool, um éter e sesquiterpenos, como constituintes majoritários. Osorio

*et al.* (2006) demonstraram que a presença de álcoois foi predominantemente caracterizada no extrato volátil das folhas de *C. lineatifolia*, dentre eles o (*Z*)-3-hexenol como um dos constituintes majoritários. Ainda, os sesquiterpenos cadinanos,  $\beta$ -cadinol,  $\gamma$ -cadinol e  $\delta$ -cadinol também foram identificados. De maneira semelhante, neste estudo, o álcool 3-hexen-1-ol (**2**) correspondeu à substância majoritária do óleo essencial e o sesquiterpeno cadinano, o  $\alpha$ -cadinol (**8**), foi identificado na espécie.

A análise fitoquímica das folhas de goiabeira, *Psidium guajava* (Myrtaceae), da mesma família da espécie *C. lineatifolia*, registra a presença do acetal 1,1-dietoxietano (**1**), como um dos constituintes que conferem aroma de frutas (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Neste estudo, a presença deste acetal é descrito pela primeira vez na espécie.

A substância **3**, 2,3-diciano-7,7-dimetil-5,6-benzonorborenadieno, é descrita em um estudo da composição química de óleos essenciais isolados das espécies *Mentha microphylla* (Labiatae) e *Lantana camara* (Verbenaceae) (ABDELGALEIL, 2006), com atividades inseticidas e fungicidas relacionadas. Neste estudo, a presença deste sesquiterpeno é descrita pela primeira vez na espécie *C. lineatifolia*.

[3S-(3 $\alpha$ ,3 $\alpha\alpha$ ,6 $\alpha$ ,8 $\alpha\alpha$ )]-4,5,6,7,8,8a-hexahidro-3,7,7-trimetil-8-metileno-3H-3a,6-metanoazuleno (**4**) apresentou perfil de fragmentação idêntico ao derivado dieno do sesquiterpeno zizanol, encontrado na espécie *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, sin. *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae) (KANG e MONTI, 1984). O óleo de vetiver é comumente utilizado na indústria de perfumes e como agente flavorizante na indústria alimentícia (MARTINEZ *et al.*, 2004). Além de seu aroma especial, são descritas atividades antioxidantes (LUQMAN *et al.*, 2009), antibacterianas (LUQMAN *et al.*, 2005) e anti-inflamatórias (BALASANKAR *et al.*, 2013). Neste estudo, a presença desta substância é descrita pela primeira vez na espécie *C. lineatifolia*.

Aromadendreno (**5**) é descrito em várias espécies da família Myrtaceae, como em *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae) (MAGHSOODLOU *et al.*, 2015; YANGUI *et al.*, 2017), *Psidium guajava* (ELIZALDE-GONZÁLEZ *et al.*, 2020) e *Lophomyrtus* sp. (WOOLLARD *et al.*, 2008). Mulyaningsih *et al.* (2010) identificaram que o aromadendreno aparentemente contribui significativamente para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. globulus*,

marcadamente em bactérias multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE), além de atividade contra a bactéria gram-negativa *Acinetobacter baumannii*, demonstrando o potencial desta substância para testes contra *H. pylori*. Neste estudo, a presença deste sequisterpeno foi descrita pela primeira vez na espécie *C. lineatifolia*.

O  $\beta$ -curcumeno (**6**) é identificado como sendo um dos constituintes majoritários no óleo essencial de rizomas de *Curcuma amada* e *C. longa* (Zingiberaceae) (SRIVASTAVA, SRIVASTAVA e SHAH, 2001; BRASIL, 2015). A *Curcuma* sp. é utilizada tradicionalmente para tratamento de várias doenças intestinais, febre e icterícia (JAIN, 1995) e sua atividade anti-*H. pylori* tem sido descrita (ZAIDI *et al.*, 2009; KOOSIRIRAT *et al.*, 2010). Na família Myrtaceae, o  $\gamma$ -curcumeno é descrito no óleo essencial das folhas de *Eucalyptus microtheca* (MAGHSOODLOU *et al.*, 2015) e  $\beta$ -curcumeno, na espécie *Myrcia sylvatica* (SILVA *et al.*, 2016). Neste estudo, a presença do sesquiterpeno  $\beta$ -curcumeno é descrita pela primeira vez na espécie *C. lineatifolia*.

O sesquiterpeno  $\alpha$ -bisabolol (**7**) é descrito na espécie *Plinia cerrocampanensis* (Myrtaceae) como sendo o constituinte majoritário no óleo essencial obtido das folhas, com potente atividade anti-*H. pylori* (VILA *et al.*, 2010). Brehm-Stecher e Johnson (2003) descrevem que o bisabolol é capaz de aumentar a permeabilidade bacteriana e, consequentemente, a suscetibilidade a antibióticos de importância na clínica. Em espécies de *Psidium* (Myrtaceae), a presença deste sesquiterpeno nos óleos essenciais também é descrita (DIAS *et al.*, 2018). Neste estudo, a presença do sesquiterpeno  $\alpha$ -bisabolol é descrita pela primeira vez na espécie *C. lineatifolia*.

#### 6.4 Conclusões

Por meio das análises em CG/EM, foi possível a identificação de oito substâncias químicas no óleo essencial obtido das folhas de *C. lineatifolia*, que representaram 98,09% da composição total. As substâncias químicas identificadas neste estudo apresentam dados consistentes na literatura que orientam a condução dos ensaios de atividade anti-*H. pylori*, demonstrando o seu potencial para o tratamento de úlceras gástricas associadas à infecção por essa bactéria.

## Referências

- ABDELGALEIL, SAM. (2006). Chemical composition, insecticidal and fungicidal activities of essential oils isolated from *Mentha microphylla* and *Lantana camara* growing in Egypt. *Alex. Sci. Exch. J.* 27 (2006), pp. 18-28.
- BALASANKAR, D, VANILARASU, K, PREETHA, PS, UMADEVI, RM, BHOWMIK, D. (2013). Traditional and Medicinal Uses of *Vetiver*. *J. Med. Plants Stud.* 1, 191–200.
- BRASIL. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Curcuma longa* L. (CURCUMA). Brasília: Ministério da Saúde e Anvisa, 2015. 151 p.
- BREHM-STECHER BF, JOHNSON EA. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother.*;47(10):3357-60.
- CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, G.F.; ANDRADE, C.H.S. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 209p.
- DIAS, ALB, BATISTA, HRF, ESTEVAM, EBB, ALVES, CCF, FORIM, MR, NICOLELLA, HD, FURTADO, RA, TAVARES, DC, SILVA, TS, MARTINS, CHG, MIRANDA, MLD. (2018). Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae). *Natural Product Research*, 1–5.
- ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P., GARCÍA-DÍAZ, E., TREJO, R., TAFOYA, F., & ARAGÓN-GARCÍA, A. (2020). Profile of terpenoid compounds mediating a plant-herbivore interaction: screening by Static Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography/QToF-Mass Spectrometry. *Chemistry & Biodiversity*.
- HENRIQUES, BO. *et al.* (2016). In Vitro TNF- $\alpha$  Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron adstringens* in an Acute Arthritis Model. *Evid Based Complement Alternat Med.*, v. 2016, Article ID 9872598, 15 pages.
- JAIN, SK. (1995). Ethnobotanical diversity in zingibers of India. *Ethnobotany*, 7, 83-88.
- KANG, SH & MONTI, SA. (1984). Revised structure of zizanol. *The Journal of Organic Chemistry*, 49(20), 3830–3832.
- KOOSIRIRAT C, LINPISARN S, CHANGSOM D, CHAWANSUNTATI K, WIPASA J. (2010). Investigation of the anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* in *Helicobacter pylori*-infected patients. *International immunopharmacology*. 10: 815–818.
- KORONA-GLOWNIAK, I, GLOWNIAK-LIPA, A, LUDWICZUK, A, BAJ, T., MALM, A. (2020). The In Vitro Activity of Essential Oils against *Helicobacter Pylori* Growth and Urease Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(3), 586.

- LUCERO, ME, ESTELL, RE, & FREDRICKSON, EL. (2003). The Essential Oil Composition of *Psoralea scoparius* (A. Gray) Rydb. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2), 108–111.
- LUQMAN, S, KUMAR, R, KAUSHIK, S, SRIVASTAVA, S, DAROKAR, MP, KHANUJA, SPS. (2009). Antioxidant potential of the root of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46, 122–125. 5.
- LUQMAN, S, SRIVASTAVA, S, DAROKAR, MP, KHANUJA, PS. (2005). Detection of antibacterial activity in spent roots of two genotypes of aromatic grass *Vetiveria zizanioides*. *Pharm. Biol.* 43, 732–736.
- MADALOSSO, RC. *et al.* (2012). *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 772-779.
- MAGHSOODLOU MT, KAZEMIPOOR N, VALIZADEH J, FALAK NEZHAD SEIFI M, RAHNESHAN N. (2015). Essential oil composition of *Eucalyptus microtheca* and *Eucalyptus viminalis*. *Avicenna J Phytomed.* 5 (6): 540-552.
- MARONGIU, B, PORCEDDA, S, PORTA, GD, REVERCHON, E, (2001). Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata* subsp. *insularis* essential oils by supercritical CO<sub>2</sub>, *Flavour Fragr. J.* 16, 5, 384-388.
- MARTINEZ, J, ROSA, TV, MENUT, C, LEYDET, A, BRAT, P, PALLET, D, MEIRELES, M.A. (2004). Valorization of Brazilian vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) oil. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6578–6584.
- MULYANINGSIH, S, SPORER, F, ZIMMERMANN, S, REICHLING, J, & WINK, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061–1066.
- OSORIO, C. *et al.* (2006). Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 54, n. 2, p. 509-516.
- SILVA, LA, SARRAZIN, SLF, OLIVEIRA, RB, SUEMITSU, C, MAIA, JGS, MOURÃO, RHV. (2016). Composition and Antimicrobial Activity of Leaf Essential Oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *European Journal of Medicinal Plants.* 13. 1-9.
- SRIVASTAVA, AK, SRIVASTAVA, SK, & SHAH, NC. (2001). Constituents of the Rhizome Essential Oil of *Curcuma amada* Roxb. from India. *Journal of Essential Oil Research*, 13(1), 63–64.
- VILA R, SANTANA AI, PÉREZ-ROSÉS R, VALDERRAMA A, CASTELLI MV, MENDONÇA S, ZACCHINO S, GUPTA MP, CAÑIGUERAS S. (2010). Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of alpha-bisabolol. *Bioresour Technol.*;101(7):2510-4.

- WILLNER, B, GRANVOGL, M, & SCHIEBERLE, P. (2013). Characterization of the Key Aroma Compounds in Bartlett Pear Brandies by Means of the Sensomics Concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9583–9593.
- WOOLLARD JM, PERRY NB, WEAVERS RT, VAN KLINK JW. (2008). Bullatenone, 1,3-dione and sesquiterpene chemotypes of *Lophomyrtus* species. *Phytochemistry*.;69(6):1313-8.
- YANGUI I, ZOUAOUI BOUTITI M, BOUSSAID M, MESSAOUD C. (2017). Essential Oils of Myrtaceae Species Growing Wild in Tunisia: Chemical Variability and Antifungal Activity Against *Biscogniauxia mediterranea*, the Causative Agent of Charcoal Canker. *Chem Biodivers*.;14(7).
- YU, E. J, KIM, T. H, KIM, K. H, & LEE, HJ. (2004). Aroma-active compounds of *Pinus densiflora* (red pine) needles. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(6), 532–537.
- ZAIDI SFH, YAMADA K, KADOWAKI M, USMANGHANI K, SUGIYAMA T. (2009). Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*. 121 (2): 286-291.
- ZHENG, CH, KIM, TH, KIM, KH, LEEM, YH, & LEE, HJ. (2004). Characterization of potent aroma compounds in *Chrysanthemum coronarium* L. (Garland) using aroma extract dilution analysis. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(5), 401–405.

---

## CAPÍTULO 7: ESTUDOS MECANÍSTICOS DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA EM ENSAIOS IN VITRO E IN VIVO

---

### 7.1 Introdução

As propriedades anti-inflamatórias de espécies de *Campomanesia* têm sido demonstradas em diversos estudos, relacionando a presença de constituintes químicos fenólicos como flavonoides e terpenoides, com seus efeitos inibitórios de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, e NO, fator de transcrição NF- $\kappa$ B, atividade de COX-1 e COX-2 e redução de radicais livres, além do aumento da produção de IL-10, citocina imunomoduladora (FERREIRA *et al.*, 2013; HENRIQUES *et al.*, 2016; LESCANO *et al.*, 2018; LORENÇONI *et al.*, 2020).

A gastroproteção para a espécie *C. lineatifolia* é demonstrada em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (MADALOSSO *et al.*, 2012), relacionando um aumento da secreção do muco protetor e redução das áreas de lesões gástricas em pré-tratamento com o extrato etanólico e a fração acetato de etila obtida das folhas.

Os trabalhos que descrevem a atividade anti-inflamatória na úlcera gástrica para a espécie *C. lineatifolia* ainda são escassos, o que mostra a importância deste estudo para a possível elucidação dos mecanismos gastroprotetores relacionados à planta. Neste trabalho, serão utilizados modelos *in vitro* para estudo de citocinas inflamatórias e dois modelos *in vivo* de lesão gástrica para proposta do mecanismo.

### 7.2 Materiais e métodos

#### 7.2.1 Ensaios *in vitro* de inflamação

##### 7.2.1.1 Viabilidade celular

Células monocíticas humanas da linhagem THP-1 (ATCC TIB-202) foram cultivadas em uma placa de cultura celular de 96 poços (100.000 células por poço) após indução da diferenciação

em macrófagos utilizando forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ . As células foram incubadas ao meio (100 $\mu\text{L}$ ) sem tratamento ou com tratamento do extrato etanólico de *C. lineatifolia* em diferentes concentrações (62,5; 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ) por 2h, e depois com LPS (extraído de *Escherichia coli* sorotipo O:111:B4) na concentração final de 100  $\text{ng/mL}$  por um período de 4h. Dexametasona (Sigma-Aldrich, 0,1  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo.

Para avaliar a viabilidade celular, o sobrenadante dos poços foi descartado e substituído por 100 $\mu\text{L}$  de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (MOSMANN, 1983) dissolvido em meio RPMI 1640 na concentração 500 $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, as placas foram incubadas por 1h e 30min, em condições de cultura, para metabolização do MTT. Decorrido o tempo de incubação, 100 $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados a cada poço e a placa foi submetida à agitação por 15 minutos para dissolução dos cristais de formazan. A densidade óptica dos poços foi lida em 570 nm em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*). A viabilidade celular foi determinada a partir da razão entre as células viáveis e o total de células, utilizando-se como referência de viabilidade as células não tratadas. Valores acima de 90% foram considerados não tóxicos para a linhagem de células THP-1. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

#### 7.2.1.2 Capacidade inibitória sobre a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e ativação de $\text{NF-}\kappa\text{B}$

Células monocíticas humanas da linhagem THP-1 (ATCC TIB-202) foram cultivadas em uma placa de cultura celular de 24 poços ( $1 \times 10^6$  células por poço) após indução da diferenciação em macrófagos utilizando PMA  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

As células foram expostas ao meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (500 $\mu\text{L}$ ) sem tratamento ou com tratamento do extrato etanólico de *C. lineatifolia* em diferentes concentrações (62,5; 125; 250  $\mu\text{g/mL}$  e 3, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), ou substâncias isoladas quercitrina e miricitrina (6,25; 12,5 e 25,0  $\mu\text{M}$ ) por 2h, e depois com LPS (extraído de *Escherichia coli* sorotipo O:111:B4) na concentração final de 100  $\text{ng/mL}$ , como estímulo inflamatório. Dexametasona (Sigma-Aldrich, 0,1  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. Após incubação a 37 °C por 18h, as placas foram centrifugadas (1800  $g$ , 5min, 16 °C), o sobrenadante de 4 poços de cada grupo foi coletado e analisado para quantificação de  $\text{TNF-}\alpha$  por ensaio

imunoenzimático (ELISA) empregando o kit TNF-alpha duo set, DY210 (R&D Systems, EUA).

Para obtenção do extrato proteico para análise da ativação de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  e Erk1/2), as células THP-1 (pellet) foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 1X e lisadas pela adição de 100  $\mu$ L de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de NaVO<sub>3</sub>, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 200 mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina) e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 *g* em microcentrífuga por 15 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante aliquoteado e guardado à -20 °C até o momento de uso.

Para realizar a dosagem de proteínas totais foi utilizado o kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories) baseado no método de Bradford (1976). O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços (NUNC™) e consistiu na adição de 2  $\mu$ L de cada amostra a 200  $\mu$ L do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente, foi confeccionada uma curva padrão utilizando como solução padrão albumina bovina sérica (BSA) 1 mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) a 595 nm. As absorbâncias das amostras foram comparadas com as absorbâncias da curva padrão, e as concentrações calculadas e expressas em mg/mL (ou  $\mu$ g/ $\mu$ L).

Os extratos proteicos totais (60  $\mu$ g) foram desnaturados, misturando-se a amostra com tampão LB 5X (10% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 0,250 M Tris/HCl pH 6,8) e a mistura mantida a 100 °C por 5 minutos. Os extratos proteicos foram fracionados em gel de 10% de poliacrilamida/SDS. Ao final da corrida, foram transferidos para membrana de nitrocelulose (*Hybond™ ECL™, GE Healthcare*).

As membranas para o imunoblot foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado por uma hora. Em seguida, foram lavadas com PBS-Tween, e incubadas com o anticorpo de interesse a 4 °C por 24h. Após nova lavagem com PBS/Tween e incubação durante 1 hora à temperatura ambiente com o respectivo anticorpo secundário ligado à peroxidase, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL™ (*GE Healthcare*) e expostas contra filme de raio X (*Hyperfilm ECL™, GE Healthcare*). O filme foi revelado utilizando-se revelador e fixador (Kodak), conforme indicações do fabricante. Os anticorpos

utilizados foram: anti-P-IkBa e anti-P-Erk1/2 na concentração 1:1000 (*CellSignaling Technology*) e anti- $\beta$ -actina 1:10000 (*Sigma-Aldrich*) e anticorpos secundários conjugados com peroxidase - anti-coelho 1:3000 e anti-rato 1:3000 (*Santa Cruz Biotechnology*). As análises densitométricas foram realizadas utilizando-se o programa Image J. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

#### 7.2.2 Ensaio *in vivo* de inflamação e gastroproteção

Os estudos da atividade anti-inflamatória foram realizados em colaboração da Professora Lirlândia Pires de Sousa do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e do Professor Renes Machado do Departamento de Produtos Farmacêuticos, ambos da Faculdade de Farmácia da UFMG. O modelo de lesão gástrica induzida por etanol foi realizado em colaboração com o Professor Carlos Alberto Tagliati, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e o modelo de lesão gástrica induzida por indometacina em colaboração com o Professor Renes de Resende Machado, do Departamento de Produtos Farmacêuticos, ambos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

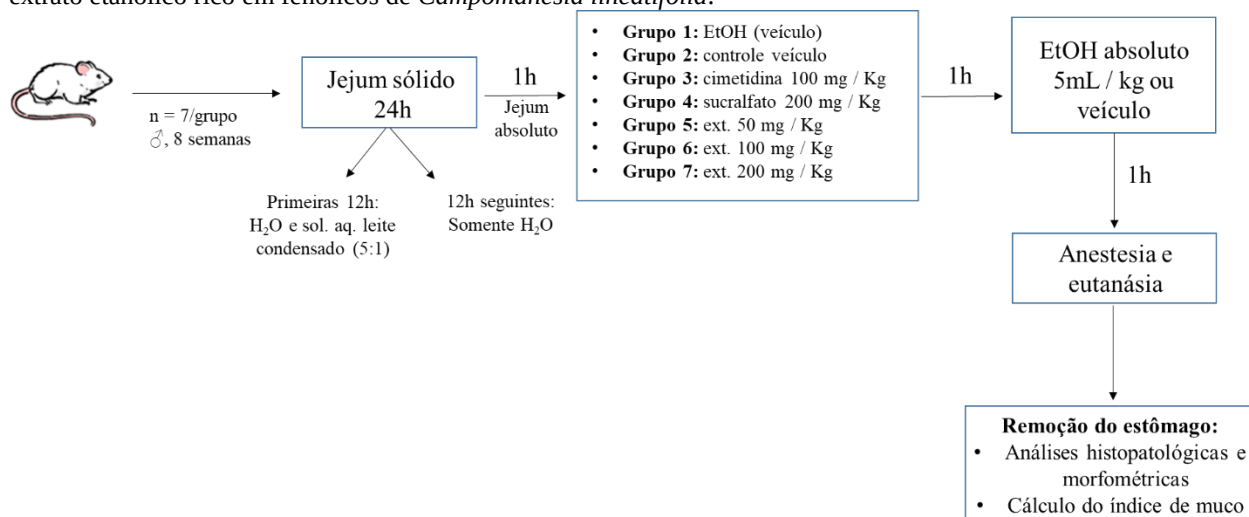
Para os modelos de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina foi utilizado um total de oitenta e quatro camundongos Swiss com 6 semanas e peso entre 25-30 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 165/2018 (ANEXO A).

##### 7.2.2.1 Modelo de lesão gástrica induzida por etanol

Para o modelo de lesão gástrica induzida por etanol, adaptado de Madalosso *et al.* (2012), foram utilizados um total de quarenta e nove camundongos, sendo sete camundongos Swiss/grupo, com peso entre 25-30 g, machos, adultos jovens (6 semanas), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, com variação de peso inferior a 20%, foram submetidos a ciclo claro-escuro e jejum sólido de 24 horas em gaiola de contenção, para evitar a coprofagia. Durante as primeiras doze horas, tiveram livre acesso à água e solução aquosa de leite condensado (proporção de 5:1) e somente à água nas doze horas subsequentes, até uma hora antes da primeira administração. Os fármacos cimetidina, sucralfato e os extratos foram

solubilizados em água destilada (veículo). Após 1h, foi administrada por gavagem, veículo (**grupos 1 e 2**), cimetidina 100 mg/Kg (**grupo 3**), sucralfato 200 mg/Kg (**grupo 4**) e os tratamentos com o extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia*, nas doses de 50 mg/Kg (**grupo 5**), 100 mg/Kg (**grupo 6**) e 200 mg/Kg (**grupo 7**). Após 1 h, foi realizada a administração do etanol absoluto 5 mL/Kg (**grupos 1, 3-7**) ou salina (**grupo 2**) e, na segunda hora, os animais foram anestesiados (cetamina 80 mg/Kg + xilazina 10 mg/Kg, via intraperitoneal) e eutanasiados por hipovolemia através de coleta do sangue por via intracardiaca (volume  $\geq 2$  mL). Depois da confirmação da eutanásia, os estômagos foram removidos por meio de uma abertura ao longo da grande curvatura e lavados suavemente com solução fisiológica. A mucosa gástrica foi esticada, com auxílio de alfinetes, sobre plataforma de isopor de espessura de 15 mm. As plataformas contendo os estômagos foram armazenadas temporariamente em recipiente plástico contendo solução de formaldeído 10% tamponado (pH 7,2) para fixação e posterior avaliação das lesões por meio de análises histopatológicas e morfométricas. Parte do tecido foi utilizado para avaliação dos parâmetros inflamatórios. O protocolo experimental é mostrado esquematicamente na **Figura 74**.

**FIGURA 74** – Protocolo de indução da lesão gástrica induzida por etanol em modelo experimental *in vivo* para extrato etanólico rico em fenólicos de *Campomanesia lineatifolia*.

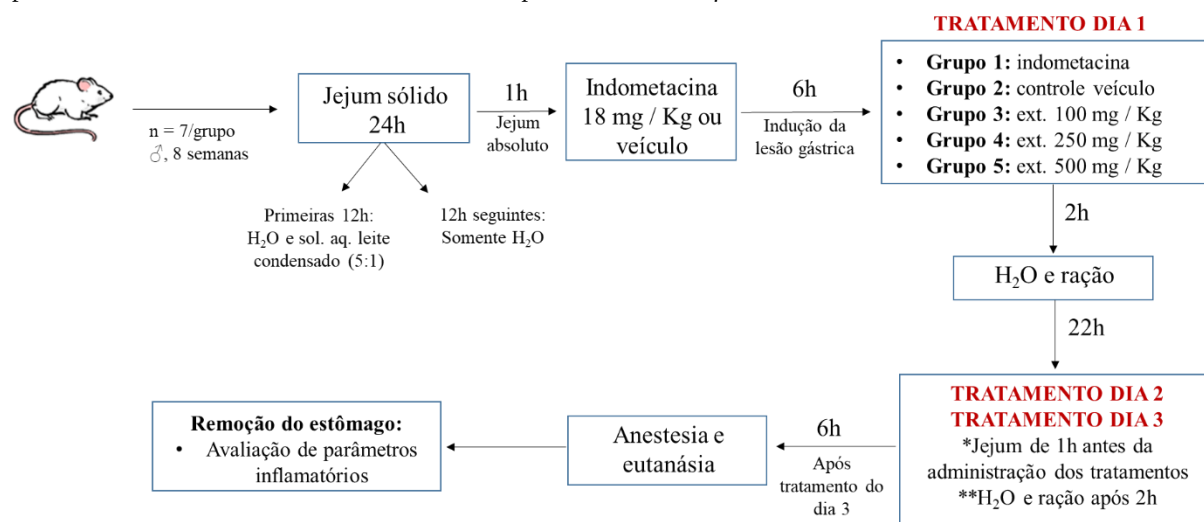


#### 7.2.2.2 Modelo de lesão gástrica induzida por indometacina

Para avaliação da atividade gastroprotetora do extrato etanólico rico em fenólicos das folhas de *C. lineatifolia* em modelos de lesões da mucosa gástrica induzida por indometacina, utilizou-se modelo adaptado de Maity *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2012 e Yadav *et al.*, 2013. Um total de

trinta e cinco camundongos Swiss, sendo sete por grupo, com peso entre 25-30g, machos, adultos jovens (6 semanas), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, com variação de peso inferior a 20%, foram submetidos a ciclo claro-escuro e a jejum sólido de 24 horas em gaiola de contenção, para evitar a cropofagia. Durante as primeiras doze horas, tiveram livre acesso à água e solução aquosa de leite condensado (proporção de 5:1) e somente à água nas doze horas subsequentes até uma hora antes da primeira administração. A indometacina e os extratos foram solubilizados em água destilada (veículo). Após esse período, foi administrado por gavagem, indometacina 18 mg/Kg, em dose única, para indução da lesão gástrica nos **grupos 2-5**, e apenas veículo para o **grupo 1**. Após 6 h da administração da indometacina/veículo, os animais receberam um tratamento por gavagem intragástrica, durante 3 dias, p.o.: **grupo 1** – água destilada; **grupo 2** – água destilada; **grupo 3** – 100 mg/kg do extrato; **grupo 4** – 250 mg/kg do extrato e **grupo 5** – 500 mg/kg do extrato. Após 2h do tratamento, os animais tiveram livre acesso à água e ração. Nos dias subsequentes, 1h antes do tratamento, os animais ficaram sob jejum por 1h para evitar interações dos tratamentos com o alimento. No terceiro dia, após 6 h da última administração dos extratos/veículo, os animais foram anestesiados (cetamina 80 mg/Kg + xilazina 10 mg/Kg, via intraperitoneal) e tiveram o sangue coletado por via intracardíaca e eutanasiados sob sangria. Depois da confirmação da eutanásia, os estômagos foram removidos, abertos ao longo da grande curvatura, lavados suavemente com solução fisiológica, pesados, cortados em quatro fatias e armazenados a -20°C para posterior processamento e avaliação de citocinas inflamatórias IL-6, CXCL-1 e via do NF- $\kappa$ B. O protocolo experimental é mostrado esquematicamente na **Figura 75**.

**FIGURA 75** – Protocolo de indução da lesão gástrica induzida por indometacina em modelo experimental *in vivo* para extrato etanólico rico em fenólicos de *Campomanesia lineatifolia*.



### 7.2.2.3 Necropsia, coleta e processamento do material

Após o período de fixação, a mucosa gástrica (modelo etanol) foi dividida em três fatias paralelas à linha longitudinal que limita a porção glandular e não glandular de mucosa gástrica dos camundongos. Os fragmentos obtidos foram desidratados em série crescente de álcoois 70, 80, 90 e 100%, diafanizados em xilol, parafinizados e incluídos em parafina histológica purificada (PF 56-58 °C). Os blocos foram seccionados em micrótomo para obtenção de três cortes histológicos com 4 µm de espessura e corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para cálculo das áreas de necrose e de muco (PAS<sup>+</sup>), respectivamente.

### 7.2.2.4 Análise morfométrica da área de necrose gástrica e de mucinas PAS<sup>+</sup>

Todas as zonas de necrose, das mais superficiais às mais profundas, foram quantificadas nos cortes histológicos de cada estômago. Tais lesões foram visualizadas pela objetiva de 4X e digitalizadas com o uso da microcâmera Q-Color 3 Olympus (New York, USA). Todas as áreas de necrose (µm<sup>2</sup>) dos cortes histológicos foram quantificadas por meio do programa KS300 - analisador de imagem Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) e somadas para a obtenção da área total de necrose. A área total da mucosa gástrica a ser analisada foi determinada pela digitalização completa dos três cortes histológicos de cada camundongo utilizando a mesma microcâmera para o cálculo da área por meio do programa KS300. Nestas imagens, todos os pixels da mucosa gástrica foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior obtenção da área total de mucosa (µm<sup>2</sup>). Para que pudessem ser comparadas, todas as áreas de necrose foram normalizadas pela menor área de mucosa gástrica detectada que foi de 2x10<sup>6</sup> µm<sup>2</sup> (SILVA OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Todos os cortes histológicos corados pelo PAS de cada estômago foram visualizados através da objetiva de 10X para a digitalização de imagens aleatórias, utilizando a mesma microcâmera. A área PAS positiva foi calculada utilizando-se o mesmo analisador de imagens mencionado acima. Em cada imagem, todos os pixels com tons de bonina das regiões coradas pelo PAS foram selecionados para a criação de uma imagem binária e obtenção da área em µm<sup>2</sup>. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria foi a descrita por Caliari (1997).

#### 7.2.2.5 Avaliação da capacidade inibitória sobre a produção de IL-6 e CXCL-1

As concentrações de IL-6 e CXCL-1 no tecido gástrico (modelo indometacina de lesão gástrica) foram determinadas utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Para investigar a capacidade inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$  e CXCL-1 no modelo experimental de lesão gástrica induzida por indometacina, os estômagos removidos foram pesados, os tecidos homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato contendo Tween-20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (0,1 mM), cloreto de benzametônio (0,1 mM), EDTA (10 mM), aprotinina A (2 mg/mL) e albumina de soro bovino (0,5%), seguida de centrifugação (20.000 g) durante 15 min a 4 °C. As amostras de sobrenadante foram armazenadas a -70 °C até a análise das concentrações de IL-6 e CXCL-1. O pellet foi reservado e armazenado a mesma temperatura, para posterior ensaio de ativação de NF- $\kappa$ B. Os resultados foram expressos em picogramas de citocinas por 100 mg do material coletado e os ensaios realizados em triplicatas.

#### 7.2.2.6 Avaliação da capacidade inibitória sobre a ativação de NF- $\kappa$ B

Para obtenção do extrato proteico para análise da ativação de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  e Erk1/2), o pellet resultante do processamento do estômago para os ensaios de citocinas (item 7.2.2.5) foi lavado com PBS 1X e lisado pela adição de 300 $\mu$ L de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1 mM de NaVO<sub>3</sub>, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 200 mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina) e deixado em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 10.000 rpm em microcentrífuga por 15 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante aliquoteado e guardado à -20 °C até o momento de uso. O protocolo a seguir foi executado conforme descrito no item 7.2.1.2.

#### 7.2.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Graph Prism* versão 6.0. Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi empregado o teste *One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Bonferroni ou Newman-Keuls para comparações múltiplas de pequenas amostras. A escolha desses testes foi

realizada de acordo com a dispersão relativa dos dados na estatística descritiva e  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

### 7.3 Resultados e discussão

Para se avaliar a possível atividade citotóxica em células humanas, o efeito do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia* foi investigado por ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT. Conforme pode ser observado no **Gráfico 11**, o tratamento das células THP-1 estimuladas por LPS nas três concentrações testadas do extrato (62,5; 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ) não apresentaram efeito no metabolismo celular, não alterando sua viabilidade, em comparação ao grupo controle e, portanto, não demonstrando efeito tóxico.

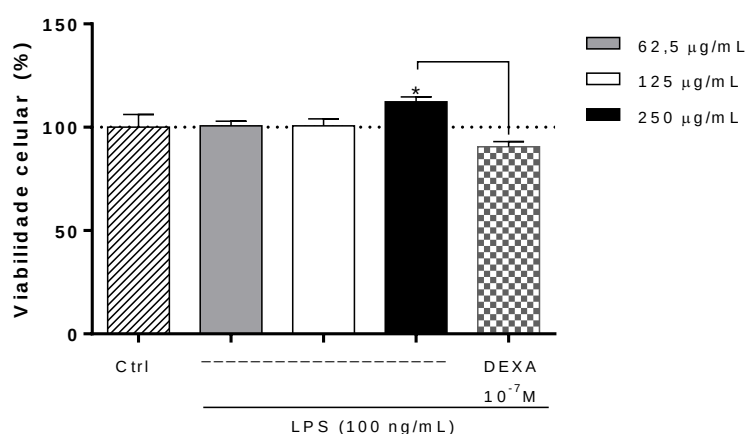


**GRÁFICO 11** – Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e pré-tratamento com o extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia* em diferentes concentrações (62,5; 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média, *One-way ANOVA*, com pós-teste Tukey,  $*p < 0,05$ . Legenda: Ctrl, controle (células não tratadas); Dexa, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Na capacidade inibitória sob a produção de  $\text{TNF-}\alpha$  em células THP-1 estimuladas por LPS, foi demonstrado (**GRÁFICO 12**) que as três concentrações testadas do extrato e substâncias isoladas, quercitrina e miricitrina, foram capazes de promover uma redução significativa na produção de  $\text{TNF-}\alpha$ , observando-se, ainda, resposta semelhante à atividade do anti-inflamatório esteroide dexametasona, utilizado como controle positivo.

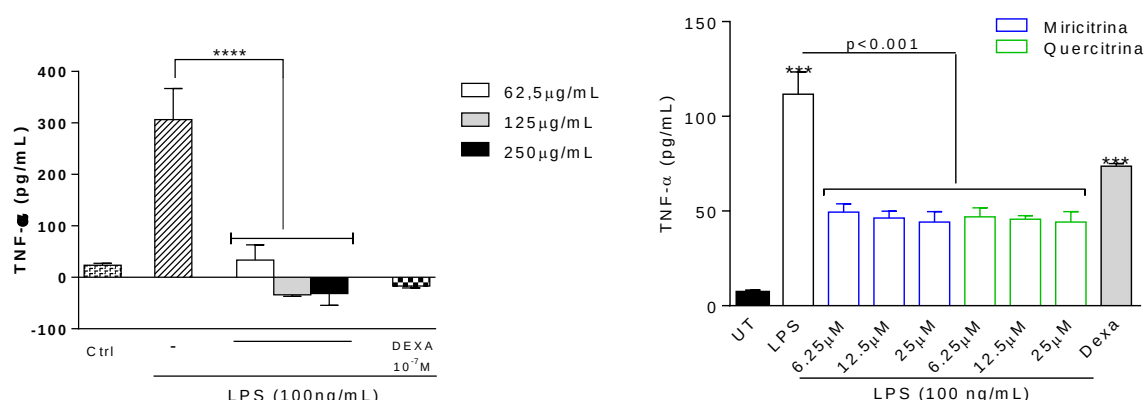


**GRÁFICO 12** – Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos e substâncias isoladas de *C. lineatifolia* em diferentes concentrações sob a produção de TNF- $\alpha$  em células THP-1 ativadas por LPS. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média, *One-way* ANOVA, com pós-teste Tukey,  $p < 0,05$ . Legenda: Ctrl/UT, controle (células não tratadas); DEXA, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Testada a capacidade inibitória do extrato sob a produção de TNF- $\alpha$  nas concentrações de 3, 30 e 100  $\mu$ g/mL, observou-se uma resposta em função da concentração, como demonstrado no **Gráfico 13**.

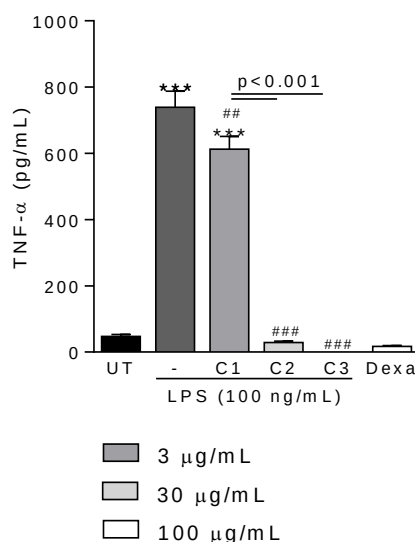


**GRÁFICO 13** – Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia* em diferentes concentrações sob a produção de TNF- $\alpha$  em células THP-1 ativadas por LPS. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média, *One-way* ANOVA, com pós-teste Tukey,  $p < 0,05$ . Legenda: Ctrl/UT, controle (células não tratadas); DEXA, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

A ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B foi avaliada pelo aumento das proteínas fosforiladas P-I $\kappa$ B $\alpha$  e P-Erk1/2 (**FIGURA 76**). As três concentrações testadas para o extrato foram capazes de reduzir a expressão da proteína P-I $\kappa$ B $\alpha$ , apresentando efeito semelhante ao observado para

a dexametasona, mas apenas a concentração de 250 µg/mL apresentou capacidade inibitória para a P-Erk1/2, com efeito semelhante ao observado para a dexametasona (**GRÁFICO 14**).

**FIGURA 76** – Imunoblot das proteínas P-IκBα e P-Erk1/2, em diferentes concentrações do extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia*. Legenda: U, célula não tratada; LP, lipopolissacarídeo; C1, 62,5 µg/mL; C2, 62,5 µg/mL e C3, 250 µg/mL; Dex, dexametasona.

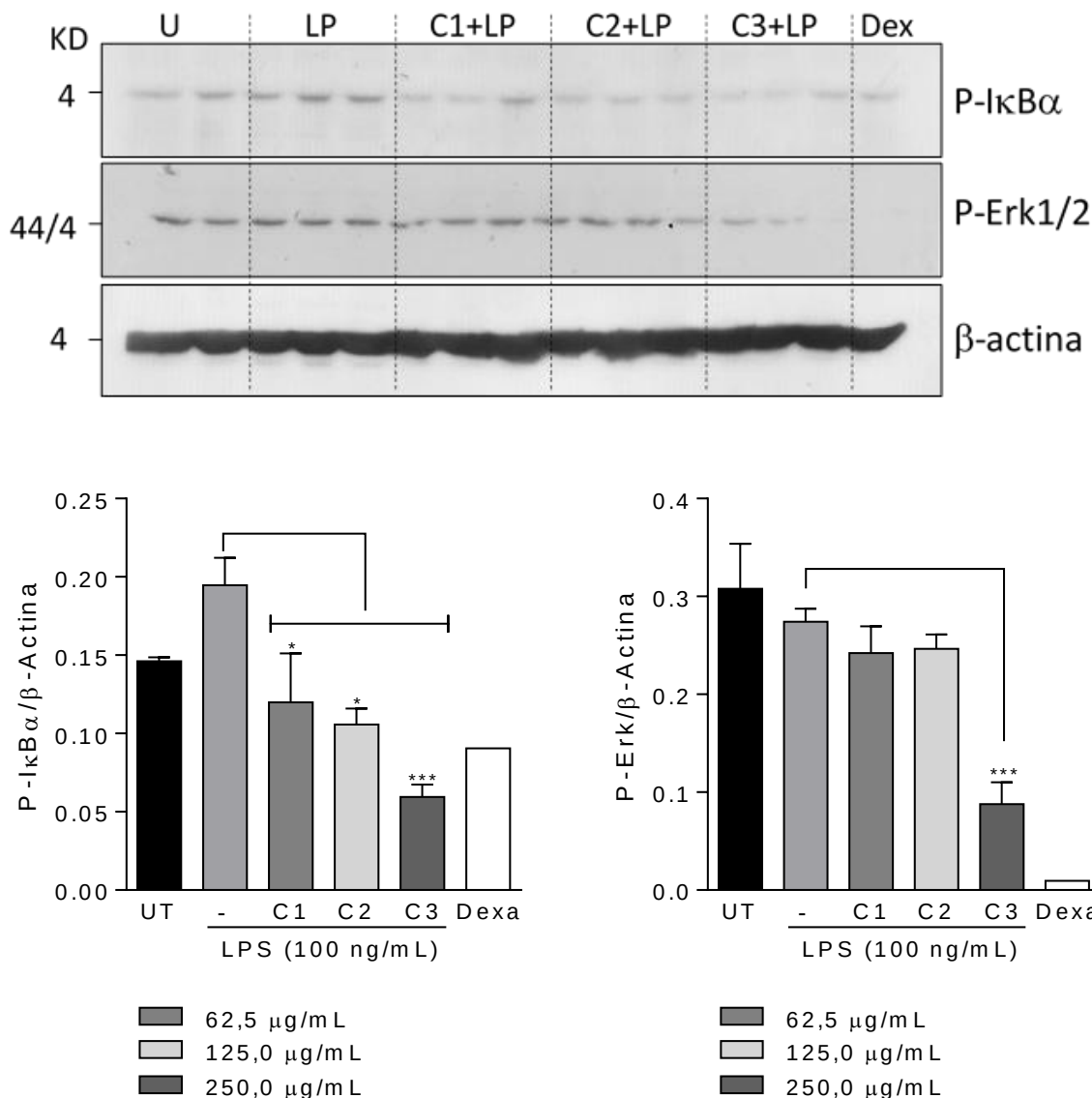


**GRÁFICO 14** – Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia* sob a via de sinalização do NF-κB, para a proteína P-IκBα e P-Erk1/2 em células THP-1 ativadas por LPS. Cada barra representa a média ± desvio padrão da média, One-way ANOVA, com pós-teste Tukey,  $p < 0,05$ . Legenda: UT, células não tratadas; Dexa, dexametasona; LPS, lipopolissacarídeo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Considerando os resultados da atividade anti-inflamatória pela inibição do TNF-α e via NF-κB obtidos nas análises *in vitro*, foram conduzidas avaliações adicionais dos parâmetros inflamatórios no modelo *in vivo* de lesão gástrica induzida por indometacina, frente à capacidade de inibição de IL-6 e CXCL-1. Como pode ser demonstrado no **Gráfico 15**, o

tratamento com o extrato foi capaz de reduzir a produção de IL-6 e CXCL-1 nas três concentrações testadas.

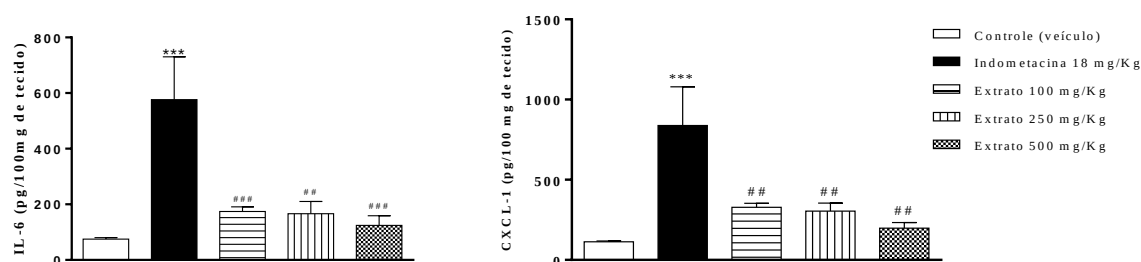
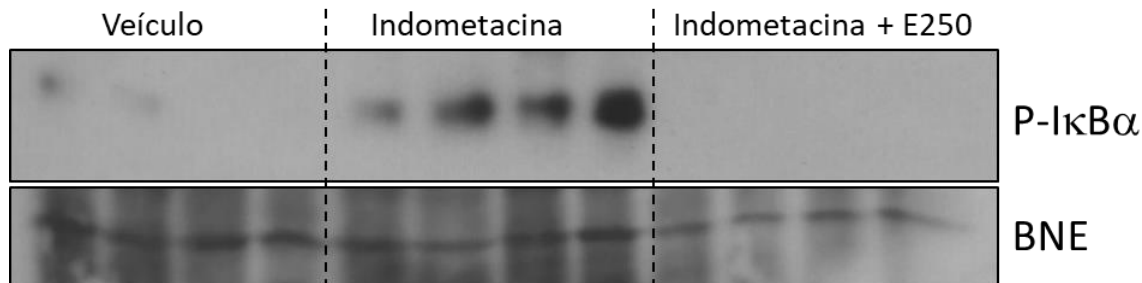


**GRÁFICO 15** – Capacidade inibitória do extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia* sob a produção de IL-6 e CXCL-1, em tecido gástrico do modelo de lesão induzida por indometacina. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média, *One-way* ANOVA, com pós-teste Newman-Keuls,  $p < 0,05$ . (\*) representa diferença com o grupo controle e (#) representa diferença com o grupo indometacina. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

Na sequência, os testes para avaliação da via de sinalização NF $\kappa$ B demonstraram que o tratamento com a dose de 250 mg/Kg foi capaz de reduzir a ativação de P-I $\kappa$ B $\alpha$  (**FIGURA 77**).

**FIGURA 77** – Imunoblot da proteína fosforilada P-I $\kappa$ B $\alpha$  no tecido gástrico de modelo de lesão induzida por indometacina, após tratamento com o extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia* na dose de 250 mg/Kg. Legenda: BNE, banda não específica.



Yadav *et al.* (2012) caracterizaram um modelo de lesão por indometacina, propondo os mecanismos moleculares que induzem a gastropatia. Conforme já mencionado, este mesmo modelo foi reproduzido neste estudo para se traçar o mecanismo pelo qual o extrato de *C. lineatifolia* exerce sua atividade antiúlcera gástrica. Estes autores demonstraram que a ativação da via do NF- $\kappa$ B mediada pela indometacina, refletida pela fosforilação da proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , coincidiu com a indução de TNF- $\alpha$ . Em resposta ao estímulo inflamatório, a proteína I $\kappa$ B $\alpha$  torna-se fosforilada (P-I $\kappa$ B $\alpha$ ) e se dissocia do fator nuclear NF- $\kappa$ B. Em sequência, o NF- $\kappa$ B transloca-se para o núcleo e age como um fator transcricional responsável pela ativação gênica de substâncias pró-inflamatórias, como ICAM-1, iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (ALESSANDRI *et al.*, 2013; HAYDEN & GHOSH, 2014), amplificando a cascata inflamatória

e exacerbando o dano gástrico (AUGUSTO *et al.*, 2007; SANGIOVANNI *et al.*, 2013). Os resultados aqui demonstrados corroboram com esses achados e sugerem que o mecanismo gastroprotetor do extrato de *C. lineatifolia* esteja relacionado com a diminuição da via de sinalização TNF- $\alpha$  / NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) / IL-6. Adicionalmente, considerando o papel de quimioatração da CXCL-1 no recrutamento e ativação de neutrófilos, a redução dessa quimiocina pelo tratamento com o extrato, também sugere uma redução do infiltrado inflamatório no tecido gástrico, contribuindo com seu efeito anti-inflamatório e gastroprotetor.

Para os flavonóis quercitrina e miricitrina, substâncias majoritárias no extrato, as atividades anti-inflamatórias são reportadas em alguns estudos. Em *Campomanesia adamantium*, a miricitrina isolada do extrato em acetato de etila promoveu uma redução significativa da produção de TNF- $\alpha$  em modelo *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2013). Abdallah e Esmat (2017) demonstraram que a miricitrina exibiu uma elevada atividade antioxidante e mostrou grande eficiência em diminuir o NF- $\kappa$ B na menor concentração testada (1 $\mu$ M). Além disso, reduziram significativamente os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em modelo *in vitro* de inflamação. Em modelo de lesão por indometacina, Abreu Miranda (2015) sugere que a quercitrina isolada de extrato de *Solanum cernuum* (Solanaceae) está relacionada com a gastroproteção observada em modelos de lesão por etanol e indometacina.

A atividade anti-inflamatória para diterpenoides labdanos também é descrita e tem sido atribuída principalmente pela inibição da atividade de NF- $\kappa$ B, modulação do metabolismo do ácido araquidônico, com inibição de COX-2 e redução da produção de óxido nítrico (TRAN, WONG e CHAI, 2017). Esses dados sugerem a contribuição do 14 $\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol, identificado no extrato.

O modelo experimental de indução de lesão gástrica por etanol é amplamente utilizado quando se pretende investigar plantas que possam apresentar propriedades anti-úlceras. Pelo seu mecanismo, o álcool é capaz de promover um dano direto na mucosa gástrica, o que reduz o muco gástrico protetor e íons bicarbonato, levando à formação de radicais livres, hemorragia e áreas extensas de necrose (BEBER *et al.*, 2017). Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o alto teor de flavonoides e alta atividade antioxidante da fração acetato de etila obtida a partir do extrato etanólico das folhas de *C. lineatifolia*, contribuíram para a eliminação dos radicais livres produzidos pelo metabolismo do etanol, evitando os danos

gástricos e sugerindo uso etnofarmacológico da espécie como agente gastroprotetor. De maneira semelhante, neste estudo, o tratamento com o extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia* diminuiu as áreas de necrose e aumentou a produção do muco protetor, como pode ser observado no **Gráfico 16** e **Figuras 78 e 79**.

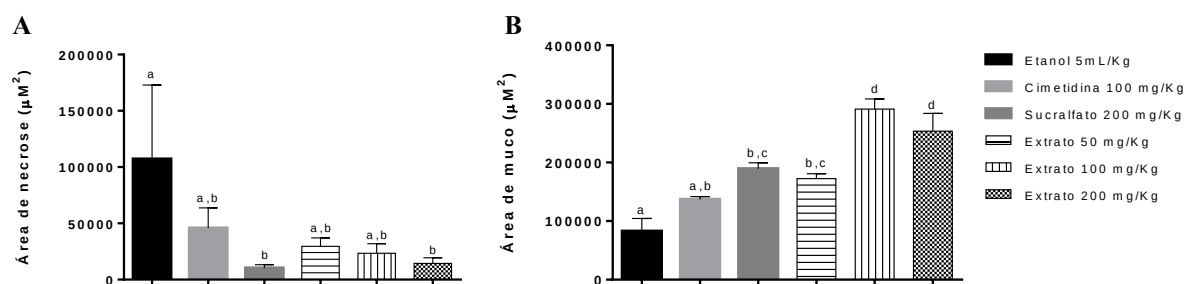


**GRÁFICO 16** – Área de necrose (A) e de muco (B) da mucosa gástrica em modelo de lesão gástrica induzida por etanol, após tratamento com cimetidina, sucralfato e extrato etanólico rico em fenólicos de *C. lineatifolia*. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média, *One-way ANOVA*, com pós-teste Bonferroni,  $p < 0,05$ . (a-d) letras distintas diferem estatisticamente.

**FIGURA 78** – Fotomicrografia de estômago de camundongo. (A) Grupo controle veículo. Mucosa gástrica de aspecto normal. (B) Grupo etanol. Notar a presença de ampla zona de necrose gástrica (setas). (C) Imagem representativa dos grupos tratados com cimetidina, extrato 50 e 100 mg/Kg. Zona de necrose menor do que a da imagem anterior (setas). (D) Imagem representativa dos grupos tratados com sucralfato e extrato 200 mg/Kg. Pequena área de necrose (seta). Hematoxilina e Eosina. Barra 100  $\mu$ m.

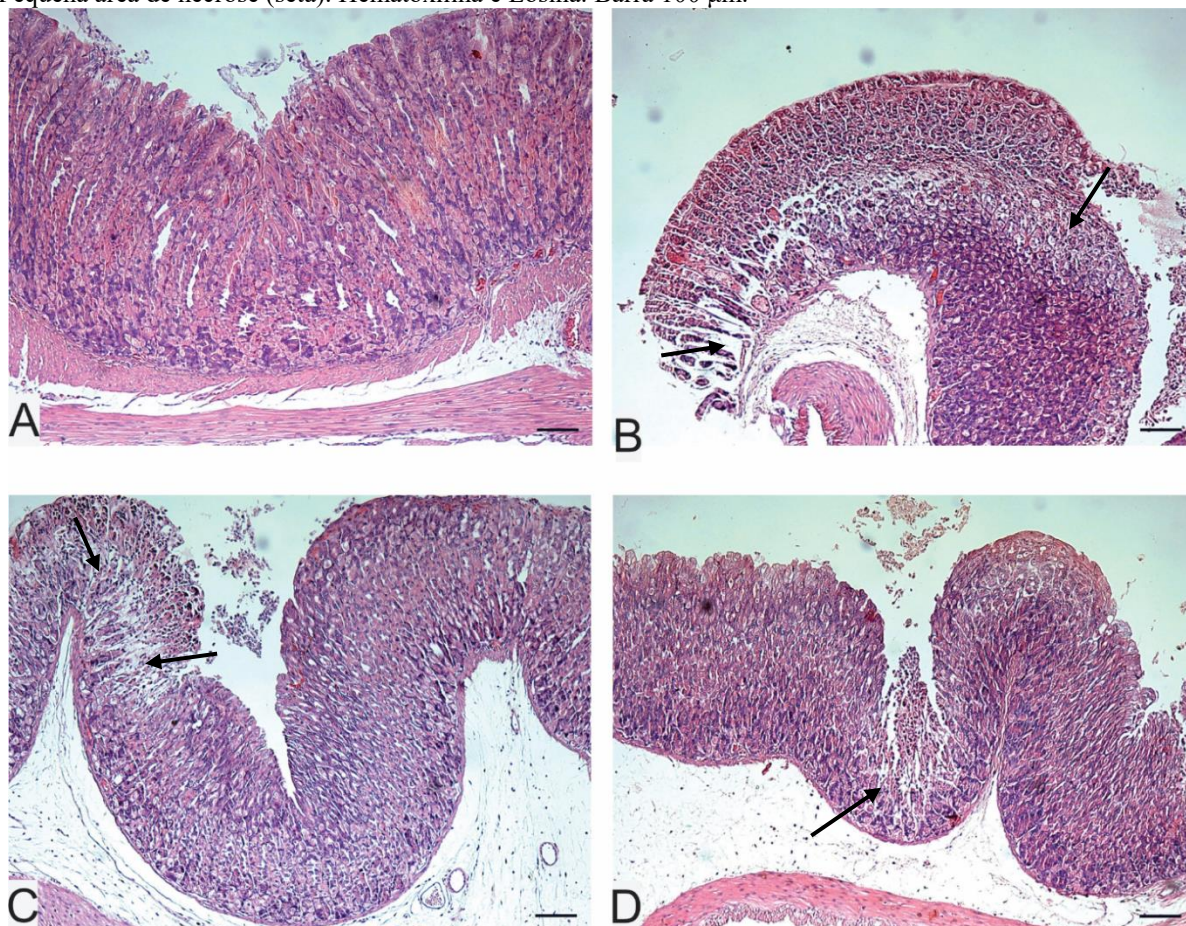
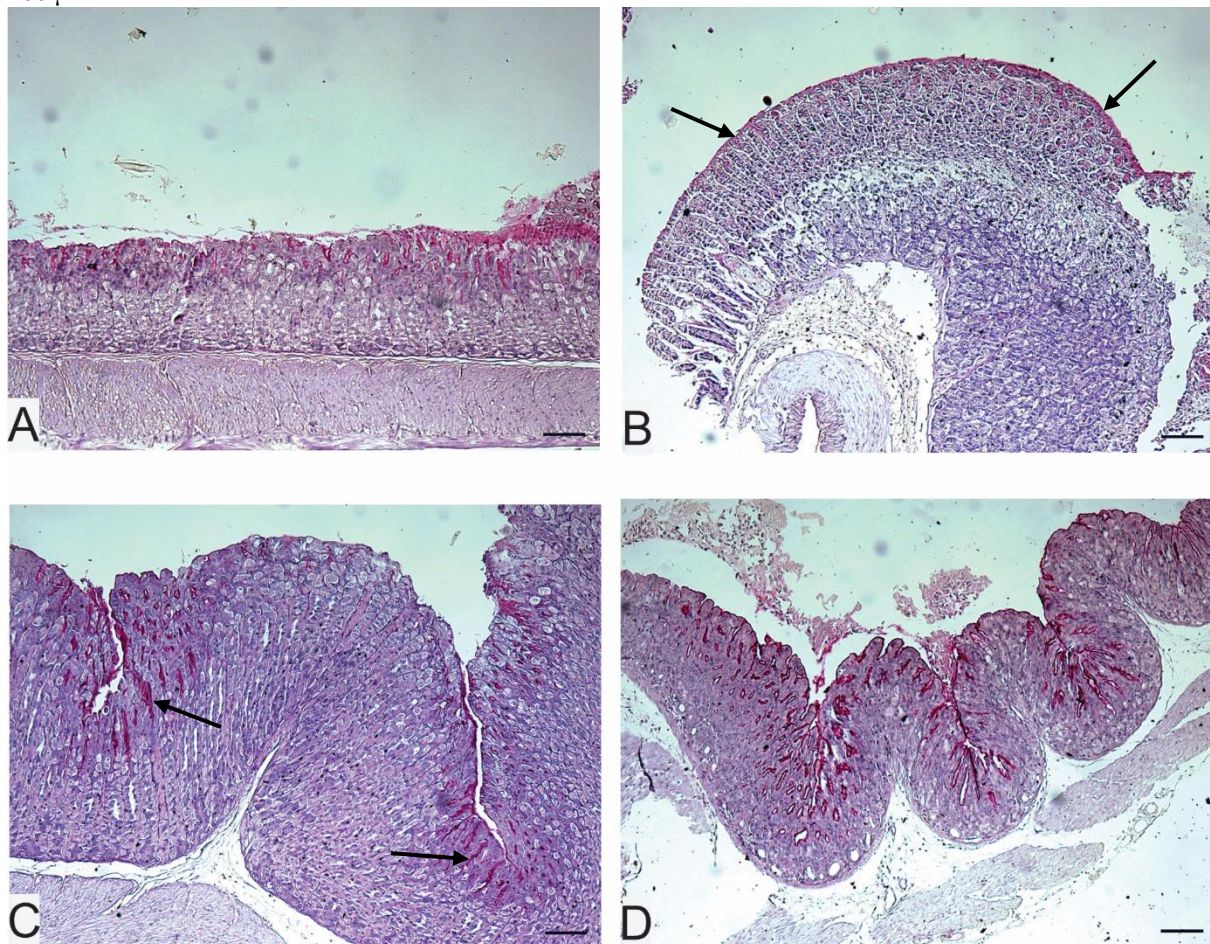


**FIGURA 79** – Fotomicrografia de estômago de camundongo. (A) Grupo controle veículo. Mucosa gástrica corada pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) de aspecto normal. (B) Imagem representativa dos grupos etanol e tratado com cimetidina. Notar a redução significativa de áreas PAS<sup>+</sup> (setas). (C) Imagem representativa dos grupos tratados com sucralfato e extrato 50 mg/Kg. Regiões PAS<sup>+</sup> (setas). (D) Imagem representativa dos grupos tratados com extrato 100 e 200 mg/Kg. Observar aumento visível de regiões PAS<sup>+</sup>. Ácido Periódico de Schiff (PAS). Barra 100 µm.



É importante notar que o pré-tratamento com o extrato, nas três doses testadas, aumentou a produção de muco na mucosa gástrica, inclusive, comparável (dose de 50 mg/Kg) e, até mesmo, superior (doses de 100 e 200 mg/Kg) ao fármaco de referência, sucralfato, aprovado no protocolo de tratamento de úlceras gástricas como agente protetor de mucosa (WHO, 2004). Ainda, como previsto, o pré-tratamento com o fármaco cimetidina, um antagonista de receptor histaminérgico H<sub>2</sub>, não aumentou de maneira significativa o muco protetor, considerando que os efeitos preventivos dos agentes antissecretores nas lesões da mucosa gástrica causadas pelo etanol são mínimos, enquanto os dos medicamentos gastroprotetores provaram ser consideráveis (ARISAWA *et al.*, 2006).

Como descrito anteriormente, os constituintes químicos majoritários identificados no extrato rico em fenólicos corresponderam aos flavonoides quercitrina e miricitrina. Em modelos de

lesão por etanol, estudos demonstram que a presença de quercitrina (ABREU MIRANDA *et al.*, 2015; DE BARROS *et al.*, 2016; BEBER *et al.*, 2017) e miricitrina (ABBAS, KANDIL e ABBAS, 2021), estão associadas à prevenção da depleção do muco protetor e atividade antioxidante, contribuindo para a redução da área ulcerada da mucosa gástrica.

Para a catequina, também identificada no extrato, estudos demonstram que esse flavonoide possui efeito preventivo sobre a úlcera péptica associada ao estresse, além da redução de somatostatina, gastrina e histamina (SATO, MATSUI e ARAKAWA, 2002).

Chalconas são precursores da via biossintética dos flavonoides e sua atividade gastroprotetora em modelo de lesão por etanol é descrita para a espécie *Campomanesia reitziana* (CABRAL *et al.*, 2017), podendo sugerir a contribuição do licurosídeo identificado neste estudo para a atividade da espécie *C. lineatifolia*.

Guardia *et al.* (1994) descrevem um efeito citoprotetor relacionado a uma lactona sesquiterpênica presente na *Artemisia douglasiana* (Compositae), com estímulo da produção de muco e redução das lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos. Giordano *et al.* (1990) descrevem a atividade citoprotetora da gaigrandina isolada de *Helenium alternifolius* em modelo de lesão por etanol. Este dado, pode sugerir a contribuição da lactona sesquiterpênica, gaigrandina, na atividade gastroprotetora da espécie *C. lineatifolia*. Além disso, muitas plantas medicinais da família Myrtaceae apresentam em sua constituição química terpenoides, aos quais é proposta a atividade de protegerem a mucosa gástrica por indução de mecanismos gastroprotetores em modelos de lesão por etanol (ISHIKAWA *et al.*, 2008; SANTIN *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 2016). Esta relação sugere a contribuição dos terpenoides identificados para a *C. lineatifolia*, 14 $\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol, hidroxi-acetil hidroshengmanol xilopiranosídeo e rubescensina M para a atividade citoprotetora.

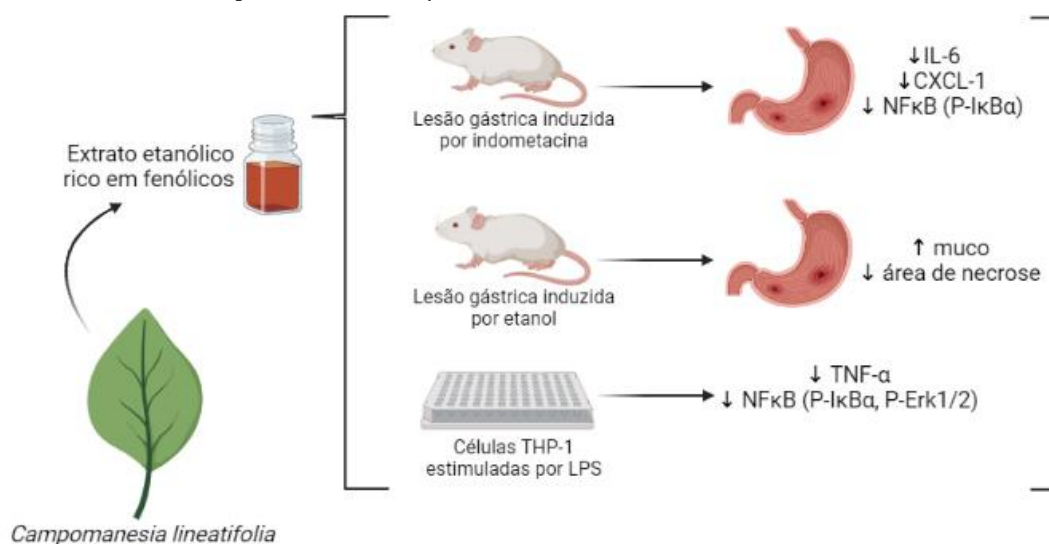
Para os esteroides, Ahmad *et al.* (2013) reportam propriedades antiúlcera para essa classe, podendo sugerir a contribuição gastroprotetora do fitoecdisteroide decumbesterona A identificado na espécie *C. lineatifolia*.

Além da diminuição do muco protetor, existem evidências que indicam o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e apoptose, que desempenham papéis cruciais

na patogênese pelo álcool (AL BRATAN *et al.*, 2013; SANGIOVANNI *et al.*, 2013). Ainda, a ativação dos neutrófilos em decorrência do processo inflamatório aumenta a expressão da via do NF- $\kappa$ B, desencadeando uma cascata inflamatória, disparando a liberação de outros mediadores, como a IL-6 e TNF- $\alpha$  (ALESSANDRI *et al.*, 2013; HAYDEN & GHOSH, 2014). Os resultados dos ensaios *in vitro* apresentados corroboram com o demonstrado neste modelo *in vivo* de lesão por etanol, onde o tratamento com o extrato etanólico de *C. lineatifolia* contribuiu para a redução do processo inflamatório na mucosa gástrica, sugerindo uma relação mecanística de atividade anti-inflamatória e redução do dano mucosal, determinado pela área de necrose. Não menos importante, como já descrito, o perfil fitoquímico do extrato, com a presença de flavonoides e terpenoides como constituintes majoritários, em associação com as outras substâncias minoritárias identificadas, também pode estar relacionado com a atividade anti-inflamatória observada.

A proposta do mecanismo anti-inflamatório e gastroprotetor do extrato está sumarizada na **Figura 80**.

**Figura 80** – Mecanismo proposto para atividade anti-inflamatória e gastroprotetora do extrato etanólico rico em fenólicos das folhas de *Campomanesia lineatifolia*.



Diversos estudos sugerem que os polifenóis são metabólitos de plantas promotores da saúde e seu consumo está associado a um risco reduzido de várias doenças crônicas, dentre elas, doenças gastrointestinais. Suas atividades farmacológicas como antioxidantes e anti-inflamatórios estão associadas aos efeitos benéficos em vias de sinalização moleculares, tais como regulação de NF $\kappa$ B e MAPKs, além da ação direta ou indireta sobre os radicais livres, o

que contribui com a sua eficácia no tratamento da úlcera gástrica (FARZAEI, ABDOLLAHI e RAHIMI, 2015).

#### 7.4 Conclusões

Os resultados sugerem que o extrato apresenta um efeito anti-inflamatório promissor, o qual é mediado pelo decréscimo do mediador pró-inflamatório TNF- $\alpha$ , e ainda, pela inibição da via de sinalização do NF- $\kappa$ B, pelas proteínas de fosforilação P-I $\kappa$ B $\alpha$  e P-Erk1/2 em ensaios *in vitro*. Nos modelos *in vivo*, o extrato foi capaz de reduzir a produção de IL-6, CXCL-1 e via NF $\kappa$ B (P-I $\kappa$ B $\alpha$ ). Também foi demonstrada a atividade gastroprotetora do extrato, associada à redução das áreas de necrose na mucosa gástrica e aumento da produção do muco protetor. Em conjunto, os resultados propõem o mecanismo pelo qual o extrato exerce sua ação farmacológica gastroprotetora e anti-inflamatória, tornando a espécie *C. lineatifolia* promissora para o desenvolvimento de um fitoterápico para o tratamento de úlceras gástricas.

#### Referências

- ABBAS, MA, KANDIL, YI, ABBAS, MM. (2021). Efficacy of extract from *Ononis spinosa* L. on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Tradit Chin Med*. 41(2):270-275.
- ABDALLAH HM, ESMAT A. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the major phenolics from *Zygophyllum simplex* L. *J Ethnopharmacol*. 205:51-56.
- ABREU MIRANDA M, LEMOS M, ALVES COWART K, RODENBURG D, D MCCHESENEY J, RADWAN MM, FURTADO NA, KENUPP BASTOS J. (2015). Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell. *J Ethnopharmacol*. 172:421-9.
- AHMAD A, GUPTA G, AFZAL M, KAZMI I, ANWAR F. (2013). Antiulcer and antioxidant activities of a new steroid from *Morus alba*. *Life Sci*. 27;92(3):202-10.
- AL BATRAN, R, AL-BAYATY, F, JAMIL AL-OBALDI, MM, ABDUALKADER, AM, HADI, HA, ALI, HM *et al*. (2013). In vivo antioxidant and antiulcer activity of *Parkia speciosa* ethanolic leaf extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *PLoS One*; 8(5): e64751.
- ALESSANDRI, AL,SOUSA, LP, LUCAS, CD, ROSSI, AG, PINHO, V, TEIXEIRA, MM. (2013). Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & therapeutics*, 139 (2): 189-212.

- ARISAWA, T. *et al.* (2006). Effects of sucralfate, cimetidine and rabeprazole on mucosal hydroxyproline content in healing of ethanol-HCl-induced gastric lesions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [S.I.], v. 33, n. 7, p. 628-632.
- AUGUSTO, AC, MIGUEL, F, MENDONCA, S, PEDRAZZOLI, JJR, GURGUEIRA, SA. (2007). Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin Biochem*; 40(9–10):615–622.
- BEBER, AP, DE SOUZA, P, BOEING, T, SOMENSI, LB, MARIANO, LNB, CURY, BJ, BURCI, LM, SILVA, CB, SIMIONATTO, E, ANDRADE, SF, DA SILVA, LM. (2017). Constituents of leaves from *Bauhinia curvula* Benth. exert gastroprotective activity in rodents: role of quercitrin and kaempferol. *Inflammopharmacology*, 26(2), 539–550.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- CABRAL CO, CAMPOS A, DA SILVA LM, BOEING T, DE ANDRADE SF, FILHO VC, NESELLO LÂN. (2017). Gastroprotective potential of methanolic extract and dimethyl cardamonin from *Campomanesia reitziana* fruits in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 390(6):661-666.
- CALIARI, M.V. Princípios básicos de morfometria digital: KS 300 para iniciantes. Ed. UFMG, 149p, 1997.
- DE BARROS M, MOTA DA SILVA L, BOEING T, SOMENSI LB, CURY BJ, DE MOURA BURCI L, SANTIN JR, DE ANDRADE SF, MONACHE FD, CECHINEL-FILHO V. (2016). Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of *Solidago chilensis* (Brazilian arnica) and its components quercitrin and afzelin in rodents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 389(4):403-17.
- FARZAEI MH, ABDOLLAHI M, RAHIMI R. (2015). Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. *World J Gastroenterol*. 21(21):6499-517.
- FERREIRA, LC, GRABE-GUIMARÃES, A, DE PAULA, CA, MICHEL, MC, GUIMARÃES, RG, REZENDE, SA, DE SOUZA FILHO, JD, SAÚDE-GUIMARÃES, DA. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol*. Jan 9;145(1):100-8.
- GIORDANO OS, GUERREIRO E, PESTCHANKER MJ (1990). The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J Nat Prod* 53: 803-809.
- GUARDIA, T, GUZMAN, JA, PESTCHANKER, MJ, GUERREIRO, E, GIORDANO, OS. (1994). Mucus Synthesis and Sulfhydryl Groups in Cytoprotection Mediated by Dehydroleucodine, a Sesquiterpene Lactone. *Journal of Natural Products*, 57(4), 507–509.
- HAYDEN, MS. & GHOSH, S. (2014). Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.*; 26(3):253-66.

- HENRIQUES, BO. *et al.* (2016). In Vitro TNF- $\alpha$  Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron adstringens* in an Acute Arthritis Model. *Evid Based Complement Alternat Med.*, v. 2016, Article ID 9872598, 15 pages.
- ISHIKAWA T, DONATINI RDOS S, DIAZ IE, YOSHIDA M, BACCHI EM, KATO ET. (2008). Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. *J Ethnopharmacol.* 13;118(3):527-9.
- LESCANO, C. H. *et al.* (2018). Effect of Polyphenols From *Campomanesia adamantium* on Platelet Aggregation and Inhibition of Cyclooxygenases: Molecular Docking and in Vitro Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 9:617, 1-13.
- LORENÇONI, MF, FIGUEIRA, MM, TOLEDO E SILVA, MV, PIMENTEL SCHMITT, EF, ENDRINGER, DC, SCHERER, R, BARTH, T, VILELA BERTOLUCCI, SK, FRONZA, M. (2020). Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *J Ethnopharmacology*. 24;252:112562.
- MADALOSSO, RC. *et al.* (2012). *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 772-779.
- MAITY B, BANERJEE D, BANDYOPADHYAY SK, CHATTOPADHYAY S. (2009). Regulation of arginase/nitric oxide synthesis axis via cytokine balance contributes to the healing action of malabaricone B against indomethacin-induced gastric ulceration in mice. *International Immunopharmacology*, 491–498.
- MOSMANN T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.
- SANGIOVANNI, E, VRHOVSEK, U, ROSSONI, G, COLOMBO, E, BRUNELLI, C, BREMBATI, L. *et al.* (2013). Ellagitannins from *Rubus berries* for the control of gastric inflammation: in vitro and in vivo studies. *PLoS One*; 8(8): e71762.
- SANTIN JR, LEMOS M, KLEIN-JÚNIOR LC, MACHADO ID, COSTA P, DE OLIVEIRA AP, TILIA C, DE SOUZA JP, DE SOUSA JP, BASTOS JK, DE ANDRADE SF. (2011). Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*;383(2):149-58.
- SATO H, MATSUI T, ARAKAWA Y. (2002). The protective effect of catechin on gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *J Gastroenterol*; 37: 106-111.
- SILVA OLIVEIRA FM, CLÁUDIA DE CARVALHO FERNANDES A, HENRIQUE DE CICCIO SANDES S, PRATA LO, JUNIOR MA, VILELA DA SILVA CA, CAMPOLINA-SILVA GH, LORENZO DE JESUS OLIVEIRA M, OLIVEIRA CA, NEUMANN E, NUNES ÁC, GOMES MA, CALIARI MV. (2021). Co-infection by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar typhimurium and *Entamoeba dispar* pathogenic strains enhances colitis and the expression of amoebic virulence factors. *Microb Pathog.*;158:105010.

- TRAN QTN, WONG WSF, CHAI CLL. (2017). Labdane diterpenoids as potential anti-inflammatory agents. *Pharmacol Res.*;124:43-63.
- VIANA AF, DA SILVA FV, FERNANDES HDE B, OLIVEIRA IS, BRAGA MA, NUNES PI, VIANA DDE A, DE SOUSA DP, RAO VS, OLIVEIRA RDE C, ALMEIDA SANTOS F. (2016). Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. *J Pharm Pharmacol.*;68(8):1085-92.
- WHO - World Health Organization. Peptic Ulcer Disease “Pharmaceuticals Closing a Surgical Gap”. Annex to Chapter 1. Priority Medicines for Europe and the World "A Public Health Approach to Innovation". Sept. 2004.
- YADAV SK, ADHIKARY B, CHAND S, MAITY B, BANDYOPADHYAY S, CHATTOPADHYAY S. (2012). Molecular mechanism of indomethacin-induced gastropathy. *Free Radical Biology & Medicine* 52,1175–1187.
- YADAV SK, ADHIKARY B, BANDYOPADHYAY S, CHATTOPADHYAY S. (2013). Inhibition of TNF- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B and JNK pathways accounts for the prophylactic action of the natural phenolic, allylpyrocatechol against indomethacin gastropathy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3776–3786.

---

## CAPÍTULO 8: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- HELICOBACTER PYLORI

---

### 8.1 Introdução

*Helicobacter pylori*, descoberta por Marshall e Warren (1984), é uma bactéria microaerofílica, gram-negativa, flagelada, em espiral encontrada no estômago de pacientes com gastrite crônica e úlceras pépticas, e infecta os estômagos de, aproximadamente, metade da população mundial (SMITH, 2015). O tratamento atual da infecção por *H. pylori* envolve uma combinação de um medicamento antissecretor, como inibidores da bomba de prótons, ou bloqueadores de H<sub>2</sub>, juntamente com dois ou três antimicrobianos (FALLONE *et al.*, 2016; CHEY *et al.*, 2017; MALFERTHEINER *et al.*, 2017; COELHO *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018). Como esperado para um regime terapêutico com múltiplos fármacos, vários efeitos adversos podem estar associados. Nesses casos, o paciente geralmente abandona o tratamento, contribuindo para o surgimento de cepas resistentes de *H. pylori*. (USTÜN *et al.*, 2006). Bi *et al.* (2014) demonstraram que os medicamentos fitoterápicos são eficazes no tratamento da úlcera gástrica com menos efeitos adversos e menores taxas de recidiva. Além disso, a combinação de medicamentos fitoterápicos e medicamentos convencionais exibe um efeito sinérgico contra a úlcera gástrica.

Tendo em vista que a úlcera gástrica está, principalmente, relacionada à infecção por *H. pylori*, foi proposta a avaliação da atividade anti-*H. pylori* do extrato, substâncias isoladas e óleo essencial da *C. lineatifolia*, objetivando-se a utilização da planta como agente alternativo ou adjuvante da terapia atual para o tratamento das infecções por *H. pylori*.

### 8.2 Materiais e métodos

Os estudos da atividade *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* foram realizados sob supervisão da Profa. Dra. Sinéad M. Smith, no *Department of Clinical Medicine, Trinity College Dublin, Trinity Centre, Adelaide and Meath Hospital, Dublin 24, Ireland*.

### 8.2.1 Material vegetal

A coleta das folhas de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. foi realizada conforme descrito nos itens 3.2.1 e 6.2.1.

### 8.2.2 Obtenção dos extratos

#### 8.2.2.1 Extrato etanólico otimizado

O extrato etanólico otimizado rico em fenólicos (EtOH R) foi obtido sob sistema contínuo de refluxo (EtOH R), conforme descrito no item 3.2.2.2.

#### 8.2.2.2 Frações polar e apolar

Para obtenção das frações polar (FP) e apolar (FA), realizou-se um fracionamento do extrato EtOH R por sistema de solventes Hexano: Acetato de etila: Metanol: Água, conforme descrito no item 5.2.2.

#### 8.2.2.3 Extrato aquoso (chá)

O extrato aquoso de *C. lineatifolia* foi preparado por infusão, dissolvendo-se 5,0 g das folhas secas e pulverizadas em 50 mL de água ultrapura fervente, sob banho de ultrassom, durante 20 minutos. Depois de filtrado, a água foi evaporada utilizando-se rotaevaporador, obtendo-se um resíduo marrom.

#### 8.2.2.4 Miricitrina e mistura miricitrina + quercitrina

O flavonoide purificado miricitrina (MIR) e a mistura, miricitrina e quercitrina (MIR/QUE), foram obtidos a partir da extração por infusão e partição líquido-líquido (item 5.2.3), seguido de HSCCC (item 5.2.5) e cromatografia por exclusão molecular (item 5.2.7).

### 8.2.3 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial (OE) foi obtido por hidrodestilação, utilizando-se um aparelho do tipo Clevenger, conforme descrito no item 6.2.2.

### 8.2.4 Atividade anti-*Helicobacter pylori*

#### 8.2.4.1 Cepas e condições de cultivo

As cepas de *H. pylori* 60190 (ATCC 49503, sensível à claritromicina), NCTC 11638 (cepa sensível à claritromicina), S SR359 (isolado clínico sensível à claritromicina) e S SR366 (isolado clínico resistente à claritromicina) foram cultivadas em ágar sangue Columbia, contendo 5% de sangue de ovelha e incubadas a 37 °C em condições microaeróbicas (CampyGen, Oxoid). Após o tempo de incubação, as bactérias foram inoculadas em caldo de infusão cérebro-coração (BHI, do inglês, *brain heart infusion*), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco). Os inóculos foram incubados à 37 °C, em condições microaeróbicas e sob agitação a 124 rpm, por 24h.

#### 8.2.4.2 Teste de suscetibilidade antibacteriana

As determinações das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos, substâncias isoladas e OE foram avaliadas utilizando-se o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, de acordo com o protocolo *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI, 2015). Todas as amostras foram diluídas com meio BHI suplementado com 10% de soro bovino e, para o OE, adicionado de 2% de DMSO (Sigma). Para a diluição, foram preparadas uma série de concentrações: 1000 – 0,49 µg/ml para EtOH R, FP, FA; 250 – 0,12 µg/ml for MIR e MIR/QUE; 2,5% - 0,6% para o OE; 1:10, 1:50 e 1:100 para o chá.

Alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana (escala McFarland 0,5, diluído 1:20) foram adicionadas em cada um dos 96 poços da placa. As culturas foram incubadas com alíquotas de 100 µL das amostras, durante 72 horas a 37 °C, em condições microaeróbicas, sob agitação (180 rpm). As absorbâncias em 600 nm foram lidas em espectrofotômetro Varioskan LUX microplate reader (Thermo Fisher Scientific). Após 72h, os valores das CIM foram

determinados como a menor concentração na qual não houve crescimento microbiano. A claritromicina foi utilizada como controle positivo, nas concentrações de 256 – 0,3 µg/mL.

### 8.2.5 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados analisados utilizando-se o programa *Graph Prism* versão 6.0. O teste *One-way ANOVA* seguido de pós-teste de Bonferroni foi empregado, considerando valores de  $p < 0.05$  como estatisticamente significativo. Os valores de CIM foram calculados considerando as menores concentrações que não diferiram estatisticamente do controle em meio BHI.

## 8.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos demonstram que todas as amostras testadas foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *H. pylori*. As CIM para as cepas testadas são mostradas na **Tabela 13**.

**TABELA 13** – Concentração inibitória mínima (CIM) para as amostras de *Campomanesia lineatifolia* contra *Helicobacter pylori*. Concentrações testadas: extrato etanólico rico em fenólicos (EtOH R), fração polar e fração apolar 1000-0,49 µg/mL; miricitrina e miricitrina+quercitrina 250-0,12 µg/mL; óleo essencial 2,5-0,6% e chá 1:10, 1:50, 1:100.

| Amostra                        | Cepas de <i>Helicobacter pylori</i> / CIM* |                        |                      |                      |
|--------------------------------|--------------------------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
|                                | ATCC 49503 <sup>a</sup>                    | NCTC11638 <sup>a</sup> | S SR359 <sup>b</sup> | S SR366 <sup>c</sup> |
| EtOH R                         | 0,49 µg/mL                                 | 0,49 µg/mL             | 125 µg/mL            | 250 µg/mL            |
| Fração polar                   | 500 µg/mL                                  | 0,49 µg/mL             | 125 µg/mL            | 250 µg/mL            |
| Fração apolar                  | 250 µg/mL                                  | 125 µg/mL              | 125 µg/mL            | 125 µg/mL            |
| Miricitrina                    | 62,5 µg/mL                                 | 250 µg/mL              | NI                   | 250 µg/mL            |
| Miricitrina + Quercitrina      | AI                                         | AI                     | 31,25 µg/mL          | AI                   |
| Óleo essencial                 | 0,6 %                                      | 0,6 %                  | 0,6 %                | 0,6 %                |
| Chá                            | 1:100                                      | 1:100                  | 1:100                | 1:100                |
| <b>Antimicrobiano controle</b> |                                            |                        |                      |                      |
| Claritromicina                 | 0,03 µg/mL                                 | 0,03 µg/mL             | 0,03 µg/mL           | 8 µg/mL              |

\*One-way Anova, post-test Bonferroni,  $p < 0.05$  (controle BHI). <sup>a</sup>Cepa sensível à claritromicina; <sup>b</sup>Isolado clínico sensível à claritromicina; <sup>c</sup>Isolado clínico resistente à claritromicina; AI = ausência de inibição.

Os protocolos recentes para o tratamento da infecção por *H. pylori* resistente à claritromicina incluem em sua primeira linha a terapia tripla com claritromicina (combinação de IBP de 2<sup>a</sup> geração, amoxicilina e claritromicina, por 14 dias) (COELHO *et al.*, 2018). No entanto, esses regimes têm várias desvantagens que incluem efeitos adversos graves e alto custo do tratamento, o que traz dificuldades para sua implementação na prática clínica e, muitas vezes, abandono do tratamento pelo paciente. Além disso, o uso de múltiplos agentes antimicrobianos no tratamento para a infecção por *H. pylori* pode aumentar o risco de resistência microbiana

futura (SUZUKI *et al.*, 2020). Neste cenário, novos regimes e abordagens que permitam um uso mínimo de antimicrobianos, por um período menor de tratamento são necessários.

Medicamentos à base de plantas são eficazes no tratamento da úlcera gástrica, e apresentam menos efeitos adversos e menores taxas de recorrência. Utilizados na terapia isoladamente ou em combinação com fármacos convencionais, podem ser tornar uma alternativa para tratar certas úlceras gástricas e prevenir sua recorrência (BI *et al.*, 2014). Assim, a combinação de medicamentos à base de plantas com atividade anti-*H. pylori* poderia melhorar o resultado para pacientes com úlcera gástrica.

Em 2017, a OMS listou a *H. pylori* resistente à claritromicina na categoria de alta prioridade, a qual requer atenção no tratamento. O ponto principal deste problema é que a resistência vem aumentando acentuadamente e, conseqüentemente, o sucesso dos regimes terapêuticos que incluem a claritromicina para a erradicação da infecção por essa bactéria vem decaindo (ABADI, 2017).

Neste estudo da atividade anti-*H.pylori*, o extrato EtOH R inibiu o crescimento das cepas comerciais sensíveis à claritromicina (0,49 µg/mL), bem como nos isolados clínicos sensível à claritromicina (125 µg/mL) e resistente à claritromicina (250 µg/mL). Para extratos de plantas, valores de CIM < 500 µg/mL são considerados valiosos e representam uma boa atividade antimicrobiana (WANG *et al.*, 2018). Considerando os valores de CIM aqui encontrados, estes resultados representam uma inibição potencial do extrato EtOH R contra a *H. pylori*. Esta é a primeira vez que se investiga o efeito do extrato etanólico de *C. lineatifolia* na inibição do crescimento da *H. pylori*. Quando se avaliaram as atividades dos flavonóis majoritários isolados do extrato, observou-se que a miricitrina inibiu o crescimento das cepas comerciais sensíveis à claritromicina (62,5 e 250 µg/mL), do isolado clínico resistente à claritromicina (250 µg/mL), mas não do isolado clínico sensível à claritromicina. Em contraste, na mistura de miricitrina e quercitrina, apenas o crescimento do isolado clínico sensível à claritromicina foi observado (31,25 µg/mL). Já para o chá, a menor concentração testada (1:100) foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas de *H. pylori*. É interessante notar que todos esses resultados se complementam, podendo sugerir que o sinergismo do fitocomplexo é importante para uma resposta inibitória do crescimento da *H.pylori* mais robusta. Voravuthikunchai, Limsuwan e Mitchell (2006) associam a presença de substâncias fenólicas nos extratos de *Punica granatum*

com a mudança na hidrofobicidade da superfície celular de *H. pylori*, o que contribui para a inibição de seu crescimento. Takabayashi *et al.* (2004) sugerem que as catequinas presentes no chá verde (*Camellia sinensis*) podem apresentar um efeito bactericida na infecção por *H. pylori* em modelo *in vivo* com gerbil. Além disso, miricitrina e quercitrina isoladas de plantas medicinais exibem atividade inibitória contra a enzima urease da *H. pylori* (MODOLO *et al.*, 2015). Spósito *et al.* (2019) relacionam o alto conteúdo de terpenoides do extrato etanólico da guaçatonga (*Casearia sylvestris*) com a atividade anti-*H. pylori* em modelos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados destes trabalhos sugerem que a matriz química em conjunto descrita neste estudo para o extrato das folhas de *C. lineatifolia* são os responsáveis pela potencial atividade anti-*H. pylori*.

É importante notar que, para as frações polar e apolar obtidas a partir do extrato EtOH R, as respostas de inibição do crescimento da *H. pylori* foram semelhantes tanto nas cepas comerciais sensíveis à claritromicina, quanto nos isolados clínicos sensível e resistente à claritromicina. Esses resultados sugerem que há a participação dos constituintes tanto polares quanto menos polares presentes no extrato de *C. lineatifolia*, na atividade anti-*H. pylori*, corroborando com a sugestão de que a matriz química de *C. lineatifolia* é responsável por essa atividade.

Diversos estudos demonstram que plantas que apresentam atividade anti-*H. pylori* apresentam em sua composição polifenóis, flavonoides, terpenoides, dentre outros constituintes ativos. Além disso, muitos produtos naturais podem suprimir os efeitos anti-inflamatórios induzidos pela infecção por *H. pylori*, e um dos mecanismos relevantes incluem a supressão da via de sinalização do NF- $\kappa$ B, MAPK e inibição do estresse oxidativo (WANG, 2014). As atividades anti-inflamatórias demonstradas para as substâncias químicas identificadas no extrato de *C. lineatifolia* envolvem este mesmo mecanismo e, neste trabalho (Capítulo 7), sugere-se a relação desses efeitos à presença dos flavonoides catequina, quercitrina e miricitrina, os terpenoides 14 $\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol, hidroxi-acetil hidroshengmanol xilopiranosídeo, rubescensina M e gaigrandina, a chalcona licurosídeo e o fitoecdisteroide decumbesterona A. Estudos adicionais da atividade anti-*H. pylori* com as substâncias isoladas são necessários para se estabelecer adequadamente essa relação da composição química com a atividade biológica descrita.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado o alto conteúdo de fenólicos do extrato etanólico e fração acetato de etila, relacionando, ainda, sua alta atividade antioxidante (BARBOSA, 2009; MADALOSSO *et al.*, 2012). Em infecções por *H. pylori*, observa-se uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esses radicais livres correlacionam-se com a formação do dano à mucosa gástrica e, ainda, contribuem para a colonização bacteriana (DAVIES *et al.*, 1994). É de se esperar que, tendo em vista seu alto poder antioxidante, o extrato de *C. lineatifolia* possa contribuir para a gastroproteção e, ainda, promover a inibição do crescimento de *H. pylori*. Estudos adicionais de atividade antioxidante para o extrato são necessários para se estabelecer mecanisticamente essa relação.

Para o óleo essencial, a menor concentração testada (0,6%) foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas de *H. pylori* testadas. Portanto, este estudo traz, pela primeira vez, a relação da composição química do OE e sua atividade anti-*H. pylori*. Como descrito anteriormente, foram identificados oito constituintes no OE, correspondendo a um total de 98,09% de sua composição total, sendo o 3-hexen-1-ol (46,15%) e o  $\alpha$ -cadinol (20,35%) os constituintes majoritários. O álcool 3-hexen-1-ol é descrito como um dos constituintes majoritários do OE das flores de *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae), e está relacionado com a atividade bacteriana frente às bactérias gram-positivas, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas lachrymans* (ZHAO *et al.*, 2018). Pino *et al.* (2010) também descrevem a presença de 3-hexen-1-ol como constituinte majoritário do OE das folhas de *Galinsoga parviflora* (Asteraceae) e demonstra que esse OE apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas *S. aureus* e *Bacillus cereus*. De maneira semelhante, este álcool correspondeu ao constituinte majoritário no OE de *C. lineatifolia* e, em conjunto com os dados descritos na literatura, pode-se sugerir sua potencial atividade anti-*H. pylori* observada neste estudo.

David *et al.* (2019) descrevem em seu estudo que o OE obtido por hidrodestilação das folhas de *Chrysopogon zizanioides*, a qual contém um derivado dieno do sesquiterpeno zizanol com perfil de fragmentação no espectro de massas idêntico ao da substância [3S-(3 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ )]-4,5,6,7,8,8a-hexahidro-3,7,7-trimetil-8-metileno-3H-3a,6-metanoazuleno que apresentou uma potente atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*, e uma atividade moderada para as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*. A mesma substância descrita acima foi identificada no OE de *C. lineatifolia*. Mulyaningsih *et al.* (2010)

identificaram que o aromadendreno aparentemente contribui significativamente para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, marcadamente em bactérias multirresistentes, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE), além de atividade contra a bactéria gram-negativa *Acinetobacter baumannii*. Para as espécies *Campomanesia adamantium* e *C. pubescens*, nas quais foram identificados o aromadendreno e  $\alpha$ -cadinol, o extrato hexânico dos frutos inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas, i.e., *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, demonstrando que as substâncias voláteis presentes demonstraram boa atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (CARDOSO *et al.*, 2010). Esses resultados, em especial frente às bactérias gram-negativas testadas, podem sugerir a relação destes sesquiterpenos com potencial atividade anti-*H. pylori*.

Para o  $\beta$ -curcumeno e  $\alpha$ -bisabolol, constituintes majoritários dos OE de *Curcuma* sp. (Zingiberaceae) e *Plinia cerrocampanensis* (Myrtaceae), respectivamente, são descritas as atividades anti-*H. pylori* (ZAIDI *et al.*, 2009; KOOSIRIRAT *et al.*, 2010; VILA *et al.*, 2010). Ainda, Brehm-Stecher e Johnson (2003) descrevem que o bisabolol é capaz de aumentar a permeabilidade da parede bacteriana e, conseqüentemente, a suscetibilidade a antibióticos de importância na clínica, sugerindo um possível mecanismo para sua atividade. Neste estudo, esses dois sesquiterpenos correspondem aos constituintes minoritários presentes no OE de *C. lineatifolia*, mas que, em conjunto, podem contribuir com a atividade anti-*H. pylori* observada.

## 8.4 Conclusões

Os resultados descritos neste capítulo sugerem que o extrato etanólico rico em fenólicos, fração polar, fração apolar, o chá e o óleo essencial obtidos das folhas de *C. lineatifolia* possuem atividade anti-*H. pylori*, o que reforça o seu uso popular como planta medicinal para o tratamento da úlcera gástrica. Além disso, a atividade observada frente aos isolados clínicos resistentes à claritromicina reforçam o potencial uso da espécie como coadjuvante nos regimes terapêuticos que envolvam pacientes com infecção por *H. pylori* resistente. As evidências da utilização de plantas medicinais na terapêutica demonstram que essas apresentam menos efeitos adversos e menores taxas de recorrência de infecções, em adição à redução do tempo e melhora da adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, são necessários estudos adicionais em modelos

*in vivo* e estudos clínicos, a fim de se propor os mecanismos pelos quais os constituintes químicos aqui descritos exercem sua atividade anti-*H. pylori*.

## Referências

- ABADI, ATB. (2017). Resistance to clarithromycin and gastroenterologist's persistence roles in nomination for *Helicobacter pylori* as high priority pathogen by World Health Organization. *World J Gastroenterol*. 23(35):6379–6384.
- BARBOSA, J. *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2009.
- BREHM-STECHER BF, JOHNSON EA. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother.*; 47(10):3357-60.
- BI, WP, MAN, HB, MAN, MQ. (2014). Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: A review. *World J Gastroenterol*, 20 (45): 17020-17028.
- CARDOSO, CAL, SALMAZZO, GR, HONDA, NK, PRATES, CB, VIEIRA, MC, COELHO, RG. (2010). Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia Species* (Myrtaceae). *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1273–1276.
- CHEY WD, LEONTIADIS GI, HOWDEN CW, MOSS SF. ACG. (2017). Clinical Guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 112:212–239.
- CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015.
- COELHO, LGV *et al.* (2018). IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter Pylori* Infection. *Arq. Gastroenterol.* [online]. 2018, vol.55, n.2 [cited 2021-05-05], pp.97-121.
- DAVIES GR, SIMMONDS NJ, STEVENS TR, SHEAFF MT, BANATVALA N, LAURENSEN IF, et al. (1994). *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut* 35: 179–185.
- DAVID A, WANG F, SUN X, LI H, LIN J, LI P, DENG G (2019). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash Essential Oil Extracted by Carbon Dioxide Expanded Ethanol. *Molecules* 24(10):1897.
- FALLONE CA, CHIBA N, VAN ZANTEN SV, et al. (2016). The Toronto consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* Infection in adults. *Gastroenterology*; 151:51–69.

- KOOSIRIRAT C, LINPISARN S, CHANGSOM D, CHAWANSUNTATI K, WIPASA J. (2010). Investigation of the anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* in *Helicobacter pylori*-infected patients. *International immunopharmacology*. 10: 815–818.
- LIU WZ, XIE Y, LU H, et al. (2018). Fifth Chinese National Consensus Report on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*; 23:e12475.
- MADALOSSO, RC. et al. (2012). *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. as a gastroprotective agent. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 772-779.
- MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN CA, et al. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*; 66:6–30.
- MARSHALL BJ, WARREN JR. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*; 1(8390):1311-5.
- MODOLO LV, DE SOUZA AX, HORTA LP, ARAUJO DP, DE FÁTIMA Â. (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *J Adv Res.*;6(1):35-44.
- MULYANINGSIH, S, SPORER, F, ZIMMERMANN, S, REICHLING, J, & WINK, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061–1066.
- PINO JA, GAVIRIA M, QUEVEDO-VEGA J, GARCÍA-LESMES L, QUIJANO-CELIS CE. (2010). Essential oil of *Galinsoga parviflora* leaves from Colombia. *Nat Prod Commun.*;5(11):1831-2.
- SMITH. SM. (2015). An update on the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *EMJ Gastroenterol*; 4:101–107.
- SPÓSITO L, ODA FB, VIEIRA JH, CARVALHO FA, DOS SANTOS RAMOS MA, DE CASTRO RC, CREVELIN EJ, CROTTI AEM, SANTOS AG, DA SILVA PB, CHORILLI M, BAUAB TM. (2019). *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Casearia sylvestris* leaf derivatives. *J Ethnopharmacol.*;233:1-12.
- SUZUKI S, GOTODA T, KUSANO C, IKEHARA H, ICHIJIMA R, OHYAUCHI M, ITO H, KAWAMURA M, OGATA Y, OHTAKA M, NAKAHARA M, KAWABE K. (2020). Seven-day vonoprazan and low-dose amoxicillin dual therapy as first-line *Helicobacter pylori* treatment: a multicentre randomised trial in Japan. *Gut.*;69(6):1019-1026.
- TAKABAYASHI F, HARADA N, YAMADA M, MUROHISA B, OGUNI I. (2004). Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.*;39(1):61–63.
- USTÜN O, OZÇELİK B, AKYÖN Y, ABBASOĞLU U, YESİLADA E. (2006). Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J Ethnopharmacol.*;108(3):457-61.

- VILA R, SANTANA AI, PÉREZ-ROSÉS R, VALDERRAMA A, CASTELLI MV, MENDONCA S, ZACCHINO S, GUPTA MP, CAÑIGUERAL S. (2010). Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampensis*, a new source of alpha-bisabolol. *Bioresour Technol.*; 101(7):2510-4.
- VORAVUTHIKUNCHAI SP, LIMSUWAN S, MITCHELL H. (2006). Effects of *Punica granatum* pericarps and *Quercus infectoria* nutgalls on cell surface hydrophobicity and cell survival of *Helicobacter pylori*. *J. Health Sci.*;52(2):154–159.
- WANG, F, MENG, W, WANG, B, and QIAO, L. (2014). *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 345, 196–202.
- WANG Y, WANG SL, ZHANG JY, SONG XN, ZHANG ZY, LI JF, LI S. (2018). Anti-ulcer and anti-*Helicobacter pylori* potentials of the ethyl acetate fraction of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Solanaceae) in rodent. *J Ethnopharmacol.*;211:197-206.
- ZAIDI SFH, YAMADA K, KADOWAKI M, USMANGHANI K, SUGIYAMA T. (2009). Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology.* 121 (2): 286-291.
- ZHAO J, JIANG L, TANG X, PENG L, LI X, ZHAO G, ZHONG L. (2018). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Flower Volatile Oils of *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum* and *Fagopyrum Cymosum*. *Molecules*;23(1):182.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, os objetivos propostos para espécie *Campomanesia lineatifolia* envolveram sua caracterização fitoquímica, estudos mecanísticos da atividade gastroprotetora e anti-inflamatória e a avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori*.

Inicialmente, com base em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (BARBOSA, 2009 e MADALOSSO *et al.*, 2012), foram realizados ensaios de otimização da extração da droga vegetal das folhas de *C. lineatifolia* para obtenção de extrato rico em fenólicos, considerando o alto teor de flavonoides e taninos da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico, bem como sua alta atividade antioxidante. A partir do planejamento extrativo, foi possível selecionar o sistema de extração por refluxo utilizando-se etanol como solvente como aquele enriquecido em fenólicos (EtOH R) (NEVES *et al.*, 2020).

Em sequência, as análises cromatográficas do extrato otimizado EtOH R permitiram identificar e selecionar os marcadores químicos flavonoídicos, quercitrina e miricitrina, para o desenvolvimento de método analítico em CLUE para sua quantificação em derivados vegetais da espécie. Ainda, por meio das análises cromatográficas e espectroscópicas, quinze substâncias químicas foram identificadas no extrato EtOH R, sendo três delas já descritas para a espécie (catequina, quercetrina e champanona D) e as outras doze inéditas (miricetrina, ácido birsônico, 14 $\alpha$ -hidroxi-15-acetoxisclareol, gaigrandina, licurosídeo, decumbesterona A, ácido heptanoico, criptocariol C, (iso)leptospermona, hidroxi-acetilhidroshengmanol-xilopiranosídeo, rubescensina M e gingerglicolipídio A). Para o óleo essencial obtido das folhas, foram identificadas oito substâncias, que representaram 98,09% da composição total, 3-hexen-1-ol,  $\alpha$ -cadinol, 1,1-dietoxietano, e 2,3-diciano-7,7-dimetil-5,6-benzonorbornadieno, aromadendreno 2, [3S-(3 $\alpha$ , 3a $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 8a $\alpha$ )]-4,5,6,7,8,8a-hexahidro-3,7,7-trimetil-8-metileno-3H-3a,6-metanoazuleno,  $\alpha$ -bisabolol e  $\beta$ -curcumenol.

A investigação do potencial bioativo do extrato etanólico rico em fenólicos em modelo *in vitro* de inflamação sugere que o extrato apresenta um efeito anti-inflamatório promissor, o qual é mediado pelo decréscimo do mediador pró-inflamatório TNF- $\alpha$ , e ainda, pela inibição da via de sinalização do NF- $\kappa$ B, através das proteínas I $\kappa$ B $\alpha$  e Erk1/2. Nos modelos *in vivo*, o extrato foi capaz de reduzir a produção de IL-6, CXCL-1 e via NF $\kappa$ B (P-I $\kappa$ B $\alpha$ ). Também foi demonstrada

a atividade gastroprotetora, associada à redução das áreas de necrose na mucosa gástrica e aumento da produção do muco protetor. Os ensaios de atividade anti-*H. pylori* demonstraram que o extrato etanólico rico em fenólicos, óleo essencial e chá foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, inclusive em isolados clínicos resistentes à claritromicina.

Em conjunto, esses resultados sugerem que a matriz química tanto do extrato etanólico rico em fenólicos quanto do óleo essencial pode ser responsável pela atividade anti-inflamatória e anti-*H. pylori* observada, validando o uso popular da espécie *C. lineatifolia*, além de demonstrar a potencialidade de um fitoterápico com múltiplos alvos para o tratamento alternativo ou adjuvante de úlceras gástricas, inclusive associadas à infecção por *H. pylori*.

**ANEXO A – PROTOCOLO CEUA/UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 165/2018

Título do projeto: Avaliação da atividade gastroprotetora de extratos de Campomanesia modelos experimentais de lesões gástricas

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Rachel Oliveira Castilho

Unidade: Faculdade de Farmácia

Departamento: Departamento de Produtos Farmacêuticos

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 09/07/2018. Validade: 09/07/2018 à 08/07/2023

Belo Horizonte, 09/07/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)