

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PAULA PIO DE OLIVEIRA SALEM

**FITOQUÍMICA, METABOLÔMICA E AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIUROLÍTICA DE *Cissus gongylodes***

Alfenas/MG

2019

PAULA PIO DE OLIVEIRA SALEM

FITOQUÍMICA, METABOLÔMICA E AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIUROLÍTICA DE *Cissus gongylodes*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Química Orgânica
Orientadora: Profa Dra Daniela Aparecida Chagas de Paula

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S163f Salem, Paula Pio de Oliveira.
Fitoquímica, metabolômica e avaliação anti-inflamatória e antiurolítica de *Cissus gongylodes*. -- Alfenas/MG, 2019.
82f. : il. --

Orientadora: Daniela Aparecida Chagas de Paula.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Vitaceae. 2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. 3. Edema. 4. Oxalato de Cálcio. 5. Estruvita. I. Paula, Daniela Aparecida Chagas de. II. Título.

CDD-547

PAULA PIO DE OLIVEIRA SALEM

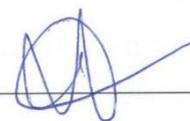
FITOQUÍMICA, METABOLÔMICA E AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIUROLÍTICA DE *Cissus gongylodes*

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 06/09/2019

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula
Universidade: Universidade Federal de Alfenas

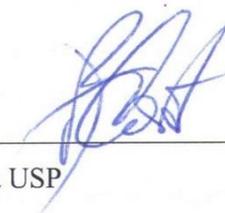
Assinatura:



Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Universidade: Faculdade de Ciências Farmacêutica de Riberão Preto da USP

Assinatura:



Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Universidade: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência e por iluminar o meu caminho a cada dia. Minha vida tem sido marcada por realizações e conquistas diárias, que às vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a Sua graça se faz presente em todos os momentos. Hoje, mais do que nunca, compreendo a existência e a força de Deus e sei que essa força me ajudou a finalizar mais essa conquista. E ainda, essa força me fará seguir sempre em frente por qualquer caminho que eu faça. Se eu e minha família vencemos, foi porque Deus esteve conosco a cada momento. Se nada conseguirmos, ele continuará junto a nós e se continuarmos a persistir, juntos venceremos.

Mãe e Pai, a vocês devo tudo que sou hoje, nos ensinamentos da vida, foram mestres e durante minha caminhada, ensinaram a agir com dignidade, honestidade e respeito. Como lição, aprendi a ser responsável, humilde e a ser perseverante. Com carinho, dedicação e amor, consegui vencer sempre apoiada por vocês, aprendi a lutar e enfrentar os obstáculos da vida e por isso amadureci. Dificuldades foram ultrapassadas, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Acreditaram em mim e hoje sou fruto dessa confiança. Uma etapa foi cumprida e uma nova fase se inicia. Pai, sei que sua ausência de corpo foi a vontade de Deus e confesso que fico triste as vezes, mas sei que está a todo momento comigo e estará até o fim e é isso que me fortalece a cada minuto. Muitos foram os momentos em que meu cansaço e preocupação foram divididos com vocês, que sempre procuram amenizar a minha ansiedade. Muitas das vezes pensei em desistir, chorei e desaminei e vocês deram força para vencer os obstáculos e me incentivaram a prosseguir. A vocês ofereço a minhas vitórias e agradeço os passos apoiados na infância e os ensinamentos de toda a vida.

Aos meus familiares e o amigos que conquistei agradeço por terem acreditado em mim e por estarem juntos na minha caminhada, mesmo de longe torceram por esta conquista e em especial a minha avó Elza (*in memoriam*), tão querida e adorável pela sua simplicidade de viver a vida.

Aos meus filhinhos de patas; Bilu (*in memoriam*), Magrinho, Gordinho e Fred agradeço por seus amores incondicionais, suas companhias e por fazerem transbordar nossa família de amor e alegria. Obrigada por me inspirar a cuidar e lutar pelo bem de todas as formas de vida.

Ao meu grande amor, Murilo Alexandre, que me ensinou a ser otimista nos acontecimentos da vida e me fez compreender que o amor é algo maior do que eu havia conhecido. Agradeço pelo seu carinho e dedicação comigo, por sempre me fazer sentir a pessoa mais amada neste mundo. Além de apoiar e nunca deixar que meu casaço e angustia fizessem com que eu desistisse. Por compartilhar seus sonhos, conquistas e lutas. Aos seus pais Cidinha, Inacinho e irmãos Kellen e Marcelo que gentilmente compartilharam e me acolheram como parte da sua família.

A minha orientadora Dra. Daniela Chagas que confiou em mim este trabalho tão especial, e não mediu esforços para o desenvolvimento dele. Levarei comigo seus ensinamentos e conselhos para a vida toda. Sua motivação, entusiasmo e otimismo foram de grande valia para a construção do meu desenvolvimento intelectual e pessoal e é um orgulho tê-la como uma grande amiga.

Às minhas queridas professoras Dra. Danielle e Dra. Marisi, agradeço muito por todas as oportunidades e confiança que a mim confiaram, pelos conhecimentos e ensinamentos compartilhados. Espero de todo o coração ter correspondido às suas expectativas e sempre ter a orientação e amizade de vocês.

A todos os demais professores que tanto me ensinaram ao longo de toda à minha vida acadêmica: Amanda, Célia, Claudinha, Tonon, Márcia, Vanesa Giroto, Keila, Wesley, Maria Vanda, Romulo, Ivo em especial Fabrício que sempre me abriu as portas da sua sala a qualquer momento. Essas pessoas são muito especiais e me incentivaram a buscar os meus sonhos, sempre terei vocês como grandes exemplos.

Por fim e não menos importante a família do LFQM pela amizade, pelos conhecimentos e conquistas compartilhadas. A eles Welton, João Luiz, Mylbia, Miller, Mário, Albert, Victor, Laís, Dani Cabral, Dani Garcia, Larissa, Marcela, Daniel, Gabriel, Andreza, Heloísa e Bárbara. Especialmente aos meus amigos Nátalie, Karen e Luiz Paulo por tornarem os dias mais leves e divertidos no laboratório. E também por tornarem a mesa do café da tarde mais divertida e gostosa. A esses amigos, sempre tão dispostos a nos ajudar e ensinar, com sabedoria e humildade, saibam que vocês fizeram grande diferença no meu desenvolvimento e foi muito bom conviver e aprender com todos vocês!

A UNIFAL-MG e ao PPGQ pela minha formação acadêmica e a todos os funcionários desta universidade, técnicos dos laboratórios, em especial à querida Glorinha, Sueni, Adriana, Carol, Tassi e Patrícia. Aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (42797/2018-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-02353-17, APQ 03701-17 Programa para o SUS) e Financiadora de Estudos e Projetos pelo suporte financeiro imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho.

De modo geral, agradeço a todos que em algum momento passaram pela minha vida, me ajudaram a evoluir e tornaram possível a realização deste trabalho. Por fim, à todos vocês o meu OBRIGADA!

RESUMO

O processo inflamatório está relacionado com o mecanismo de defesa do sistema imunológico e também está relacionado com diversas doenças como a artrite e asma. Já a urolitíase é uma doença de ocorrência mundial, conhecida como cólica renal e a sua origem é considerada multifatorial. Uma das causas do cálculo renal pode ser devido a distúrbios metabólicos, que causam a elevação da saturação de sais na urina. Após a formação dos cálculos, estes podem ocasionar obstrução no trato urinário e iniciar um processo inflamatório, resultando assim em uma dor insuportável e formação de edemas no local. Para o tratamento da urolitíase são utilizados medicamentos que possam atuar na regulação dos distúrbios metabólicos, inibidores na formação dos cálculos, anti-inflamatórios e antibióticos. Atualmente não existem medicamentos satisfatórios capazes de dissolver os cálculos renais e que também atuem como multi-alvo contra a urolitíase. A *Cissus gongylodes* é uma planta alimentícia não convencional, cujo o histórico etnofarmacológico descreve o uso do seu decocto tanto como anti-inflamatório quanto como antiurolítico. Porém, não há nenhuma evidência científica para estas propriedades, e a composição química do decocto nunca foi caracterizada. Neste trabalho foi avaliado o potencial anti-inflamatório e antiurolítico do decocto obtido de *C. gongylodes*. Para isso, foi realizado o ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos para avaliar a ação anti-inflamatória e o mecanismo de ação das substâncias químicas presentes no decocto. Ensaio *in vitro* que avaliam a inibição e a dissolução dos dois tipos mais recorrentes de cálculo renal, oxalato de cálcio e estruvita, foram realizados com o decocto. Também foram realizadas etapas de fitoquímica e avaliação do perfil químico do decocto por UHPLC-UV-HRMS. O decocto obtido de *C. gongylodes* demonstrou atividade anti-inflamatória sendo capaz de inibir as duas principais vias do processo inflamatório, a ciclooxigenase e a lipoxigenase. Além de também apresentar a ação multi-alvo na inibição e dissolução dos cristais de maiores prevalência, oxalato de cálcio e a estruvita. O estudo fitoquímico permitiu o isolamento do fenilpropanoide (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal pela primeira vez no gênero. O estudo metabolômico permitiu a caracterização do decocto como rico em substâncias fenólicas como: flavonoides, flavonoides glicosilados e fenilpropanoides. Então, todos estes resultados confirmam o histórico etnofarmacológico de *C. gongylodes*, revelam que a espécie é rica em substâncias fenólicas e é extremamente promissora para o desenvolvimento de tratamentos antiurolíticos e anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Vitaceae. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Edema. Oxalato de Cálcio. Estruvita.

ABSTRACT

The inflammatory process is related to the defense mechanism of the immune system and it is also related to various diseases such as arthritis and asthma. Urolithiasis is a worldwide disease known as renal colic and its occurrence is considered multifactorial. One of the causes of kidney stones may be due to metabolic disorders, which cause increased salt saturation in the urine. After stone formation, these can cause obstruction in the urinary tract and initiate an inflammatory process, thus resulting in unbearable pain and edema formation at the site. For the treatment of urolithiasis are used drugs that can act in the regulation of metabolic disorders, inhibitors of stone formation, anti-inflammatory and antibiotics. There are not currently satisfactory drugs that can dissolve kidney stones and also act as a multi-target against urolithiasis. The *Cissus gongylodes* is an unconventional food plant whose ethnopharmacological historic describes the use of its decoction as both anti-inflammatory and anti-urolithiatic. However, there is not none scientific evidence for these properties, and the chemical composition of the decoction has never been characterized. In this study we evaluated the anti-inflammatory and anti-urolithiatic potential of the decoction obtained from *C. gongylodes*. For this purpose, the mice croton-induced ear edema assay was performed to evaluate the anti-inflammatory action and the mechanism of action of the substances from the decoction. *In vitro* assays that evaluate the inhibition and dissolution of the two most prevalent types of renal stone, calcium oxalate and struvite, were performed with the decoction. Phytochemistry steps were performed, and decoction chemical profile were evaluated by UHPLC-UV-HRMS. The decoction obtained from *C. gongylodes* demonstrated anti-inflammatory activity being able to inhibit the two main pathways of the inflammatory process, cyclooxygenase and lipoxygenase. It is also presents the multi-target action inhibiting and dissolving the most commonly prevalent crystals, calcium oxalate and struvite. The phytochemical study allowed the isolation of a phenylpropanoid (*E*)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-enal for the first time in this species. The metabolomic study allowed the chemical characterization of the decoction as rich in phenolic compounds and glycosylated flavonoids. Thus, all results confirmed the ethnopharmacological historic of *C. gongylodes*, revealed that the species is rich in phenolic substances, and it is extremely promising to development of anti-urolithiatic and anti-inflammatory treatments.

Keywords: Vitaceae. High Pressure Líquido Chromatography. Edema. Calcium Oxalate. Struvite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Folhas e frutos maduros da <i>Vitis vinifera</i> e verdes da <i>Vitis labrusca</i>	15
Figura 2 – Representação da molécula 3,5,4'-tri-hidroxi- <i>trans</i> -estilbeno (resveratrol).....	16
Figura 3 – Representação das substâncias isoladas da espécie <i>V. vinifera</i>	17
Figura 4 – Representação estrutural das substâncias (8) canferol 3- α -ramínosideo, (9) quercetina 3- α -ramínosideo, (10) kaempferol, (11) lanceolatina B, (12) cumarina glicosilada.	23
Figura 5 – Folhas, caules e inflorescência de <i>Cissus gongylodes</i>	24
Figura 6 – Representação do sistema urinário.	28
Figura 7 – Representação da técnica do crescimentos dos cristais de struvita no gel.	39
Figura 8 – Cromatogramas em 254 nm do (A) decocto das folhas e (B) a fração FoAc	42
Figura 9 – Cromatograma em 254 nm da fração (PS-IJK)	43
Figura 10 – Avaliação da atividade anti-inflamatória do decocto das folhas de <i>C. gongylodes</i> no modelo de edema de orelha em camundongos.....	45
Figura 11 – Efeito do decocto na concentração de PGE ₂	46
Figura 12 – Efeito do decocto na concentração de LTB ₄	47
Figura 13 – Comparação do halo formado entre o decocto (placa esquerda) e o controle positivo citrato de sódio (placa direita) na dosagem de 150 mg/mL.	48
Figura 14 – Percentual de inibição da formação de cristais de CaOx nas amostras incubadas por um período de 8 h.....	49
Figura 15 – (a) Cristais do tipo COD presente na urina da paciente, (b) cristal com a morfologia diferente na presença do Cystone [®] (c) cristais do tipo COD presentes no decocto.	50
Figura 16 – Número de cristais de CaOx avaliados no período 24, 48 e 72 h.....	51
Figura 17 – Avaliação do crescimento dos cristais de estruvita incubados por 48 h (a) veículo, (b) Cystone [®] 2% e (c) decocto 2%. Análise do crescimento ao final do experimento (30 dias de incubação) (d) veículo (e) Cystone [®] 2% and (f) decocto 2%.....	52
Figura 18 – (a) Percentual de inibição na concentração de 0,5, 1 e 2%, (b) A massa dos cristais de estruvita nas diferentes amostras e concentrações avaliadas.....	53
Figura 19 – Diferentes tipos de morfologia (a) struvite (b) cristal na presença do decocto 0.5% (c) na presença do Cystone [®] 1% e no (d) decocto 1%.....	54
Figura 20 – Cromatograma de UHPLC-HRMS no modo positivo do decocto da <i>C. gongylodes</i>	56
Figura 21– Cromatograma de UHPLC-HRMS no modo negativo do decocto da <i>C. gongylodes</i>	57
Figura 22 – Cromatograma em 254 nm da substância 1.....	62

Figura 23 – Curva de absorção no UV da substância 1.	62
Figura 24 – Representação do fenilpropanoide denominado de <i>(E)</i> -3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal.....	65
Figura 25 – Representação do metileugenol.	65
Figura 26 – Espectro de RMN de ¹ H do <i>(E)</i> -3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal, 300 MHz, DMSO-d ₆	81
Figura 27 – Espectro de RMN de ¹³ C do <i>(E)</i> -3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal, 75 MHz, DMSO-d ₆	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Extratos e substâncias do gênero *Cissus* que apresentam atividades biológicas 18

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Método MRM de cada analito.....	37
Tabela 2 – Efeito do decocto no teste de edema da orelha exibido em percentagem de inibição	44
Tabela 3 – Desreplicação das substâncias presentes no decocto detectados por UHPLC-HRMS no modo negativo, usando banco de dados de <i>Cissus</i>	58
Tabela 4 – Desreplicação das substâncias presentes no decocto detectados por UHPLC-HRMS no modo positivo, usando banco de dados de <i>Cissus</i>	59
Tabela 5 – Dados de RMN do (<i>E</i>)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ADP	Dihidrogeniofosfato de Amônio
AIES	Anti-Inflamatório Esteroidais
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
CaOx	Oxalato de Cálcio
CAP	Cloranfenicol
COD	Oxalate de Cálcio Dihidratado
COM	Oxalato de Cálcio Monohidratado
COX	Ciclooxigenases
ESI	<i>Eletrospray</i>
HPLC	<i>High performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
LT	Leucotrienos
TX	Tromboxanos
LOX	Lipoxigenase
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MS/MS	Espectrometria de Massa/Massa
PANC	Plantas Alimentícias Não Convencionais
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
QqQ	Triplo Quadrupolo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SS	Acetato de Magnésio Tetra hidratado
SMS	Metasilicato de Sódio
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
λ_{\max}	Comprimentos de Absorção Máximo no UV

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	FAMÍLIA VITACEAE.....	15
2.2	GÊNERO <i>Cissus</i>	17
2.3	ESPÉCIE <i>Cissus gongylodes</i>	23
2.4	PROCESSO INFLAMATÓRIO	26
2.5	UROLITÍASE	27
2.6	METABOLÔMICA	30
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5	METODOLOGIA	34
5.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
5.1.1	Coleta da <i>C. gongylodes</i>	34
5.1.2	Preparo do decocto.....	34
5.2	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	34
5.2.1	Animais	34
5.2.2	Edema de orelha.....	35
5.2.3	Avaliação da concentração dos mediadores PGE ₂ e LTB ₄ nos fragmentos de edema de orelha	36
5.3	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIUROLÍTICA.....	37
5.3.1	Método de disco-difusão em ágar	37
5.3.2	Avaliação da dissolução CaOx na urina fresca.....	38
5.3.3	Técnica de crescimento de estruvita pela difusão em gel	38
5.4	ANÁLISE METABOLÔMICA POR UHPLC-UV-HRMS E DESREPLICAÇÃO	40
5.5	FITOQUÍMICA	41
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	44
6.1.1	Edema de orelha.....	44

6.1.2 Avaliação da concentração dos mediadores PGE ₂ e LTB ₄ nos fragmentos de edema de orelha	45
6.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIUROLÍTICA.....	47
6.2.1 Método de disco-difusão em ágar	47
6.2.3 Crescimento do cristal estruvita pela difusão em gel.....	52
6.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E DESREPLICAÇÃO.....	56
6.4 ESTUDO FITOQUÍMICO	62
6.4.1 Determinação estrutural da substância 1.....	63
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICES.....	81

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais tem sido usadas pela população para o alívio de diversas enfermidades, como diabetes, infecções, calmantes, gripe e dores em geral e o seu uso atinge cerca de 80% da população mundial (ZENI et al., 2017). A preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade, utilizando as plantas para fins alimentícios e medicinais (SHENG-JI, 2001; BRANDÃO et al., 2008). No entanto, há necessidade de estudos científicos comprobatórios das suas atividades biológicas, sua toxicidade e determinação de dosagem farmacologicamente ativa e segura (CRUCES et al., 2013).

As plantas com histórico etnofarmacológico possuem maior potencial de serem farmacologicamente ativas e revelarem substâncias de grande importância terapêutica e de interesse farmacêutico (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005). Assim sendo, podem revelar substâncias líderes para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos e merecem ser estudadas (PINTO et al., 2002; MAIER, 2015). Cerca de 64% dos fármacos aprovados de 1981 a 2014 foram desenvolvidos a partir de um produto natural, um exemplo disso é o fitoterápico Acheflan[®] indicado no tratamento de processos inflamatórios tais como, tendinites, dores musculares e contusões (CALIXTO, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2016). Os princípios ativos do Acheflan[®] foram isolados do óleo essencial da espécie *Cordia verbenacea*, família Boraginaceae, que além de ser um produto natural também possuía histórico etnofarmacológico com anti-inflamatório. O fitofármaco é considerado uns dos primeiros medicamentos a ser desenvolvido e produzido no Brasil, pela empresa multinacional Aché em parceria com quatro universidades brasileiras UFSC, UNIFESP, PUC-Campinas, UNICAMP (KOEHN; CARTER, 2005).

Várias espécies com históricos etnofarmacológico ainda não foram estudadas quanto ao seu real potencial farmacológico. Dentre elas podemos citar a *C. gongylodes*, da Vitaceae, que é utilizada para tratamento de processos inflamatórios e de pedras nos rins, sem qualquer evidência científica (PIRKER et al., 2012; AHMED; HASAN; MAHMOOD, 2016; AHMED; HASAN; 2017). Sendo portanto, importante estudar estas espécies não somente pelo seu maior potencial em revelar propriedades de relevância terapêutica, mas também para gerar conhecimento para a população usuária destas plantas medicinais (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005).

Doenças como asma e artrite reumatoide, dentre muitas outras que estão relacionadas com o processo inflamatório, podem ser tratadas com anti-inflamatórios esteroidais (AIES) e não esteroidais (AINES). Os AINES clássicos, como aspirina e ibuprofeno, atuam no processo inflamatório, inibindo principalmente a produção de prostaglandinas (PG) (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014). Já os AIES, como exemplo o fármaco dexametasona, são capazes de inibir a inflamação

centralmente, via inibição do fator de transcrição nuclear κ B e da fosfolipase A2. Desta maneira acabam sendo excelentes anti-inflamatórios, mas por outro lado possuem vários efeitos colaterais importantes, o que restringe um pouco sua utilização, em especial em tratamentos de processos inflamatórios crônicos (KOEBERLE; WERZ, 2015).

Já a urolitíase é uma doença mundialmente conhecida como cálculo renal e estima-se que mais de 12% da população mundial sofrem dessa enfermidade (SHARMA; KHAN; AHMAD, 2016). A urolitíase é considerada um distúrbio urológico multifatorial, que consiste na formação de cálculos renais devido a diversos fatores, entre eles: genéticos, individuais, ambientais, metabólicos e infecciosos (GHELANI; CHAPALA; JADAV, 2016). As causas da formação dos cálculos ainda são controversas, mas dentre elas sugerem-se que podem ocorrer devido a um distúrbio metabólico, responsável por deixar a urina superaturada de sais, que por sua vez podem promover a cristalização dos cálculos, assim como pela ausência da produção de inibidores na formação dos cálculos (ERICKSON; VRTISKA; LIESKE, 2011).

Os cálculos formados na urolitíase de maiores ocorrência são de oxalato de cálcio (CaOx) e o estruvita. A formação de cálculos de CaOx esta associada à supersaturação dos sais de oxalato de cálcio na urina e os de estruvita à quadros infecciosos no aparelho urinário na maioria dos casos (KARAMAKAR; PATKI, 2010). Atualmente o tratamento da urolitíase envolve principalmente o uso de terapias que reduzem a dor e a inflamação causados pela obstrução dos cálculos, utilizando anti-inflamatórios, além do uso de antibióticos, substâncias inibidoras da formação de cálculos e em alguns casos cirurgias para a remoção dos cálculos (SAHA; VERMA, 2013). No entanto, ainda não existe na medicina moderna um medicamento que atue como multi-alvo na urolitíase e que seja capaz de dissolver completamente os cálculos renais (DAS et al., 2017; WANG et al., 2019). O polihierbal Cystone[®] é uma formulação comercial composta por várias espécies de plantas, que está sendo utilizado para o tratamento da urolitíase nos últimos 60 anos. Embora o Cystone[®] tenha sido alvo de grandes estudos ainda não há consenso do seu efeito ser benéfico no tratamento da urolitíase (ERICKSON; VRTISKA; LIESKE, 2011).

Para análise de plantas farmacologicamente ativas, misturas complexas e isolamento de substâncias inéditas e/ou de interesse farmacológico, a metabolômica tem demonstrando ser uma importante estratégia quando aliada aos estudos fitoquímicos e farmacológicos clássicos (CHAGAS-PAULA; ZHANG; EDRADA-EBEL, 2015). Essa estratégia utiliza-se de análises abrangentes e quantitativas dos metabólitos presentes numa matriz biológica (WOLFENDER et al., 2019). E pode ser classificadas como metabolômica direcionada (*targeted*), que tem como foco um conjunto de metabólitos conhecidos, ou metabolômica não-direcionada (*untargeted*), que avalia os perfis metabolômicos de forma mais abrangente na matriz biológica (GORROCHATEGUI et al., 2016).

Por sua vez, a técnica de desreplicação permite a identificação preliminar e mais rápida dos metabólitos detectados, com o auxílio de softwares *open source*, como o MZmine, e de banco de dados abrangentes como o dicionário de produtos naturais e alguns mais específicos como os *in house*. Desta forma é possível filtrar substâncias conhecidas e possivelmente inéditas que estejam presentes na matriz biológica de maneira otimizada e rápida (HENKE; KELLEHER, 2016).

Considerando o histórico etnofarmacológico da espécie *C. gongyloides*, as limitações dos medicamentos para tratamentos da urolitíase e a ocorrência do processo inflamatório na urolitíase, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória e antiurolítica do decocto desta espécie. Para isso foi utilizado o ensaio *in vivo* de edema de orelha para avaliação da atividade anti-inflamatória e ensaios *in vitro* para a avaliação da inibição e dissolução de dois principais tipos de cálculos renais, de CaOx e de estruvita. Além disso, foi proposta pela primeira vez a avaliação do perfil químico do decocto das folhas de *C. gongyloides* por UHPLC-UV-HRMS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção será abordada a revisão da literatura dos principais assuntos deste trabalho.

2.1 FAMÍLIA VITACEAE

A família Vitaceae compreende cerca de 12 gêneros e reúne mais de 800 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (HAVEN; EVERT; CURTI, 1978). Os principais centros de diversidade estão na América do Sul, do Norte, África, Austrália e Sudeste da Ásia. Podendo ser encontradas em matas, desertos, savanas, vegetação ribeirinha, ambientes alagados e vegetação de altitude (SOUZA; LORENZI, 2005). A família apresenta espécies de porte arbustivo e que podem possuir lianas com gavinhas, que se moldam a superfícies, enrolando-se e prendendo em qualquer tipo de suporte para manterem-se ereta (LOMBARDI, 2000).

As classes de substâncias mais descritas para a família Vitaceae são constituídas de substâncias fenólicas; como os flavonoides, ácidos clorogênicos e principalmente os estilbenos (AHMADU; ONANUGA; AQUINO, 2010; TARTAGLIONE et al., 2018). Os estilbenos são considerados fitoalexinas devido sua função de defesa pelas plantas, encontrados em diversas famílias, como Vitaceae, Fabaceae e Cyperaceae. Esses estilbenos são considerados um dos maiores grupos de ocorrência na família Vitaceae, já foram isolados e identificados em sete diferentes gêneros desta família, *Ampelopsis*, *Cayratia*, *Cyphostemma*, *Parthenocissus*, *Rhoicissus*, *Vitis* e *Cissus*. Além da diversidade estrutural das diversas substâncias fenólicas já descritas, estas apresentam um grande potencial farmacológico para diversas enfermidades (RIVIÈRE; PAWLUS; MÉRILLON, 2012).

O gênero *Vitis* é constituído por diversas variedades de uvas, como a espécie *Vitis vinifera* e *V. labrusca* (Figura 1), suas folhas, frutos e sementes são muito utilizadas pela população e pelas indústrias na produção de vinhos, sucos e óleos (DE SOUZA et al., 2006).

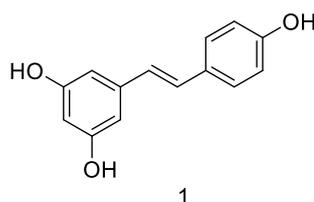
Figura 1– Folhas e frutos maduros da *Vitis vinifera* e verdes da *Vitis labrusca*



Fonte: GreenMe.com.br.

O gênero *Vitis* é um dos mais estudados devido a sua contribuição para o comércio e por possuírem diversas propriedades farmacológicas. As diferentes espécies de uvas deste gênero são ricas em polifenóis como o resveratrol (1) (Figura 2), que possuem evidências científicas sobre atividades antioxidantes, prevenção de problemas cardiovasculares, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes e redução do colesterol (DRESCH, 2018; JIMÉNEZ et al., 2018).

Figura 2 – Representação da molécula 3,5,4'-tri-hidroxi-*trans*-estilbeno (resveratrol)

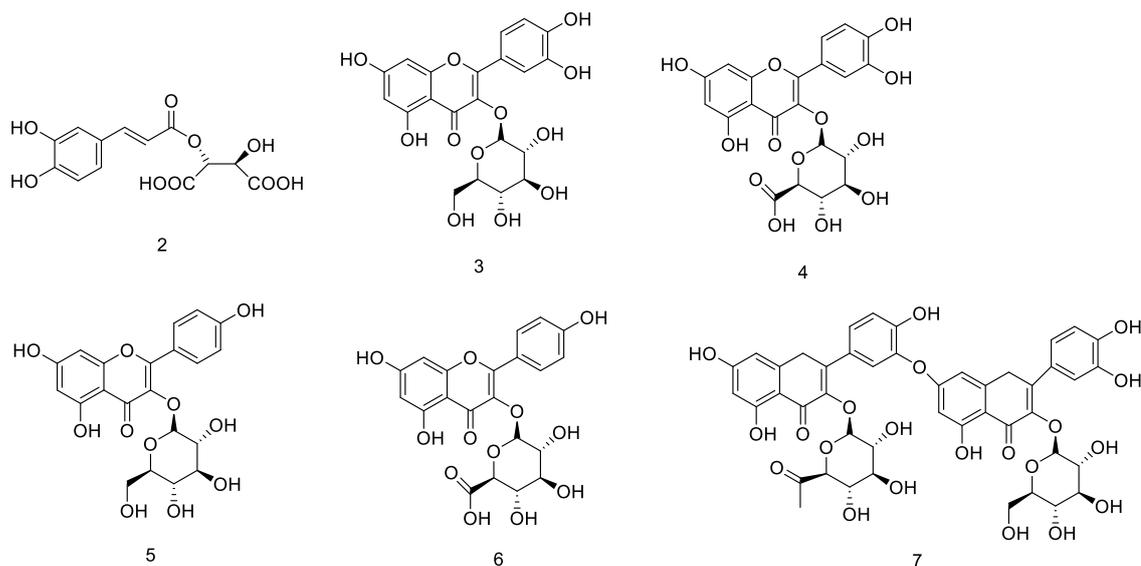


Fonte: Do autor.

Diversas atividades farmacológicas já foram atribuídas ao resveratrol, um estilbeno encontrado nas cascas das uvas. Estudos pré-clínicos demonstraram que o resveratrol possui a capacidade de eliminar os radicais livres do organismo, reduzir a geração de superóxido mitocondrial, estimular a biogênese das mitocôndrias e ser neuroprotetor (BAUR et al., 2006). Essas e outras atividades são atribuídas às hidroxilas fenólicas presentes nas estruturas dos estilbenos. Por essas e outras propriedades o uso de suco e vinho de uvas podem contribuir para uma vida mais saudável (XIA, et al., 2017).

Também foram descritos na literatura o isolamento e a identificação de várias substâncias presentes na espécie *V. vinifera*, como por exemplo, o ácido cafárico (2), quercetina-3-*O*- β -*D*-glucopiranosídeo (3), quercetina-3-*O*- β -*D*-glicuronídeo (4), o kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucopiranosídeo (5), o kaempferol-3-*O*- β -*D*-glicuronídeo (6) e o recentemente isolado o biflavonoide glicosilado (7), que possui atividade moderada contra a proliferação de células de melanoma metastático (TARTAGLIONE et al., 2018). Todos estes representados na (Figura 3).

Figura 3 – Representação das substâncias isoladas da espécie *V. vinifera*



Fonte: Do autor.

Os produtos naturais apresentam estruturas privilegiadas por serem biosintetizados por enzimas em estruturas complexas, ricas em centros quirais e grupos funcionais, enriquecendo assim a coleção de substâncias orgânicas biologicamente ativas a cada ano (MAIER, 2015) e a família Vitaceae também vem contribuindo para isso.

2.2 GÊNERO *Cissus*

O gênero *Cissus* é o maior gênero da família Vitaceae com cerca de 350 espécies, a maioria das quais são lianas mais conhecidas como trepadeiras e possuem grande diversidade morfológica, além de estarem amplamente distribuídas em regiões tropicais da África (135 espécies), nas Américas (77 espécies), sul da Ásia (85 espécies) e Austrália (12 espécies) (LOMBARDI, 2000; RODRIGUES; LOMBARDI; LOVATO, 2014). Na América do sul podem ser encontradas 65 espécies do gênero *Cissus*, sendo que no Brasil cerca de 50 espécies desse gênero podem ser encontradas nos biomas da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (SOUZA; LORENZI, 2005).

Até o momento várias espécies do gênero *Cissus* foram identificadas morfológica e filogeneticamente, principalmente pelo Prof. Dr. Julio Antonio Lombardi, atuante na Universidade Federal Paulista (UNESP) na área da Botânica, com ênfase na taxonomia de Fanerógamos de várias famílias dentre essas a Vitaceae. Nesse sentido, existem várias exsicatas de diferentes espécies do gênero *Cissus* que estão identificadas e depositadas no banco de dados da Re flora Brasil pelo autor Lombardi (LOMBARDI, 2015).

Estudos etnofarmacológicos descrevem diversas espécies do gênero *Cissus* como plantas medicinais utilizadas pela população em diversas regiões da Índia, Peru e Brasil (AHMED; HASAN; 2017). A exemplo disso tem o uso do chá das folhas da *C. quadrangularis* para tratamento de infecções de pele, feridas, anemias, queimaduras e no período de pós menopausa para prevenção de fratura óssea. Além disso, tem relatos dos caules desta espécie na alimentação por possuírem grande quantidade de vitamina C e betacarotenos (JAINU; DEVI, 2005; FERNANDES; BANU, 2012; LEKSHMI; RAJESH; MINI, 2015). A *Cissus duarteana*, mais conhecida como bactrim, também é considerada uma planta medicinal que é utilizada no tratamento de problemas renais (BIESKI et al., 2015). Além destas, diferentes espécies desse gênero tem mostrado diversas atividades biológicas relatadas na literatura (Quadro 1).

Quadro 1 – Extratos e substâncias do gênero *Cissus* que apresentam atividades biológicas

Espécies	Atividades biológicas	Extrato/Substância	Referências Continua
<i>C. adnata</i>	- Prevenção da urolitíase, dissolução do cálculo renal e antimicrobiano contra cepas <i>Proteus mirabilis</i> (MTCC 425), <i>Escherichia coli</i> (MTCC 729), <i>Pseudomonas stutzeri</i> (MTCC 2489), <i>Klebsiella pneumoniae sub sp. pneumoniae</i> (MTCC 432);	EEtOH ^a	Laikangbam et al., 2010**
	- Antioxidante*, antibacteriana** contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella paratyphi e Pseudomonas aeruginosa</i> , anti-helmínticas** verme de aquário <i>Tubifex tubifex</i> nas concentrações de 5, 8 e 10 mg/mL, para o tempo de paralisia entre 30 e 8 min, analgésica* dependente da dose e com baixa toxicidade** dose até 2000 mg/kg considerada segura.	EEtOH ^a	Shoibe et al., 2017*
<i>C. hastata</i>	- Tratamento do nervo ciático; - Mastite; - Colecistite aguda; - Anti-reumático.	Um dos componentes da Formulação	Patente CN 106421182, 2017 Patente CN 105125793, 2015 Patente CN 104984203, 2015 Patente CN 104840806, 2015

Quadro 1 – Extratos e substâncias do gênero *Cissus* que apresentam atividades biológicas

Espécies	Atividades biológicas	Extrato/Substância	Referências
<i>C. assamica</i>	- Tratamento de mastite; - Lesões esportivas; - Osteoproliferação;	Um dos componentes da formulação	Patente CN 106177532, 2016 Patente CN 106038846, 2016 Patente CN 104800663, 2015
	- Prevenção e tratamento de doenças coronárias;	Comprimido	Patente CN 102716273, 2012
	-Prevenção de complicações diabéticas.	EEtOH	Lee et al., 2013*
<i>C. discolor</i>	- Tratamento da vaginite; - Dermatite alérgica;	Um dos componentes usados em loção tópica	Patente CN 105726797, 2016 Patente CN 105687956, 2016
	- Espondilose cervical; - Acne; - Vitiligo; - Úlceras na boca.	Comprimido	Patente CN 105148208, 2015 Patente CN 104800429, 2015 Patente CN 103977224, 2014 Patente CN 102772695, 2012
<i>C. erosa</i>	- Atividade antiviral contra herpesvírus bovinos tipo 1 (BoHV-1) e reovírus aviário;	EA ^a	Simoni et al., 2007**
	- Antiviral contra vírus vaccinia (VACV).	EEtOH ^b	Brandão et al., 2011**
	- Antioxidante;	EMeOH ^a e EMeOH ^b	Omale et al., 2008**
	- Anti-inflamatório e antiulcerogênico;	EMeOH ^a	James et al., 2013*
<i>C. multistriata</i>	- Antibacteriana;	EMeOH ^f	Chukwuemeka et al., 2011**
	- Antioxidante;	EMeOH ^f	Omale et al., 2010**
	- Antibacteriana.	EMeOH ^a , EA ^a e ECHCl ₃ ^a	Adegoke et al., 2010**
<i>C. repens</i>	- Anti-inflamatório e analgésica;	EMeOH ^c	Chang et al., 2012*
	- Antimicrobiana contra <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> .	EEtOH ^b	Subba et al., 2014**

Quadro 1 – Extratos e substâncias do gênero *Cissus* que apresentam atividades biológicas

Espécies	Atividades biológicas	Extrato/Substância	Referências
<i>C. pallida</i>	- Antimicrobiana contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aureginosa</i> e antifúngica contra cepas <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus fumigados</i> , <i>Monoscus purpura</i> ;	EMeOH ^b	Selvan et al., 2014**
	-Anti-hiperlipidêmica e anti-aterosclerótica;	EEtOH ^c	Rahman et al., 2013*
<i>C. populnea</i>	- Atividade analgésica e contra ansiedade.	EMeOH ^d	Parimala et al., 2013*
	- Antioxidante;	EA ^b	Akomolafe et al., 2013*
	- Anemia falciforme;	EA ^d	Moody et al., 2003**
	- Espermatogênese em ratos machos;	EA ^d	Ojekale et al., 2015*
	- Aumento nas concentrações séricas de progesterona, estrogênio, folículo estimulante e luteinizante Hormonas; e diminuição dos níveis de prolactina no soro do sangue de ratas.	EA ^d	Yakubu et al., 2014*
<i>C. rotundifolia</i>	- Atividade antimalárica contra o parasita <i>Plasmodium falciparum</i> ;	EMeOH ^a e EA ^a	Alshawsh et al., 2007**
	- Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella infantis</i> ;	EMeOH ^a tamponado (80% de metanol com 20% de 5 mM de Solução salina de fosfato de sódio (PBS) e EAc ^a	Alzoreky et al., 2003**
	- Antidiabética;	Farinha integral a base <i>C. rotundifolia</i>	Onyechi et al., 2015*
	- Atividade em hemiplegia-paralisia e neuralgia.	EA ^d	Emmanuel, 2015*

Continua

Quadro 1 – Extratos e substâncias do gênero *Cissus* que apresentam atividades biológicas

Espécies	Atividades biológicas	Extrato/Substância	Referências
<i>C. quadrangularis</i>	- Propriedade anticâncer contra células de câncer de mama (MCF7) com valor de IC50 de 40 µg / mL;	EEtOH ^e	Vijayalakshmi et al., 2013**
	- Antiosteoporótico (com ratas ovariectomizadas);	EEtOH ^c	Shirwaikar et al. , 2003*
	- Potente inibição dos mediadores COX-1, COX-2 e 5-LOX;	EAcOEt ^b	Bhujade et al., 2012**
	-Anti-inflamatória;	EAcOEt ^b	Srisook et al., 2011**
	- Antioxidante, anti-inflamatório em ratos diabéticos e prevenção de diabetes mellitus;	EAcOEt ^b	Lekshmi et al., 2015*
	- Atividade estimulatória na diferenciação de células osteoblásticas MC3T3-E1;	EHex ^b	Pathomwachaiwat et al., 2015**
	- Atividade anti-inflamatória e analgésica;	EMeOH ^c	Panthong et al., 2007*
<i>C. sicyoides</i> L.	- Atividade antinociceptica.	ECHCl ₃ ^a	Mate et al., 2007*
	- Antilipênico;	EA ^a	Viana et al., 2004*
	- Contra liberação de β-hexosaminidase em células de leucemia basofílica (RBL2H3);	EMeOH ^a e EAcOEt ^a	Xu et al., 2009**
	- Antidiabético;	EA ^{a,b}	Salgado et al., 2009*
	- Anticonvulsivo e ansiolítico;	EEtOH ^a	Almeida et al., 2009*
	- Anti-inflamatório via oral e tópico e a inibição no recrutamento de neutrófilos;	EA ^b	García et al., 2000*
	- Antidiarreico;	EEtOH ^a	Beserra et al., 2016*
	- Gastroprotetor.	EMeOH ^a	Ferreira et al., 2008*
	- Inibira a enzima β-hexosaminidase pelas células RBL-2H3	Kaempferol ^e e lanceolatina B ^e	Xu et al., 2009**

Continua

Quadro 1 – Extratos e substâncias do gênero *Cissus* que apresentam atividades biológicas

Espécies	Atividades biológicas	Extrato/Substância	Referências	Conclusão
<i>C. verticillata</i>	- Antibacteriano apresentou atividade contra <i>Streptococcus mutans</i> - CMI de 0,31 µl/ml;	Óleo essencial ^a rendimento de 0,03% v/v de 50g	Miller et al., 2015**	
	- Antifúngica contra <i>Cladosporium sphaerospermum</i> ;	Resveratrol ^a (EAcOEt), biciclogermacreno ^a (ECHCl ₃)	Silva et al., 2007**	
	- Antidiabética;	EMeOH ^a	Lino et al., 2008*	
	- Atividade contra melanoma maligno epitelial (ATCC CRL-1619) e de língua (ATCC CRL-2095).	EMeOH e EAcOEt ^c	Cates et al., 2013**	

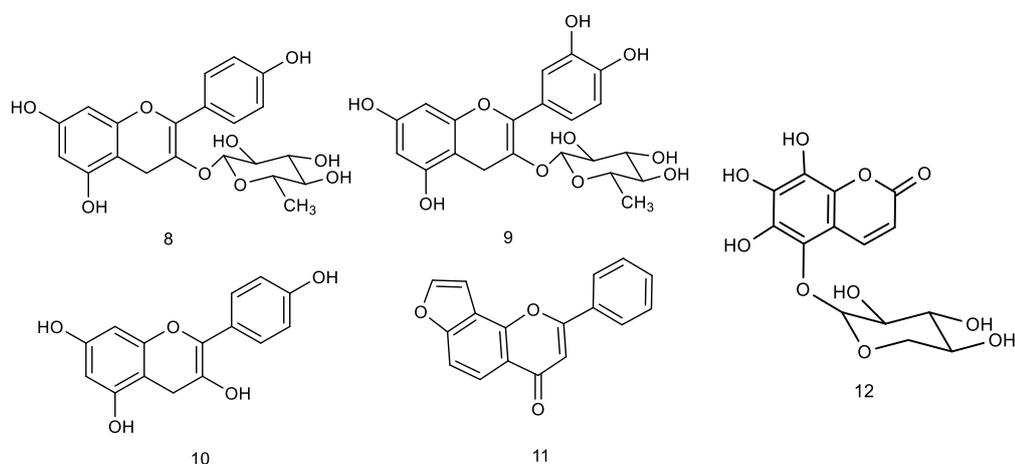
Fonte: Do autor.

Legenda: Extrato clorofórmio (ECHCl₃), Extrato metanólico (EMeOH), Extrato etanólico (EEtOH) Extrato aquoso (EA), Fração acetato de etila (AcOEt); ^a folhas, ^b Caule/haste, ^c Planta inteira, ^dRaízes, ^e Partes aéreas, ^ffrutos * avaliação *in vivo*, ** avaliação *in vitro*.

Assim como a *C. quadrangulares*, o uso do chá das folhas da espécie *C. sicyoides*, mais conhecida como cortina-japonesa, também é utilizada na medicina popular. A *C. quadrangulares* tem sido utilizada como anti-inflamatório, anti-hipertensivo, antitérmico e principalmente para tratar diabetes. Estudos *in vivo* revelaram que o extrato etanólico obtido de *C. sicyoides* apresenta atividade antidiabética, com redução dos níveis de glicose. Além disso, foram isolados e identificados dois flavonoides (Figura 4) canferol 3- α -ramínosideo (8) e quercetina 3- α -ramínosideo (9) nesta espécie (BELTRAME et al., 2001).

As substâncias kaempferol (10) e lanceolatina B (11), também presentes no extrato obtido de *C. sicyoides* foram avaliadas e apresentaram inibição na liberação da enzima β -hexosaminidase pelas células RBL-2H3, demonstraram melhores resultados que os medicamentos antialérgicos de referência, Tranilast[®] e Asmofen[®], que são utilizados no tratamento de bronquites, rinites e outras alergias (XU et al., 2009). Ainda desta espécie, foram isoladas do extrato metanólico das folhas, substâncias da classe das cumarinas glicosilas (12), sitosterol e flavonoides (BELTRAME, FERREIRA; CORTEZ, 2002).

Figura 4 – Representação estrutural das substâncias (8) canferol 3- α -ramínosídeo, (9) quercetina 3- α -ramínosídeo, (10) kaempferol, (11) lanceolatina B, (12) cumarina glicosilada



Fonte: Do autor.

Além das classes representadas na Figura 4, há outras pertencentes a este gênero que também foram descritas na literatura como, benzofuranos, antraquinonas, alcaloides, taninos, saponinas, fitosteróis e triterpenoides (BHUTANI; KAPOOR, ATAL, 1984; RAJAMAHESWARI et al., 2017).

Complementarmente, os autores (PINGALE; POKHARKAR, 2008) avaliaram a toxicidade aguda das folhas da espécie *C. quadrangulares* em camundongos, onde não houve mortalidade e nem alterações na massa corporal dos animais nas dosagens de 200, 400 e 600 mg/kg realizado em 14 dias, comprovando assim a ausência do efeito tóxico em camundongos nestas doses.

Diante da variedade de metabólitos e as diversas atividades biológicas presentes no gênero *Cissus* apresentadas na Quadro 1 associados ao baixo potencial tóxico, este gênero tem sido alvo de muitos estudos e estes estudos tem revelado excelentes resultados, comprovando a eficácia das atividades biológicas atribuídas ao gênero, justificando assim o uso deste na medicina popular (SRISOOK et al., 2011).

2.3 ESPÉCIE *Cissus gongylodes*

A espécie *Cissus gongylodes* (Burch Ex. Baker) Planch. sinônimo de *Vitis gongoylodes*, é conhecida popularmente por cipó de uvas, cipó mãe-boia, uva do mato, videira brava, batata de cobra, chupão, cipó d'água, paquetá, cipó babão ou mandioca aérea (LOMBARDI, 1995; LOMBARDI, 1997). O cipó de uvas também é muito conhecido pelos indígenas por cipó Kupá, uma importante

planta utilizada pelos índios Kayapó no Brasil, suas folhas, caules e frutos são cozidos e usados como fonte de alimentação por esses indígenas (PRANCE, 1991; LOMBARDI, 2007).

Considerando o uso da *C. gongylodes* e *C. quadrangulares* na alimentação, estas espécies podem ser inseridas no grupo das plantas alimentícias não convencionais (PANC) como melão de são caetano (Cucurbitaceae), picão preto (Asteraceae) e também flaboianzinho (Fabaceae Caesalpinioideae) entre outros (KINUPP; LORENZI, 2014). As PANC são consideradas fontes alternativas para obtenção de nutrientes de forma diversificada, além de estimular a manutenção na agricultura. Essas PANC estão presentes em determinadas regiões e ao longo do tempo perderam espaço para outros tipos de plantas utilizadas tradicionalmente (BARREIRA et al., 2015).

Estudos fotossintéticos e morfológicos demonstraram a eficácia do cipó de uvas para a remoção de poluentes do ar como, benzeno e tolueno (YOO et al., 2006). Outro estudo sobre a extração de cobre, zinco e ferro em ervas medicinais descreveu a quantidade desses metais no chá das folhas da *C. gongylodes*, apresentando as quantidade de 0,95 mg de cobre, 3,46 mg de ferro e 1,69 mg de zinco na porção de 1g de amostra. Quantidades estas consideradas como intermediárias comparadas com a quantidade média apresentada pelas plantas alimentícias; 1,37 mg de cobre, 5,13 mg de ferro e 2,96 mg de zinco, apontando assim o consumo dessa planta como uma alternativa da obtenção desses metais (ANDRADE; ALVES; TAKASE, 2005).

O cipó de uvas (Figura 5) pode ser encontrado em florestas tropicais da América do sul, caracterizado por possuir as folhas trifolioladas, inflorescência com flores verde-amareladas, caules grossos e carnosos e seus frutos tipo baga (SANTO et al., 1987).

Figura 5 – Folhas, caules e inflorescência de *Cissus gongylodes*



Fonte: Do autor.

Sua forma de vida é considerada do tipo liana-volúvel, pois germinam no solo, mantêm-se enraizadas no solo durante toda a sua vida e necessitam de um suporte para se manterem eretas e crescem em direção da luz abundante. O cipó de uvas florescem de janeiro a maio, frutificam de fevereiro a agosto e apresentam adaptação a ambientes áridos, devido seus caules carnosos (LOMBARDI, 2000).

A espécie não é endêmica do Brasil, podendo ser encontrada nos países da América do Sul como, Colômbia, Venezuela, Peru e Bolívia. No Brasil pode ser encontrada no Acre, Pará, Ceará, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (LOMBARDI, 1997). Mesmo o cipó de uvas sendo encontrado numa extensa distribuição geográfica não apresenta diferenças morfológicas notáveis entre as populações e a sua classificação taxonômica foi estabelecida por Lombardi (2000) como sendo:

- a) Reino: Plantae
- b) Divisão: Magnoliophyta (plantas com flor)
- c) Ordem: Rhamnales
- d) Família: Vitaceae
- e) Subfamília: Vitoideae
- f) Gênero: *Cissus*
- g) Espécie: *C. gongylodes*
- h) Sinonímias: *Vitis gongoylodes*

Um estudo farmacognóstico realizado por Navarro (2009), demonstrou que a espécie não teve atividade antimicrobiana para os microorganismos testados *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* em diferentes concentrações e o infuso das folhas e decocto obtido do caule não apresentaram toxicidade, alterações na massa dos órgãos, função renal e função hepática em ratos. Ainda não há relatos na literatura sobre a fitoquímica, nem o isolamento e identificação de substâncias presentes na espécie. Foi observado nas folhas da espécies a presença do fungo *Pestalotia menezesiana* dificultando o cultivo e a produção em estufas por produtores por deixar as folhas e raízes descoradas e murchas (BISSET, 1982).

O cipó de uvas além de ser utilizado na alimentação também é usado como planta medicinal, por populações dos países da Índia, Áustria e Austrália. Com as folhas são produzidos decoctos e infusões para serem utilizadas no tratamento de remoções de cálculos renais, em processos inflamatórios e biliares (PIRKER et al., 2012; AHMED; HASAN; MAHMOOD, 2016; AHMED; HASAN; 2017).

Portanto, esta espécie demonstrou baixo potencial toxicológico, é considerada uma PANC e possui histórico etnofarmacológico para tratamento de urolitíase e inflamação sem qualquer estudo científico sobre elas e sua composição química. Assim sendo, *C. gongylodes* merece ser estudada quanto a estas propriedades medicinais e também quanto a sua composição química.

2.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um mecanismo de defesa do sistema imunológico à infecção ou lesão tecidual, causando alterações hormonais e metabólicas (CARDINAL et al., 2016). Este processo envolve uma ação direcionada entre o sistema imunológico e o tecido lesionado, na intenção de inativar ou destruir microrganismos invasores, remover substâncias irritantes e iniciar o estágio de reparação tecidual (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003). Quando as células lesionadas são ativadas por estímulos químicos, físicos ou biológicos, elas liberam mediadores químicos, responsáveis pelo aspecto da área inflamada, como inchaço, calor, vermelhidão e dor. Os estímulos levam à formação do ácido araquidônico (AA) pela ação da catálise enzimática da fosfolipase A2. O AA pode ser metabolizado por enzimas da ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) originando diferentes eicosanoides, prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e os leucotrienos (LT) (MEDZHITOV, 2010; ABDULKHALEQ et al., 2018).

As COX (isoformas COX-1 e COX-2) são responsáveis pela biossíntese de PG e do TX, exercendo o efeito edematogênico, vasoconstrição e vasodilatação no tecido lesionado (SERHAN; CHIANG; DYKE, 2008). As LOX são responsáveis por biossintetizarem os LT, que exercem um poderoso efeito quimiotático nos eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, bem como promovem a broncoconstrição e alterações da permeabilidade vascular (MARTEL-PELLETIER et al., 2003).

A descoberta das duas isoformas COX levou ao conceito de que a isoforma COX-1 construtiva tende a ser homeostática, enquanto a COX-2 é induzida durante a inflamação e facilita a resposta inflamatória. Com base nesse conceito, foram desenvolvidos fármacos que possam atuar na inibição da COX-1 e COX-2 (PALLIO, et al., 2016). Assim sendo, existem três tipos principais de anti-inflamatórios, os glicocorticoides ou esteroidais (AIEs), os não esteroidais (AINEs) não seletivos, ou os AINES seletivos para COX-1 ou COX-2. Todos que atuam diminuindo os efeitos pró-inflamatórios.

A ação anti-inflamatória dos AIEs, como hidrocortisona e dexametasona, inibem centralmente a transcrição do gene da enzima COX-2 e a induzem a síntese da proteína lipocortina, inibidora da enzima fosfolipase A2 (ABDULKHALEQ et al., 2018). Já os AINES, como a aspirina[®] (ácido acetilsalicílico), ibuprofeno, diclofenaco e piroxicam, inibem a COX-1 e COX-2, de maneira não seletiva, impedindo a formação de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores do processo inflamatório. No entanto,

esses medicamentos podem apresentar diversos efeitos colaterais, como ulceração gástrica e duodenal devido a inibição da COX-1 (MENG; LIU; LAI, 2015).

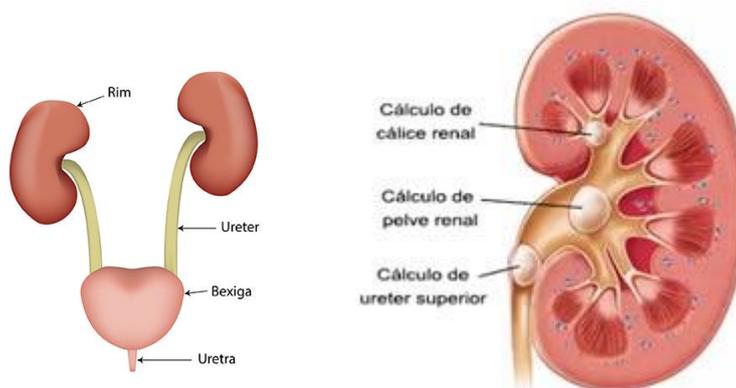
Na tentativa de sanar os efeitos adversos causados pela inibição da COX-1, foram produzidos medicamentos inibidores seletivos da via COX-2, como nimesulida, etodolaco e outros. Mesmo assim, estes medicamentos podem causar doenças cardiovasculares e renais. Estudos comprovaram que algumas substâncias anti-inflamatórias originadas de produtos naturais das diferentes classes, como terpenos, taninos, alcaloides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonoides possuem menos efeitos colaterais do que substâncias não provenientes de produtos naturais (CHAGAS-PAULA et al., 2011; PALLIO, et al., 2016).

Considerando a evidência etnofarmacológica da planta a ser estudada como anti-inflamatória, o potencial de produtos naturais em revelarem substâncias com este potencial e a necessidade de desenvolver novos fármacos anti-inflamatórios com menores efeitos adversos e ao mesmo tempo capazes de exercer papel concomitante no tratamento de urolitíase, justifica-se o estudo anti-inflamatório de *C. gongylodes* (PIRKER et al., 2012; AHMED; HASAN; 2017)

2.5. UROLITÍASE

Urolitíase ou litíase renal, comumente chamada de cálculo renal, é um distúrbio urológico que consiste na formação de cálculos, podendo estar localizado no rim ou em qualquer parte do sistema urinário causando fortes dores. A urolitíase atinge cerca de 12% da população mundial e 3 a 4% da população brasileira, índice este considerado elevado por apresentar similaridade com a ocorrência de diabetes no Brasil. (GHELANI; CHAPALA; JADAV, 2016; ALELIGN; PETROS, 2018). O cálculo renal é mais prevalente em homens (12%) do que em mulheres (8%), a chance aumenta entre os 40 e 70 anos e normalmente o indivíduo que teve cálculo renal uma vez, tem 50% de chance de obter o mesmo problema pela segunda vez e 75% de desenvolver pela terceira vez (GHELANI; CHAPALA; JADAV, 2016). Os cálculos podem se formar nos rins, ureter, uretra e bexiga (Figura 6), destes, 70% estão localizados no rim, 15% no ureter e 15% na bexiga e uretra. (POLO; MARTIN; GOMES 2013).

Figura 6 – Representação do sistema urinário.



Fonte: Anatomicocorpo.com

Os cálculos podem ser originados por fatores genéticos, individuais, ambientais, metabólicos, anatômicos e infecciosos, e é por esse motivo que a urolitíase é considerada um distúrbio multifatorial (GOMES et al., 2005; TISELIUS, 2011). Os distúrbios metabólicos que promovem a hipercalcúria e hiperossalúria afetam a concentração dos níveis séricos normais de cálcio e oxalato de cálcio na excreção urinária, levando a formação dos cálculos (ALELIGN; PETROS, 2018). A deficiência de substâncias inibidoras, como o citrato, glicosaminoglicanos, pirofosfato e nefrocalcina também promovem a formação de cálculos renais (TISELIUS; FORNANDER; NILSSON, 1994). Os distúrbios metabólicos em geral são considerados fatores-chave na formação e a persistência da urolitíase (POLO; MARTIN; GOMES 2013).

Dentre os cálculos formados, 80% são de pedras de cálcio (oxalato de cálcio e/ou fosfato de cálcio), 10 % são de estruvita (fosfato de amônio e magnésio) e os 10% restantes de ácido úrico e cistina (EVAN, 2010). Os cálculos de cálcio, cálcio (CaOx), pode ser encontrado em dois tipos: oxalato de cálcio monohidratado (COM) e dihidratado (COD). Um dos fatores que contribuem para a formação de CaOx é a hipercalcúria, em que o pH urinário fica em torno de 5,0 e 6,0 (SHARMA; KHAN; AHMAD, 2016; ALELIGN; PETROS, 2018). Os cristais do tipo COM são mais estáveis e comumente encontrados em casos clínicos e possuem maior afinidade por células tubulares renais, causando a cristalização dos cálculos renais (SAHA; VERMA, 2013).

Já os cálculos de estruvita são formados de magnésio, amônio e fosfato provenientes de algumas infecções no aparelho urinário. Estas infecções são causadas por bactérias tais quais, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Proteus* e entre outras. Devido a ação da uréase bacteriana ocorre a produção de amônia a partir da ureia, fazendo com que a urina se torne extremamente alcalina e propícia para a formação dos cristais do tipo estruvita (DAS et al., 2017).

O primeiro passo para a formação do cálculo é a nucleação, nessa etapa o cálcio e o oxalato filtrados pelos rins se combinam espontaneamente para formar os cristais. O núcleo destes cálculos podem ser constituído por apenas uma composição química ou por várias, um exemplo disso é a combinação de cristais de CaOx e fosfato de cálcio (CaP). Quando o núcleo formado é constituído por apenas uma composição é chamado de nucleação homogênea e quando há a composição por diferentes núcleos é chamado de nucleação heterogênea (GOMES et al., 2005; ALBERT, 2017). Depois dos cristais formados, esses se direcionam para os néfrons e se depositam nas papilas renais; localizados na cavidade renal e é nesse local que acontece o crescimento dos cristais, ocorrendo a agregação e o agrupamento dos cristais indesejados (MULAY et al., 2014).

Os cálculos renais podem ser transportados pelo sistema urinário e serem depositados no canal do ureter promovendo a retenção urinária (TOSTES et al., 2001). Quando os cálculos são pequenos podem ser eliminados espontaneamente na urina, porém quando maiores podem causar obstruções levando ao processo inflamatório em alguns casos. Os principais locais de obstrução são no ureter e no trato urinário na junção pieloureteral, nos cruzamentos com os vasos ilíacos e na junção vesicoureteral, e são essas obstruções as causadoras da famosa cólica renal e a dor intensa ao urinar (VELU et al., 2017).

Uma das formas de diagnóstico da urolitíase é a identificação dos distúrbios metabólicos e as anomalias que envolvem o trato urinário. Esses diagnósticos podem ser realizados por uma investigação laboratorial metabólica (hemograma e exame de urina), por exames radiológicos, ultrassom, tomografia computadorizada e urografia. Técnicas estas que, podem identificar o local que se encontra o cálculo, bem como o tamanho. (SHARMA; KHAN; AHMAD, 2016; KALEESWARAN et al., 2018).

O tratamento para a urolitíase pode se dar de inúmeras formas. Em casos de cálculos pequenos a ingestão diária de água e a restrição de alguns alimentos podem ser suficientes para expelir os cálculos na urina (TOSTES et al., 2001). Em outros casos, o uso de medicamentos para regularizar os distúrbios metabólitos são essenciais, tais como tiazidas, fosfato de celulose, citrato de potássio, alopurinol, ácido acetohidroxâmico e acetozolamida (Diamox[®]) (RIELLA, 1996; SCARDELATO et al., 2013). Casos mais graves de urolitíase envolve principalmente a remoção cirúrgica dos cálculos como a litotripsia extracorpórea por ondas de choque (LECO) e nefrolitotomia percutânea (LNPC). Tais intervenções não asseguram a prevenção de recorrência do cálculo, além disso, podem causar efeitos colaterais como hemorragia, hipertensão, necrose tubular e subsequente fibrose dos rins (ALBERT, 2017).

O Cystone[®] é um fitoterápico muito utilizado na Índia seu uso leva a diminuição da supersaturação da urina e a expulsão do cálculos. A sua formulação contém diversas espécies de

plantas que auxiliam no tratamento da urolitíase, descritas aqui com as suas respectivas famílias e quantidades por comprimido: *Didymocarpus pedicellata* 65 mg - Gesneriaceae, *Saxifraga lingulata* 49 mg - Saxifragaceae, *Rubia cordifolia* 16 mg - Rubiaceae, *Cyperus scariosus* 16 mg - Cyperaceae, *Achyranthes aspera* 16 mg- Amaranthaceae, *Onosma bracteatum* 16 mg - Boraginaceae, e *Vernonia cinerea* 16 mg – Asteraceae. Esta formulação é vendida mundialmente pela Himalaya Health Care® e nos Estados Unidos é comercializada como Uricare® (CHATTERJEE, 1982; MISGAR, 1982; KARAMAKAR; PATKI, 2010; ERICKSON; VRTISKA; LIESKE, 2011). Embora o Cystone® seja utilizado como fitoterápico no tratamento da urolitíase, alguns estudos indicam a inexistência do seu efeito benéfico na dissolução dos cálculos renais (ERICKSON; VRTISKA; LIESKE, 2011).

As sofisticadas técnicas investigativas radiológicas e laboratoriais são insuficientes para elucidar as causas e os mecanismos exatos da formação dos cálculos. E atualmente não existem medicamentos satisfatórios na medicina moderna capazes de dissolver completamente os cálculos renais e também agirem com a ação anti-inflamatória e/ou antibiótica. Por isso, continua-se a busca por substâncias e extratos que possam atuar com a ação multi-alvo no processo da urolitíase (GUPTA et al., 2011; ALELIGN; PETROS, 2018).

2.6 METABOLÔMICA

A metabolômica (*do inglês, metabolomics*) é considerada uma importante estratégia, que consiste em analisar qualitativamente e/ou quantitativamente metabólitos de baixo peso molecular (até 1500 Daltons) de uma matriz biológica (PHINNEY et al., 2013; MISRA et al., 2018). Essa estratégia também pode ser denominada de perfil metabólico (*metabolic profiling*), de impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*) entre outros, dependendo de como é realizada. Na pesquisa de produtos naturais, em que se utiliza uma matriz biológica complexa como os extratos de plantas, é necessário a utilização de métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) hifenados com a espectrometria de massas (EM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV) ou ultravioleta visível (UV-VIS) por exemplo, para a detecção e caracterização dos metabólicos presentes na matriz biológica (FUKUSAKI et al., 2005; YULIANA et al., 2013).

A metabolômica também pode ser classificada em dois tipos de análise, a metabolômica direcionada; “*targeted*”, ou não direcionada “*untargeted*”. A metabolômica *targeted* objetiva em analisar quantitativamente metabólitos específicos pré estabelecidos de uma determinada classe química ou de uma rota metabólica conhecida. E a *untargeted*, avalia qualitativamente o perfil

metabólito da amostra, analisando um maior número possível de metabolitos pertencente a matriz biológica (DUDLEY et al., 2010; PATTI et al., 2012; CANUTO et al., 2018).

A desrepliação é uma ferramenta muito utilizada pela metabolômica que se refere a identificação preliminar e rápida, *putative*, de metabolitos secundários conhecidos numa matriz biológica, por comparação com bancos de dados. Os metabolitos produzidos pelas plantas possuem diferentes polaridade e estão presentes em diferentes concentrações, devido a tais características a utilização de métodos analíticos confiáveis, robustos e seletivos são de grande valia na obtenção de informações importantes como, tempo de retenção, razão massa carga, deslocamento químico, absorção no ultravioleta e infravermelho para que seja possível a desrepliação (NIELSEN et al., 2011).

Uma das vantagens de utilizar a desrepliação é processo de reconhecimento rápido dos metabolitos e a eliminação prévia de substâncias já isoladas na literatura presentes na matriz, podendo priorizar a identificação de metabolitos inéditos ou de interesse farmacológicos antes mesmo do isolamento (FUNARI et al., 2013). A desrepliação pode ser por meio de banco de dados construídos no próprio laboratório de análise, *in house*, ou por banco ou base de dados online, como por exemplo MassBank[®], DNP[®] (*Dictionary of Natural Products*), ChemSpider[®], PubChem[®], ChEMBL[®] e SciFinder[®] (KLITGAARD et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Dentro do contexto etnofarmacológico a espécie *C. gongylodes* e revisão da literatura fica evidente a necessidade de maiores estudos químicos e farmacológicos desta espécie, uma vez que, esta é utilizada pela população com finalidades terapêuticas sem qualquer evidência científica. Dessa forma, as informações geradas neste trabalho sobre a composição química da espécie e as suas propriedades biológicas serão úteis para população, uma vez que o uso desta planta somente será recomendado se for eficaz e livre de substâncias previamente relatadas como tóxicas. Outro ponto relevante é que este trabalho ainda poderá gerar dados para um futuro desenvolvimento de fitoterápicos e medicamentos antiurolíticos e anti-inflamatórios, que seria um grande avanço tendo em vista que os tratamentos antiurolíticos disponíveis apresentam eficácia limitada, controversa e muitas vezes dependentes de procedimentos cirúrgicos e caros.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudo metabolômico da espécie *Cissus gongylodes*, isolamento de substâncias de interesse farmacológico e avaliação das atividades anti-inflamatória e anti-urolítica do decocto da *Cissus gongylodes*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realização de estudos farmacológicos, antiurolítico e anti-inflamatório com o decocto obtido;
- b) Estudo de mecanismo de ação das atividades investigadas;
- c) Isolamento e identificação de substâncias desta espécie;
- d) Construção do banco de dados com substâncias descritas no gênero *Cissus*;
- e) Investigação da composição química da espécie, através de estudo metabolômico por HPLC-UV-HRMS;
- f) Desreplicação das substâncias presentes no decocto.

5 METODOLOGIA

Nesta seção serão abordados os procedimentos metodológicos utilizados neste trabalho.

5.1 MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Coleta da *C. gongylodes*

As folhas de *C. gongylodes* foram coletadas por P. P. O. Salem em março de 2018 na cidade de Alfenas, MG, Brasil. A planta está localizada nas coordenadas geográficas (S 21 ° 25 '04. 7"; W 45 ° 57' 26.3 "; altitude 846 m) e a espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Antônio Julio Lombardi da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A espécie foi catalogada (# 2987) e depositada no herbário da UNIFAL. O estudo teve o acesso registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) # A3D5C99. As folhas inteiras foram secas em estufa com circulador de ar a 45 ° C por 72 horas e mantidas em condições livres de luz e de umidade até o processo de extração ser iniciado.

5.1.2 Preparo do decocto

O decocto foi preparado a partir de 100 g de folhas secas em pó; trituradas em moinho de facas, misturado com água destilada (1:10, p/v), fervido por 20 minutos. Em seguida, filtrou-se por pressão reduzida, congelou-se, liofilizou-se em Lyophilizer LJJ04 Scientific e produziu 25 g de material liofilizado. Por fim, o decocto foi armazenado em freezer (-20 °C) até ser analisado (HOSSEINZADEH et al., 2010).

5.2 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Nesta seção serão abordados os ensaios anti-inflamatórios realizados com o decocto das folhas de *C. gongylodes*.

5.2.1 Animais

Conforme aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG, processo nº 16/2016 e 638/2015, os animais fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade

foram mantidos em câmaras com temperatura controlada (20 ± 2 °C) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos, adultos (25-35 g) de 3 a 4 semanas, que foram aclimatados às condições do laboratório, sendo agrupados em grupos de 10 animais. Durante toda a realização do experimento seguiu-se as regras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.2.2 Edema de orelha

O ensaio anti-inflamatório foi baseado na metodologia revisada por Tubaro *et al.* (1986), também utilizada em referências mais recentes, Januário *et al.* (2018) e Santos *et al.* (2019). A inflamação cutânea foi induzida na orelha esquerda dos camundongos (n=10) pela aplicação tópica de 20 µL da solução irritante de óleo de cróton 5% (v/v), dissolvido em acetona. Enquanto que, na orelha direita, foi aplicada somente acetona, como veículo. Trinta minutos após a aplicação da solução irritante de óleo de cróton na orelha esquerda, foi realizado tratamento tópico com o decocto na dosagem de 0,5 mg/orelha.

Os animais do grupo do controle negativo receberam apenas a solução irritante e o veículo nas orelhas esquerdas. Enquanto os animais do controle positivo foram tratados topicamente com os fármacos de referência; dexametasona e indometacina, ambos na dosagem de 0,5 mg/orelha, 30 min após indução da inflamação. Todas as amostras foram dissolvidas no mesmo veículo; solução de 20% (v/v) de água em glicerina.

Os animais foram sacrificados, por inalação de isoflurano, 6 h após a indução da inflamação para a excisão de um fragmento de orelha de 6 mm de diâmetro de ambas orelhas, utilizando-se um punch. O edema foi determinado pela diferença de massa entre os fragmentos das orelhas esquerdas e das respectivas orelhas direitas analisados por ANOVA *one-way* seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm erro médio padrão (EMP). O programa utilizado para análise estatística dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.1 (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2011). As porcentagens de inibição do edema de orelha foram calculadas de acordo com a seguinte equação 1:

$$\% \text{ Inibição de edema} = \frac{\text{Valor médio do grupo veículo} - \text{valor médio do grupo tratado}}{\text{Valor médio do grupo veículo}} * 100 \quad (1)$$

5.2.3 Avaliação da concentração dos mediadores PGE₂ e LTB₄ nos fragmentos de edema de orelha

Os fragmentos da orelha esquerda obtidos na avaliação de edema de orelha (5.2.2) foram mantidos em tubos tipo eppendorf com 800 µL de tampão NaPO₄ 0,02 M (pH 4,7), a -20 °C, até a quantificação dos mediadores da inflamação PGE₂ e LTB₄. Os fragmentos de orelhas foram homogeneizados e triturados usando o macerador de tecidos Turrax (13,000 rpm), em gelo picotado, e centrifugados a 3000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante originado foi submetido a um experimento que avalia a concentração do eicosanoide PGE₂ e do leucotrieno LTB₄, importantes mediadores do processo inflamatório (SANTOS et al., 2019).

Neste caso, os sobrenadantes foram liofilizados até completa secura (4-8 horas) e ressuspensos em 100 µL de uma solução de 25 ng/mL do padrão interno cloranfenicol (CAP), solubilizado em acetonitrila. As amostras foram solubilizadas no banho ultrassônico por 2 min e rapidamente agitadas no vórtex. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 min, a 10000 rpm e 4°C, sendo pipetados 80 µL do sobrenadante e armazenados em vials com insert.

Os mediadores de PGE₂ e LTB₄ foram quantificados em cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC) acoplado a espectrômetro de massas do tipo MS/MS, utilizando o procedimento previamente validado por Margalit *et al.* (1996) e Santos *et al.* (2019). Durante todo o procedimento as amostras foram mantidas sob banho de gelo e protegido da luz. Foi utilizando um volume de injeção de 20 µL e o método cromatográfico gradiente de 60 a 90% de acetonitrila (MeCN) em água acidificada (0,1% de ácido fórmico) de 0 a 4,5 min, 90 a 100% de 4,5 a 5,5 min., mantido em 100% de 5,5 a 6,5 min, reconicionado na fase móvel inicial de 100% a 60% de 6,5 a 7,5 min, mantendo em 60% até o total de 10 min de análise. Foi utilizado fluxo de 0,3 mL/min, pré-coluna compatível e coluna C18 (Agilent Poroshell 120 EC-C18) 2,7 µm, 3 mm x 100 mm.

Utilizou o UHPLC acoplado por um espectrometro de massas Shimadzu[®], com analisador triplo quadrupolo (QqQ), ionizador por *electrospray* (ESI). O monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring* – MRM) dos íons dos mediadotes PGE₂, LTB₄ e do padrão interno CAP foi realizado conforme descrito da Tabela 1.

Tabela 1 – Método MRM de cada analito

Analitos	Transição m/z	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
PGE ₂	351,1>271,2	18	20	16
LTB ₄	335,1>195,1	25	15	18
CAP	321,1>152,5	22	18	14

Fonte: Do autor.

Todos os resultados foram analisados por ANOVA *one way*, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expresso como média \pm erro padrão (EMP).

5.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIUROLÍTICA

Nesta seção serão abordados os ensaios antiurolíticos realizados com o decocto das folhas de *C. gongyloides* para avaliar a inibição e a dissolução dos cristais de CaOx e estruvita.

5.3.1 Método de disco-difusão em ágar

Para a avaliação da inibição da cristalização do CaOx utilizou a técnica de difusão-disco em ágar com pequenas modificações (Balouiri et al., 2016; Kale et al., 2017). Neste sentido cada placa petri de vidro (70 mm x 10 mm) foi preparada com 10 mL de ágar bacteriológico (microMED – força gel 600-750 g/cm²) a 0,8% (v/v) juntamente com uma solução de cloreto de cálcio diidratado (CaCl₂.2H₂O a 0,2 M). O gel de ágar e todas as vidrarias foram autoclavadas por 20 min. a (121 °C).

Após o gel de ágar atingir uma temperatura entre 55 a 60 °C, ele foi vertido sobre placa e deixado em repouso até a solidificação. Sobre o gel foi adicionado um disco (papel de filtro de 6 mm de diâmetro) embebido com 20 µL de decocto, ou 20 µL dos controles positivos; citrato trissódico (Na₃C₆H₅O₇) e o Cystone[®]. Todas as amostras foram diluídas em água destilada e avaliadas na concentração de 25; 50, 100 e 150 mg/mL e para o grupo do controle negativo, foi adicionado apenas água destilada sobre o disco.

Logo após a aplicação das amostras, as placas foram mantidas em câmara úmida por 6 a 8 h para ocorrer a difusão das amostras sobre o ágar. Depois do período de incubação, as placas foram cuidadosamente imersas em 10 mL de solução de oxalato de amônio (NH₄C₂O₄ a 0,2 M) por 30 a 60 s. Para observar a formação e a inibição do CaOx, que possui a coloração branca, utilizou-se o revelador 1,2-di-hidroxi-antraquinina 0,2 % (v/v) (Alizarina vermelha S) diluída em água destilada;

indicador seletivo para CaOx, tornando a coloração rósea na presença de CaOx (PATIL et al., 2017). A zona de inibição ou os halos formados foram medidos de acordo com equação 2 abaixo:

$$\% \text{ Percentual de Inibição} = \left(\frac{As}{Ac} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde (As) representa o diâmetro do halo de inibição das amostras formada na placa, (Ac) é o diâmetro da placa utilizada, no caso 7,0 cm (KALE et al., 2017). Todos os resultados foram avaliados por *two-way* ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

5.3.2 Avaliação da dissolução CaOx na urina fresca

Foi coletado, a primeira urina da manhã, 40 mL de urina de uma paciente de 20 anos que reportou possuir cálculo renal. A urina foi armazenada em um tubo falcon e centrifugada duas vezes a 2000 rpm por 10 min. à temperatura ambiente (25 °C). Para o ensaio, todo o precipitado presente na urina foi diluído em cerca de 3600 µL do sobrenadante da urina, para atingir a concentração de 1400 cristais de CaOx/µL e o volume necessário para realizar todo o ensaio em triplicata (SINGH et al., 2013).

O teste utilizou o veículo como controle negativo, sendo usado como veículo o sobrenadante da urina. Avaliou o decocto da *C. gongylodes* e o controle positivo Cystone[®], ambos nas concentrações de 0,5% , 1% e 2% do volume total, com incubação por 72 horas em temperatura ambiente (BAWARI et al., 2018). A faixa de pH foi monitorada no início e no final do experimento e o número de cristais foi monitorado através de um microscópio binocular Nikon eclipse E100 no período de 24, 48 e 72 h de incubação, utilizando 10 µL das amostras em uma câmara de contagem de células Neubauer melhorada. Os resultados foram avaliados pelos teste *two-way* ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

5.3.3 Técnica de crescimento de estruvita pela difusão em gel

A técnica foi baseada nas referências dos autores Chauhan e Joshi (2014) e Kaleeswaran *et al.* (2018) que descrevem o crescimento de cristais de struvita pela difusão em gel, possibilitando a avaliação do crescimento, inibição e a dissolução do cristal (DAS et al., 2015). Para o crescimento dos cristais foi utilizado um gel de metasilicato de sódio, que utiliza para seu preparo 20 g de metasilicato de sódio pentahidratado 0,15 M (Na₂SiO₃ . 5 H₂O) (SMS) dissolvido em 140 mL de água

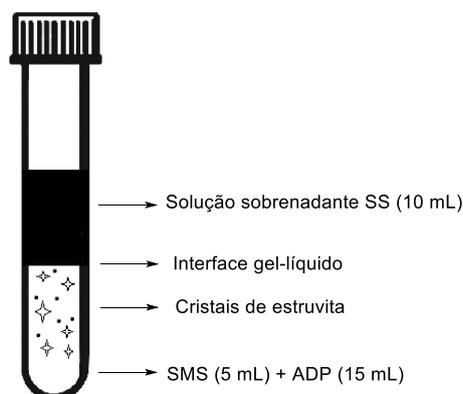
destilada. Essa solução estoque de SMS foi misturada vagarosamente por 2 horas e mantida em descanso por 1 hora. Após isso, a solução de SMS foi filtrada em papel de filtro comum sob pressão reduzida. O gel de SMS pode adquirir a gravidade específica entre 1,04 – 1,06, representando a faixa de densidade do gel necessário para o cultivo de cristais de struvita. Para esse trabalho, foi escolhida a gravidade específica de 1,05 e para adquirir esse valor foi necessário diluir com água destilada a solução estoque de SMS. O valor da gravidade específica foi monitorada por meio de um picnômetro de 5 mL e pela equação 3 abaixo (CHAUHAN; JOSHI, 2014):

$$\text{Gravidade específica} = \frac{M_s - M_o}{M_a - M_o} \quad (3)$$

O termo M_s se refere a massa da solução estoque de SMS diluída, M_o a massa do frasco picnômetro vazio e M_a a massa de água destilada. Dessa forma, após adquirir a solução com a gravidade específica desejada de 1,05 adicionou a solução de dihidrogenofosfato de amônio dihidratado 0,5 M ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (ADP) até estabelecer a faixa de pH de 7; pH este encontrado nos rins (GUPTA et al., 2011).

Para o teste foi utilizado tubos de ensaio com tampas herméticas, de comprimento: 140 mm e diâmetro: 25 mm, que foram autoclavados na condição 121° C por 20 min. Após autoclavados adicionou-se aos tubos 5 mL da solução SMS diluída (0,10 M) e 15,0 mL da solução ADP, deixando estes em repouso até a geletificação. O tempo da geletificação e a densidade do gel formado dependem da faixa de pH, que no caso foi 7 (CHAUHAN; JOSHI, 2014). O procedimento foi todo realizado em temperatura ambiente e em fluxo laminar para evitar possível contaminação microbiana.

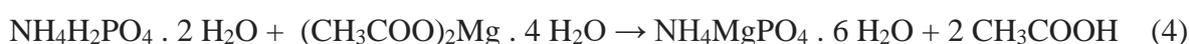
Figura 7 – Representação da técnica do crescimento dos cristais de struvita no gel



Fonte: Do autor.

Legenda: SS (acetato de magnésio), SMS (metasilicato de sódio) e ADP (dihidrogenofosfato de amônio).

O teste avaliou a ação antiurolítica do decocto das folhas de *C. gongyloides*, utilizando como controle positivo o Cystone[®] e ambos foram testados nas concentrações de 0,5, 1 e 2 % do volume total do teste (30 mL). Após a geletificação adicionou 10 mL da solução de acetato de magnésio tetra hidratado 1 M (C₄H₆MgO₄ . 4 H₂O) (SS) solubilizada com as amostras a serem analisadas nas concentrações mencionadas anteriormente, totalizando um volume de 30 mL por tubo, conforme representado na Figura 7. Os reagentes presentes nas soluções de ADP e SS em contato para formam os cristais de estruvita; fosfato de amônio e magésio hexahidratado (NH₄MgPO₄ . 6 H₂O) conforme a representação da equação 4 química abaixo (CHAUHAN; JOSHI, 2013).



O crescimento dos cristais se iniciam em 24 horas e o formato destes podem variar de acordo com a faixa de pH e a gravidade específica atingida; para a faixa de pH 7 e a gravidade 1,05 os cristais podem adquirir a forma do tipo dendrítico (CHAUHAN; JOSHI; VAIDYA, 2011). O crescimento dos cristais foi monitorado e fotografado por 30 dias. Após isso, os cristais foram retirados gentilmente dos tubos de ensaio e lavados com água destilada. A avaliação da inibição do crescimento do cristal foi determinada pela diferença de massa entre o controle negativo e as amostras testadas. O percentual de inibição dos cristais foram calculados pela seguinte fórmula [(valor da massa dos cristais do veículo – valor de massa das amostras)/(valor da massa dos cristais do veículo)x100] (DAS et al., 2015). Os resultados foram avaliados pelos teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett.

5.4 ANÁLISE METABOLÔMICA POR UHPLC-UV-HRMS E DESREPLICAÇÃO

As análises cromatógráficas do decocto foram analisadas em um UHPLC acoplado a espectrofotômetro de UV-DAD e a um espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) com o ionização por ESI e analisador de tecnologia *quadrupole time of light* (QTOF) da Bruker Daltonics, Bremen, Germany.

Para a análise do decocto, foi injetada um alíquota de 20 µL via auto-injetor da amostra preparada na concentração de 1 mg/mL em acetonitrila e água (MeCN:H₂O, 1:1, v/v), filtrada em filtro de PTFE de 0,22 µm de diâmetro de poro. A separação cromatógráfica foi feita em uma coluna ultra analítica de fase reversa de 2,2 µm de diâmetro de partículas (RSLC C18- 100 mm × 2,1 mm; AcclaimTM) e uma pré coluna equivalente. A vazão da fase móvel foi de 0,4 mL/min de um gradiente

de MeCN e H₂O; ambas fases continham 0,1% de ácido fórmico e 0,025% de hidróxido de amônio. O gradiente foi de 5-99% de MeCN em 15 min e condicionamento 99-5% em 5 min. Para a calibração do espectrômetro de massas utilizou-se o formiato de sódio (HCOONa) e a sequência de análises foi iniciada e finalizada com a injeção do branco (MeCN:H₂O).

Os espectros de massas foram adquiridos em *full scan* e MS/MS nos modos positivo e negativo na faixa de varredura de 100–1000 *m/z* e resolução de 50.000 (KLITGAARD et al., 2014). Os dados foram processados pelo software da Bruker; Compass Data Analysis. Para a desrepliação do decocto no modo negativo e positivo também foi utilizado um software da Bruker, Target Analysis, onde a massa monoisotópica dos íons detectados no decocto foi comparada com as do banco de dados *in house*, banco de dados construído com substâncias previamente reportadas (identificadas e isoladas) para o gênero *Cissus*. O banco de dados foi contruído por meio de buscas no *Dictionary of Natural Products*[®] (DNP) e por dados encontrados na literatura (SciFinder Scholar[®]).

5.5 FITOQUÍMICA

Após a coleta, as folhas da *C. gonylodes* foram submetidas ao processo de secagem em estufa com circulador de ar por 72 horas em temperatura padrão de 45°C e logo em seguida utilizados na preparação do decocto (seção 5.1.2.). Para a fracionamento foi utilizado 10 g do decocto, e este foi submetido a partição líquido-líquido com hexano e subsequentemente com acetato de etila. Obteve a fração acetato de etila (FoAc) que foi selecionada para etapas de isolamento de substâncias. Esta fração, FoAc, foi então rotaevaporada a 50° C e 100 rpm e após seca, ela foi armazenada até o início do processo de isolamento.

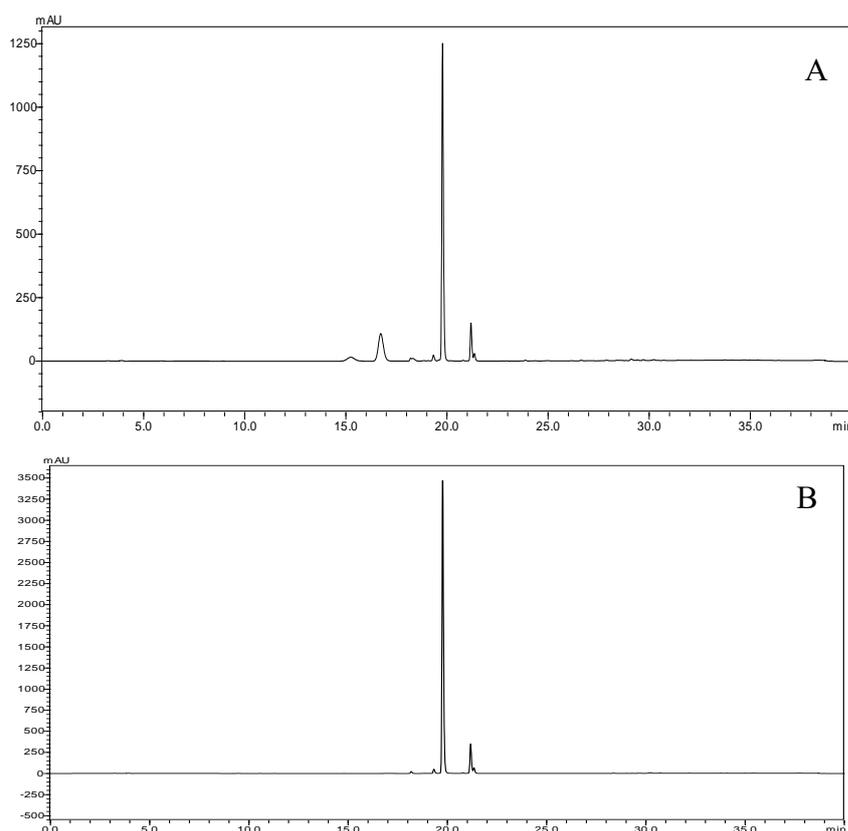
A fração FoAc foi escolhida para o processo de isolamento devido a sua similaridade com o perfil cromatográfico do decocto (Figura 8) e por também por apresentar substâncias de polaridade intermediária (AZEVEDO et al., 2014).

Os perfils da fração e do decocto foram obtidos por meio do cromatógrafo líquido de alta performance - HPLC (equipamento modulado da Shimadzu Prominence de duas bombas de fase móvel LC-20AD e degaseificador DGU-20A 3R, auto-injetor SIL-20A HT, forno para coluna CTO-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A, DAD) e comunicador CBM-20). Para isso utilizou-se 1 mg das amostras que, foram diluídas em 1 mL de MeCN/H₂O ultra pura (1:1, v/v), particionadas com hexano e logo após filtradas em microfiltro com membrana de PTFE com poros de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro. Para o método cromatográfico utilizou-se coluna analítica de fase reversa (C18) Shim-pack CLC-ODS(M), 5 µm de diâmetro de partícula, 4,6 mm x 250 mm. Como fase móvel empregou-se um gradiente de 5 a 100 % de MeCN:H₂O com 0,1% de ácido acético, por

40 min e fluxo de 1 mL/min. Todos os solventes utilizados foram grau HPLC e água ultra pura (Milli-Q).

Deste modo, a fração FoAc (1,0 g) foi empregada na técnica de cromatografia em coluna (CC), onde utilizou-se uma coluna de diâmetro interno de 2,5 cm e 2,0 metros de altura, empacotada com (1,8 metros) do polímero Sephadex[®] LH20 Sigma-Aldrich e como eluente utilizou o solvente metanol. Desta coluna foram coletadas 82 frações com um volume de 35 mL cada, e estas, foram agrupadas de acordo com seu perfil cromatográfico em placas com base de alumínio e 0,25 mm de sílica gel 60 (Macherey-Nagel; $\lambda = 254$ nm), observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm). As frações foram agrupadas em 15 diferentes grupos: A (1 ao 19), B (20 ao 22), C (23 ao 24), D (25 ao 33), E (34 ao 37), F (38), G (39 ao 49), H (50), I (51 ao 52), J (53 ao 54), K (55 ao 56), L (57), M (58), N (59 ao 70), O (62), P (71 ao 81) e Q (82).

Figura 8 – Cromatogramas em 254 nm das frações obtidas de *C. gongyloides*



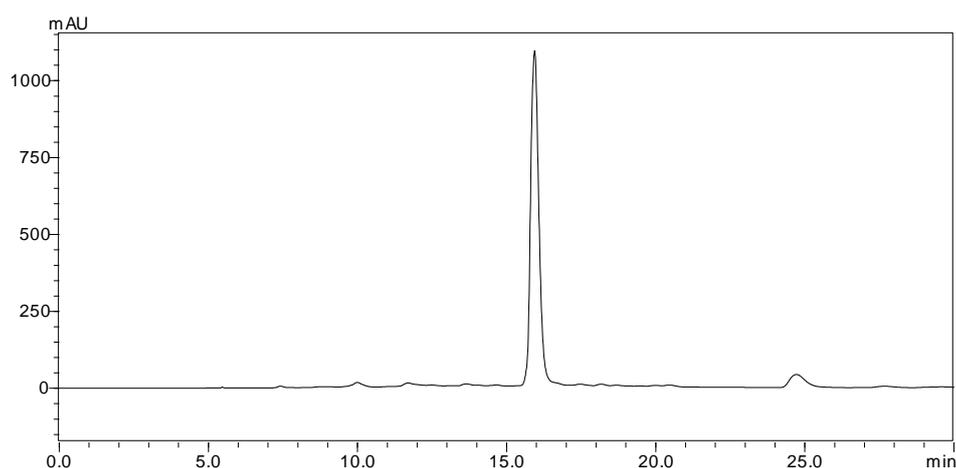
Fonte: Do autor.

Legenda: (A) decocto das folhas e (B) a fração FoAc obtidas de *C. gongyloides*. Os cromatogramas foram obtidos por HPLC-UV-DAD coluna C18 – 5 μ m de diâmetro de partícula e dimensões: 4,6 mm x 250 mm, fluxo de 1 mL/min, eluente: gradiente de 5 a 100 % de MeCN:H₂O com 0,1 % de ácido acético, por 40 min.

Ao final todos os grupos A ao Q foram analisados no HPLC para obter o perfil cromatográfico utilizando o mesmo método empregado para obter o perfil do decocto e FaAc. Dentre essas frações, a fração I, J, K apresentou cromatogramas parecidos e então foram novamente agrupadas originando a fração PS-(IJK), reunião das frações 51-56 obtidas da coluna Sephaex[®] anteriormente realizada.

A fração PS-IJK (Figura 9) foi escolhida para ser purificada, por apresentar cromatograma com perfil simples para obter substâncias purificadas. Para a separação foi utilizado uma coluna semi-preparativa de fase reversa (C18) Inertsil (ODS-4), 5 µm diâmetro de partícula e dimensões de 7,6 mm x 250 mm, juntamente com uma pré-coluna equivalente. Utilizou-se toda amostra (150 mg) PS-IJK e o método cromatográfico: gradiente de 20% a 30% de MeCN:H₂O por 10 min., seguido do método isocrático de 30% MeCN:H₂O por 30 min. A água foi acidificada com 0,1% de ácido acético e usou um fluxo de 1,5 mL/min.

Figura 9 – Cromatograma em 254 nm da fração (PS-IJK)



Fonte: Do autor.

Nota: Cromatograma obtido por HPLC-UV-DAD (coluna C18 – 5 µm de diâmetro de partícula e dimensões: 7,6 mm x 250 mm, fluxo de 1,5 mL/min, gradiente de 20% a 30% de MeCN:H₂O por 10 min. e método isocrático de 30% MeCN:H₂O por 30 min.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão descritos os resultados obtidos neste trabalho.

6.1 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A avaliação da atividade anti-inflamatória pelo ensaio de edema de orelha possibilitou avaliar mais especificamente o efeito-edematogênico (TUBARO et al., 1986; SANTOS et al., 2019) do decocto obtido das folhas de *C. gongyloides*.

6.1.1 Edema de orelha

O decocto apresentou atividade anti-inflamatória avaliado no ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton na dosagem de 0,5 mg/orelha. Isso é a primeira evidências científica que vem a corroborar o uso etnofarmacológico da *C. gongyloides* como anti-inflamatório (PIRKER et al., 2012). Tanto o decocto quanto os controles positivos, dexametasona e indometacina, inibiram significativamente o edema de orelha comparado com o veículo ($p \leq 0,05$) conforme apresentado na Tabela 2 e Figura 10. O decocto demonstrou o percentual de inibição de 34.61% no edema sendo estatisticamente semelhante aos controles positivos dexametasona e indometacina, 38.46% e 33.32%, respectivamente.

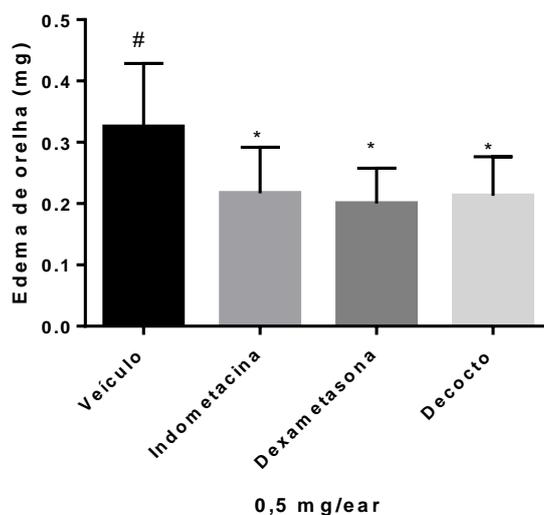
Tabela 2 – Efeito do decocto no teste de edema da orelha exibido em percentagem de inibição

Amostra	Edema de orelha (mg) média \pm EMP	% de inibição
Veículo	0.3250 \pm 0.1035	-
Indometacina	0.2000 \pm 0.0752 ^a	33.32
Dexametasona	0.2000 \pm 0.0577 ^a	38.46
Decocto das folhas	0.2000 \pm 0.0641 ^a	34.61

Fonte: Do autor.

Legenda: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm EMP. ^a indica significante diferença em comparação com o veículo, onde $p \leq 0,05$.

Figura 10 – Avaliação da atividade anti-inflamatória do decocto das folhas de *C. gongylodes* no modelo de edema de orelha em camundongos



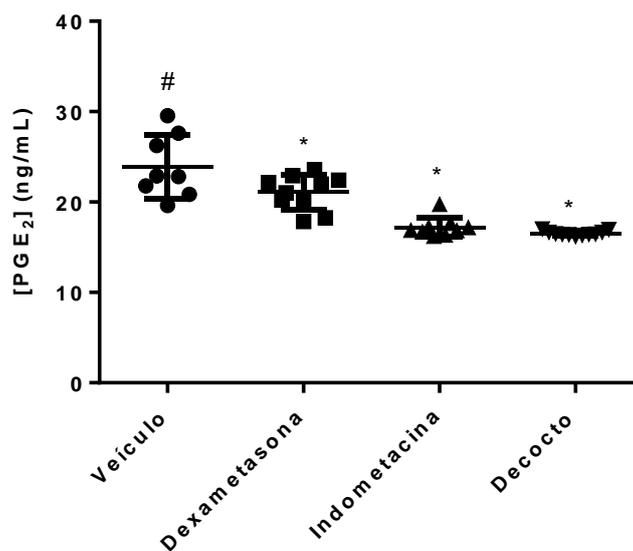
Autor: Do autor.

Legenda: Os resultados foram analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunett e expressos como média \pm EMP (n=10). * indica significante diferença em comparação com o veículo, onde $p \leq 0,05$ e # indica significante diferença em comparação com o fármaco referência dexametasona, onde $p \leq 0,05$.

O óleo de cróton é um agente irritante, responsável por causar danos celulares e ativar a enzima fosfolipase A₂, liberando o ácido araquidônico, precursor da produção de mediadores responsáveis pela formação de edema de orelha, dentre outros mediadores (CHAGAS-PAULA et al., 2011). Então, as substâncias presentes no decocto sendo capazes de diminuir o edema induzido pelo óleo de cróton, possui ação anti-edematogênica possivelmente via inibição da formação dos mediadores na via da COX, como a PGE₂, uma das principais responsáveis pela formação de edema em processos inflamatórios (AFSHAR et al., 2010; JANUARIO et al., 2018).

6.1.2 Avaliação da concentração dos mediadores PGE₂ e LTB₄ nos fragmentos de edema de orelha

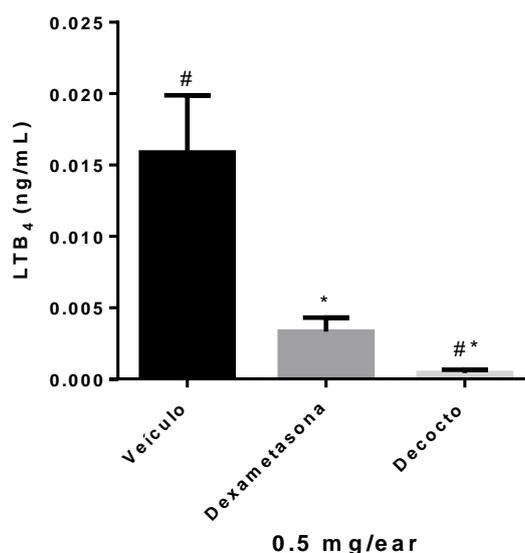
As orelhas inflamadas pelo óleo irritante controle e tratadas com o decocto e os fármacos de referência foram avaliadas com relação a concentração dos mediadores químicos da inflamação PGE₂ e LTB₄, que são produzidos pelas duas principais vias da cascata inflamatória, COX e LOX, respectivamente (CHAGAS-PAULA et al., 2011, SANTOS et al., 2019).

Figura 11 – Efeito do decocto na concentração de PGE₂

Fonte: Do autor.

Legenda: Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm EMP. * indica os níveis de significância $p \leq 0,05$ comparado com o veículo e # níveis de significância $p \leq 0,05$ comparado com o fármaco dexametasona.

As orelhas tratadas com o decocto apresentaram uma menor concentração de PGE₂ e LTB₄ comparadas com o veículo, confirmando assim a inibição da via da COX e também da LOX (Figura 11 e 12). Quando ocorre a diminuição na produção de PGE₂, conseqüentemente diminui os efeitos pró-inflamatórios da via da COX, corroborando o efeito anti-edematogênico observado na avaliação do edema de orelha (Figura 10) (SALES et al., 2019).

Figura 12 – Efeito do decocto na concentração de LTB₄

Fonte: Do autor.

Nota: Os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e expressos como média \pm EMP. * $p \leq 0,05$ comparado com o veículo e # $p \leq 0,05$ comparado com a dexametasona.

Os anti-inflamatórios estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação a sua eficácia e efeitos adversos (CHUANG et al., 2018). A indometacina, por exemplo é AINES capaz de inibir apenas a via da COX e apresenta efeitos indesejados como problemas gástricos (CHAGAS-PAULA; ZHANG; EDRADA-EBEL, 2015). Uma vez que o decocto apresenta a inibição dual, sendo capaz de inibir a produção de PGE₂ da via COX e de LTB₄ da via da LOX, o torna um promissor candidato na busca por novos medicamentos que possam apresentar maior eficácia e menos efeitos colaterais (JANUARIO et al., 2018). Além disso, o decocto demonstrou inibir potentemente a via da LOX, uma vez que demonstrou inibir mais esta via do que o anti-inflamatório esteroideal (dexametasona, $P \leq 0,05$; Figura 12), o que o torna ainda mais promissor para desenvolvimento de tratamento anti-inflamatório.

6.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIUROLÍTICA

6.2.1 Método de disco-difusão em ágar

Considerando o histórico etnofarmacológico da *C. gongylodes* no tratamento da urolitíase (PIRKER et al., 2012), utilizou a técnica de difusão-disco em ágar para avaliar o potencial de inibição

do decocto na formação dos cristais de CaOx. As amostras que possuem um potencial inibitório na formação do CaOx formam halos de inibição que podem ser revelados com alizarina red, um reagente que complexa seletivamente com o CaOx apresentando a coloração rósea (Figura 13) (PATIL et al.,2017, KALE et al., 2017).

Figura 13 – Comparação dos halos formados



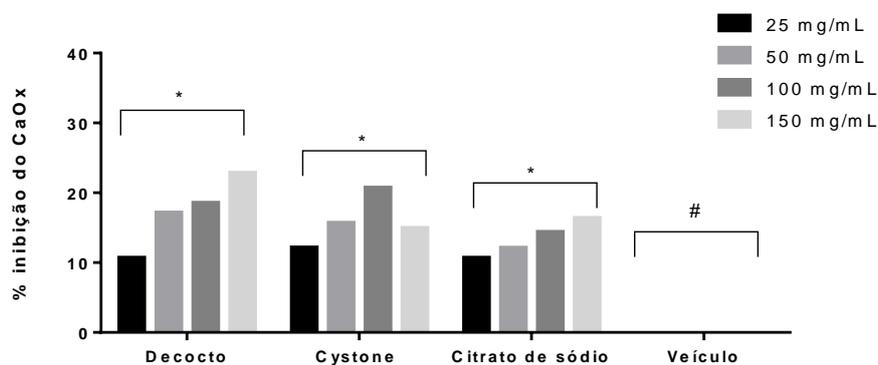
Fonte: Do autor.

Legenda: Halo formado na presença do decocto referente a placa esquerda e para o controle positivo; o citrato de sódio referente a placa direita ambos na dosagem de 150 mg/mL.

Dessa forma, o percentual de inibição do decocto foi comparado com o veículo e controles positivos, por meio dos valores de halos de inibição. O decocto demonstrou halos de inibição similares ou maiores que dos controles positivos (citrato de sódio e Cystone[®]) e diferente do controle negativo ($P \leq 0,05$), portanto, apresentou significativo percentual inibitório da formação de cristais de CaOx (Figura 13 e 14). Com relação a concentração avaliada, tanto o decocto quanto o controle positivo citrato de sódio apresentaram uma resposta dependente da concentração avaliada; efeito dose-resposta. Nos estudos realizados por Patil *et al.* (2017) o percentual inibitório do citrato de sódio também apresentou dependência da concentração, o que corrobora o resultado deste trabalho. A inibição do Cystone[®] não foi dose-resposta, pois a maior dosagem testada não apresentou o maior percentual inibitório de formação de cristais de CaOx (Figura 14). E como já era esperado o controle negativos não apresentou halo de inibição.

Todas as amostras apresentam halos de inibição possuindo uma significativa diferença ($p \leq 0,05$, *two-way* ANOVA) do veículo. Isso demonstra a existência de substâncias no decocto que são consideradas inibidores, e ao difundirem sobre o gel de ágar inibiram a cristalização do CaOx.

Figura 14 – Percentual de inibição da formação de cristais de CaOx nas amostras incubadas por um período de 8 h



Fonte: Do autor.

Legenda: Todos os resultados foram analisados pelo parâmetro *two-way* ANOVA (n=3). * $p \leq 0.05$ indica o nível de significância comparado com o veículo e # $p \leq 0.05$ níveis de significância comparado com as amostras.

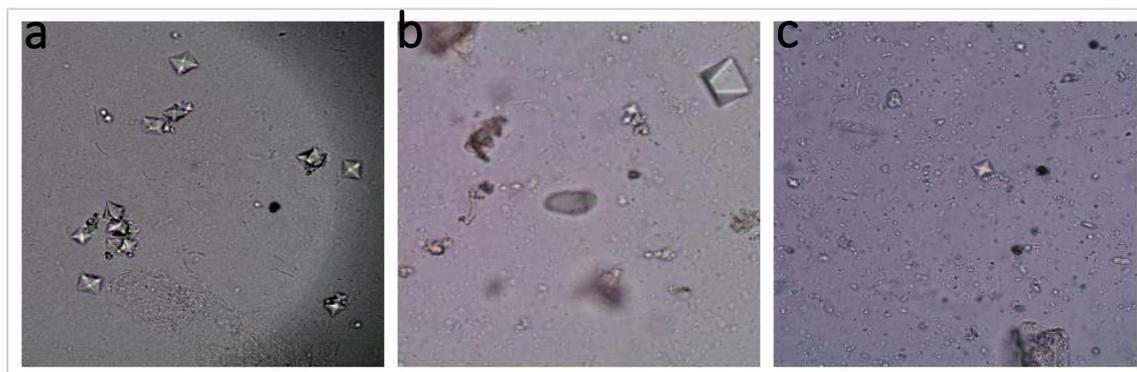
Vale ressaltar que das metodologias *in vitro* descritas na literatura, que se adequavam ao ensaio necessário para avaliação da CaOx, nenhuma delas foi implementada com sucesso. Dessa forma, alterações foram necessárias para que a padronização do experimento fosse alcançada, conforme descrito na seção 5.3.1. O teste utilizado neste trabalho foi desenvolvido por meio da união de duas técnicas, bioautografia descrito para avaliação de inibição de formação de cristais de CaOx e teste em difusão sobre o gel de ágar comum em ensaios antimicrobianos (BALOUIRI et al., 2016; KALE et al., 2017). O método desenvolvido propõe uma triagem simples e rápida para a identificação de substâncias e extratos que possuem a ação inibidora na cristalização do CaOx por meio da formação de halos de inibição, demonstrando resultados satisfatórios e reprodutíveis.

6.2.2 Avaliação da dissolução CaOx: Urina fresca

Os cálculos renais possuem características morfológicas visuais únicas que se correlacionam com a composição química, por exemplo os cálculos do tipo oxalato de cálcio dihidratados (COD) geralmente possuem a forma bipiramidais especuladas. Os cálculos do tipo (COD) podem ser encontrados na urina de pacientes com urolitíase assim como o oxalato de cálcio monohidrato (COM) (DUAN et al., 2013). A ocorrência do COM é devido a hiperocalúria; aumento da excreção de oxalato na urina e COD a hiperocalúria excreção exagerada de cálcio (FROCHOT et al., 2016). Para a avaliação da dissolução dos cristais de CaOx utilizou a urina de uma paciente que possui cálculos

renais do tipo COD (Figura 15 a). A primeira urina da manhã da paciente, diagnosticada com quadro de urolitíase, foi coletada devido a maior saturação de oxalato de cálcio e número de cristais de CaOx presente na urina neste momento.

Figura 15 – Cristais presentes na urina da paciente e a incupação dos cristais



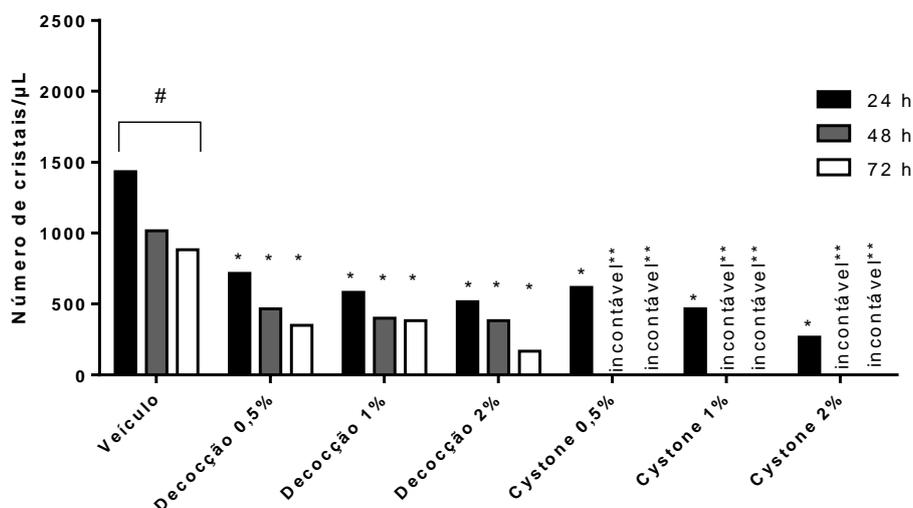
Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Cristais do tipo COD presente na urina da paciente, (b) cristal com a morfologia diferente na presença do Cystone[®] (c) cristais do tipo COD presentes no decocto.

A urina da paciente foi incubada (72 h) com o decocto, o controle positivo Cystone[®] e com o veículo na concentração de 0,5, 1 e 2% onde avaliou-se o pH no início e no final do experimento. No início todas as amostras apresentaram o pH em torno de 4, o mesmo apresentado para o veículo, e ao final do experimento a urina incubada com o decocto e veículo apresentaram o pH em torno de 6 e 7, e o Cystone[®] apresentou um pH alcalino em torno de 8 e 9.

Nas primeiras 24 horas houve uma diminuição no número dos cristais tanto no decocto quanto no Cystone[®] em todas as concentrações avaliadas (Figura 16). No período de 24 a 72 h o decocto na concentração de 2% demonstrou o mais eficiente na dissolução dos cristais de COD comparado com o veículo ($p \leq 0,05$). Após o período de 24 h o Cystone[®] demonstrou a diminuição da composição de COD nas três concentrações testadas, porém com concomitante aparecimento de um cristal morfológicamente diferente de COD (Figura 15 b).

Figura 16 – Número de cristais de CaOx avaliados no período 24, 48 e 72 h



Fonte: Do autor.

Legenda: Os resultados foram analisados pela análise de variância ANOVA *two-way* (n=3). * $p \leq 0.05$ comparado com o veículo, # $p \leq 0.05$ comparado com as amostras e ** Inúmeros cristais apareceram e de diferentes tipos tornando impossível a contagem.

O aparecimento do cristal pode ser devido a atividade microbiana presentes na urina juntamente com o Cystone[®], já que nem o decocto e nem o veículo apresentaram tais mudanças (Figura 15 a e 15 c) e todas as amostras foram incubadas numa mesma fonte de urina e em idênticas condições. Possivelmente o medicamento fitoterápico Cystone[®] possui substâncias que promovem a mudança da morfologia dos cristais de CaOx ou a formação de novos cristais. A atividade microbiana favorece a produção dos íons amônio e fosfato devido a catálise enzimática da uréase na urina (DAS et al., 2017). Na presença de diferentes íons como fosfato, amônio, cálcio, oxalato, magnésio em meio alcalino pode ocorrer a formação de outros tipos de cristais que apresentam morfologias diferentes da COD, o que corrobora a observação destes novos cristais (SAHA; VERMA, 2013). Essa indução da formação de novos cristais pelo Cystone[®], pela primeira vez relatada, merece ser melhor investigada pois pode não ser benéfico ao paciente que utiliza esse medicamento. Um novo ensaio poderia ser realizado adicionando antibiótico na urina para avaliar se o Cystone[®] por si só promoveria a formação destes novos tipos de cristais em urina livre de bactérias.

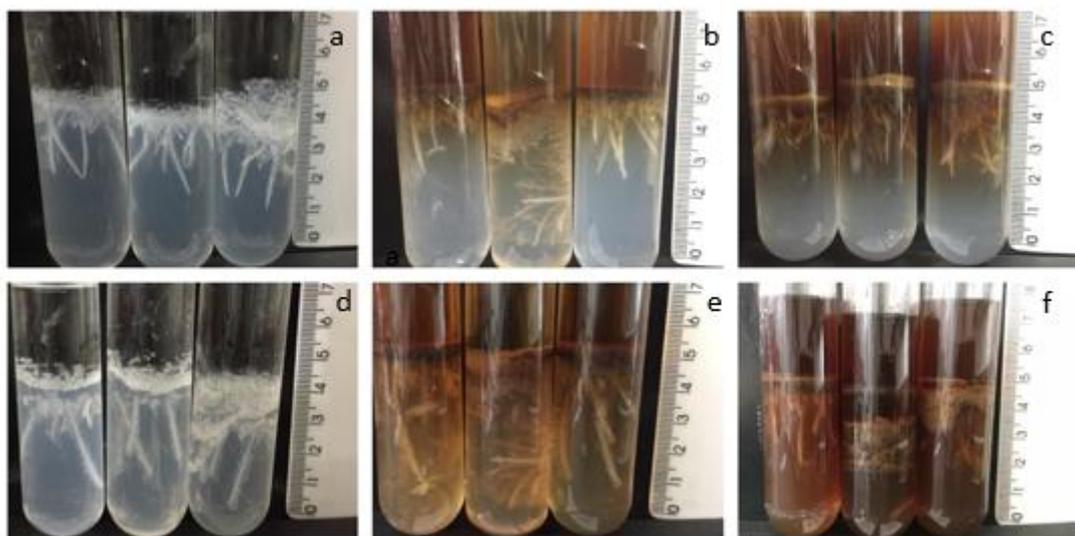
O cálculos de CaOx constitui cerca de 80 % dos cálculos renais, podendo ser COM ou COD e acredita-se que são formados na ausência de inibidores e devido a supersaturação de oxalato de cálcio na urina (EVAN, 2010). Com relação aos resultados apresentados, o decocto das folhas de *C.*

gongylodes pode ser considerado um potencial antiurolítico merecendo maiores estudos que avaliem o seu mecanismo de ação *in vivo*.

6.2.3 Crescimento do cristal estruvita pela difusão em gel

A estruvita (fosfato de amônio e magnésio) é um outro tipo de cristal e representa 10% de ocorrência dos cálculos renal no mundo (SHARMA; KHAN; AHMAD, 2016). Os cálculos de estruvita são formados principalmente em quadros de infecções no aparelho urinário por bactérias produtoras da enzima uréase (ERICKSON, S. B.; VRTISKA, T. J.; LIESKE, 2011, DAS et al., 2017). Desse modo, a inibição e a dissolução dos cristais de estruvita foram analisados utilizando a técnica *in vitro* de crescimento de cristais pela difusão em gel ilustrado na Figura 17 (KALLESWARAN et al., 2018).

Figura 17 – Avaliação do crescimento dos cristais de estruvita



Fonte: Do autor.

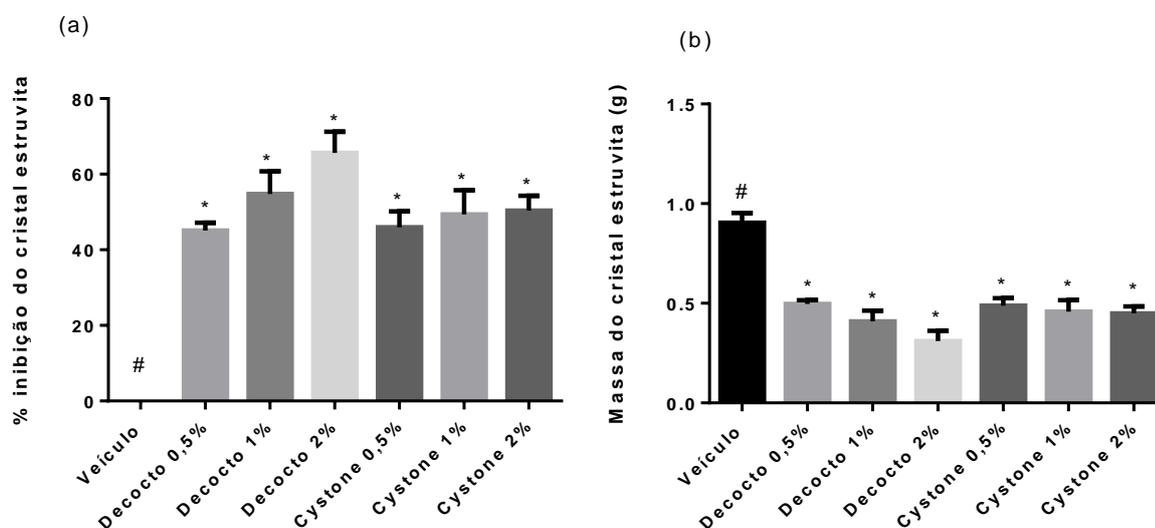
Legenda: Os incubados por 48 h (a) veículo, (b) Cystone[®] 2% e (c) decocto 2%. Análise do crescimento ao final do experimento (30 dias de incubação) (d) veículo (e) Cystone[®] 2% and (f) decocto 2%. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

Ao final do teste (30 dias) pôde-se avaliar o percentual de inibição da formação de cristais de estruvita por comparação com o veículo. A inibição do decocto novamente foi dose-dependente como mostra a Figura 18 a, diferentemente da inibição apresentada pelo Cystone[®]. O decocto apresentou o maior percentual de inibição na concentração de 2% em torno de 60 a 70% e o Cystone[®] nas doses

de 1 e 2%, inibição em torno de 40 a 50%. O percentual de inibição do Cystone[®] nas concentrações de 1 e 2% apresentaram estatisticamente semelhantes entre si (Figura 18, $p \leq 0.05$).

As massas dos cristais nos grupos tratados com o decocto e Cystone[®] foram comparadas com o grupo veículo ao final do experimento, apresentando serem estatisticamente diferentes do grupo do veículo ($p \leq 0.05$; Figura 18 b). Com relação a morfologia dos cristais formados pela técnica utilizada, os cristais podem assumir diferentes tipos de morfologias como dendrítico, prismático, piramidal, retangular, estrela, agulha e plaquetas (CHAUHAN; JOSHI, 2014).

Figura 18 – Percentual de inibição e a quantidade de massa dos cristais de estruvita



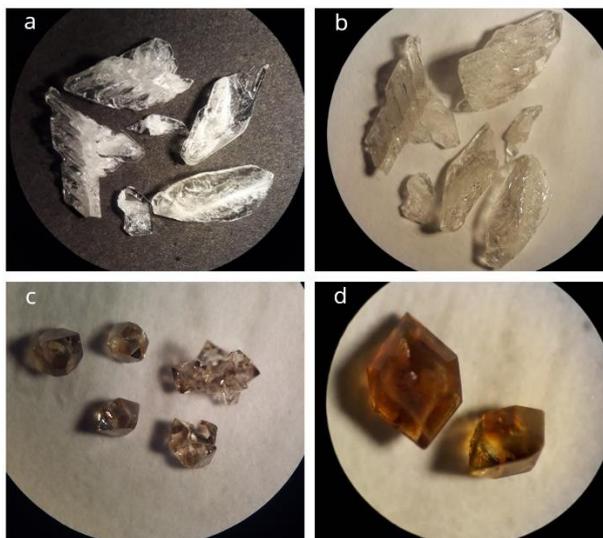
Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Percentual de inibição na concentração de 0,5, 1 e 2%, (b) A massa dos cristais de estruvita nas diferentes amostras e concentrações avaliadas. Os resultados do ensaio de crescimento do cristal estruvita foram analisado pelo ANOVA *one-way* seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett ($n=3$). * $p \leq 0,05$ comparado com o veículo e # $p \leq 0,05$ comparado com as amostras.

A morfologia dos cristais de estruvita podem depender de diversos fatores, tais como a concentração utilizada nos reagentes, pH e a gravidade específica do gel (DAS et al., 2015). Os cristais apresentaram a morfologia do tipo dendrítico, agulha e plaqueta; morfologias estas apresentadas em outros trabalhos utilizando condições semelhantes (CHAUHAN et al., 2013; KALEESWARAN et al., 2018), o que corrobora os resultados encontrados. Alguns cristais apresentaram morfologias diferentes dos cristais presentes no veículo (Figura 19 a). Embora todos os testes tenham sido realizados sob as mesmas condições, a presença de substâncias no decocto e Cystone[®] favorecerem o surgimento de alguns poucos cristais morfologicamente diferentes (Figura

19 c e d). Também observou a presença de cristais escuros (Figura 19 c e d), que indica que possivelmente ao se cristalizarem houve a inclusão de substâncias das amostras nos cristais, apresentando assim a coloração semelhante das amostras (CHAUHAN; JOSHI; VAIDYA, 2011).

Figura 19 – Diferentes aspectos referente aos cristais de estruvita

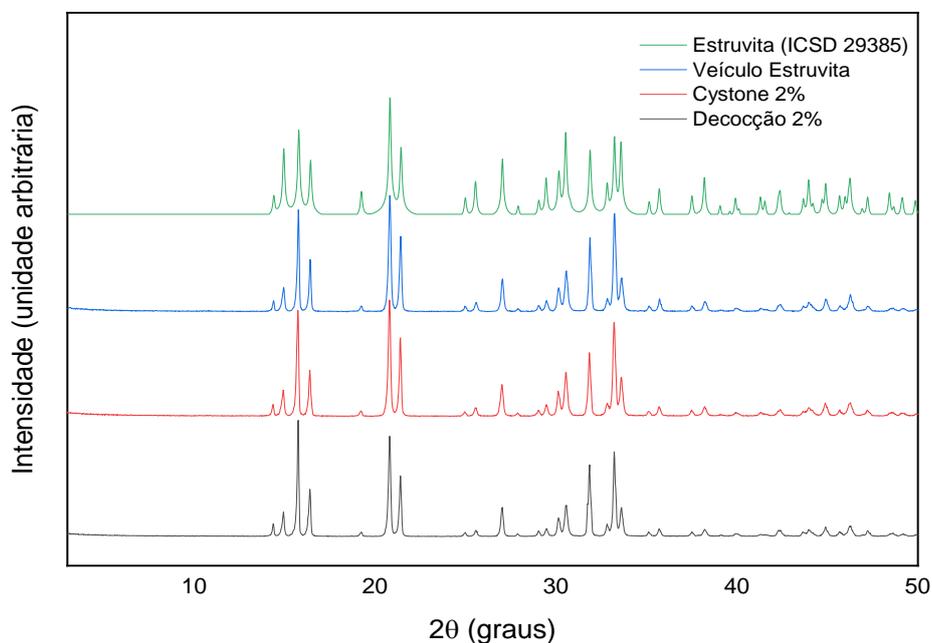


Fonte: Do autor.

Legenda: Diferentes tipos de morfologia (a) struvite (b) cristal na presença do decocto 0.5% (c) na presença do Cystone[®] 1% e no (d) decocto 1%.

Os cristais coletado ao final do experimento foram analisados por meio da técnica de difração de raio X por pó. A comparação dos padrões experimentais de PXRD do veículo, Cystone 2% e e decocto 2%) com os dados relatados na literatura Abbona *et al.* (1984) confirmou a identidade estrutural dos cristais e a pureza total (Figura 20). O padrão calculado de estruvita foi obtido pelo *Inorganic Crystal Structure Database* (código ICSD 29385), utilizando o software Mercury (MACRAE et al., 2006). Os resultados mostraram que os cristais obtidos na presença de veículo, Cystone 2% e Decocto 2%, consistem apenas em estruvita, que cristalizaram no sistema cristalino ortorrômbico ($Pmn2_1$, grupo espacial) com os parâmetros da célula unitária, $a = 6,955 \text{ \AA}$, $b = 6.142 \text{ \AA}$, $c = 11.218 \text{ \AA}$ e $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

Figura 20 – Difratoograma experimental padrão PXRD dos cristais incubados com Cystone 2%, decocto 2% e estruvita (código padrão calculado ICSD 29385)



Fonte: Do autor.

Vale ressaltar que independente da morfologia dos cristais, o decocto demonstrou tanto inibição do crescimento/formação dos cristais quanto a diminuição do número de cristais. Isso, juntamente com os resultados em cristais de CaOx, vem ser as primeiras evidências científicas a corroborarem o uso etnofarmacológico como antiurolítico da espécie de *C. gongyloides*. Além disso, é o primeiro trabalho a caracterizar quimicamente a espécie (detalhado nos próximos itens: 6.4 e 6.5) que pode ser fonte para descoberta de novos protótipos a fármacos úteis tanto para o tratamento de inflamação quanto da urolitíase. Outro ponto relevante é que a atividade multialvo evidenciada para o decocto, de inibição das cascatas da COX, LOX e da formação de cristais de CaOx e estruvita torna essa bebida promissora para o tratamento de pessoas que sofrem com cálculos renais e para o desenvolvimento de novo fitoterápico.

Devido a *C. gongyloides* ser utilizada na alimentação dos índios Kayapó, foi considerada uma PANC (KINUPP; LORENZI, 2014; LEAL; ALVES; HANAZAKI, 2018). Neste sentido provavelmente pode ser consumida sem apresentar efeitos adversos por quem sofre de problemas inflamatórios e de cálculo renal. Além disso, seu baixo potencial toxicológico ressalta o valor da planta como fonte para o descoberta de tratamentos alternativos (droga vegetal, fitoterápico ou

protótipo a fármaco) capazes de inibir a formação de cálculos renais, dissolvê-los e de tratar processos inflamatórios com menores, riscos, efeitos adversos e maior eficácia que os tratamentos disponíveis atualmente.

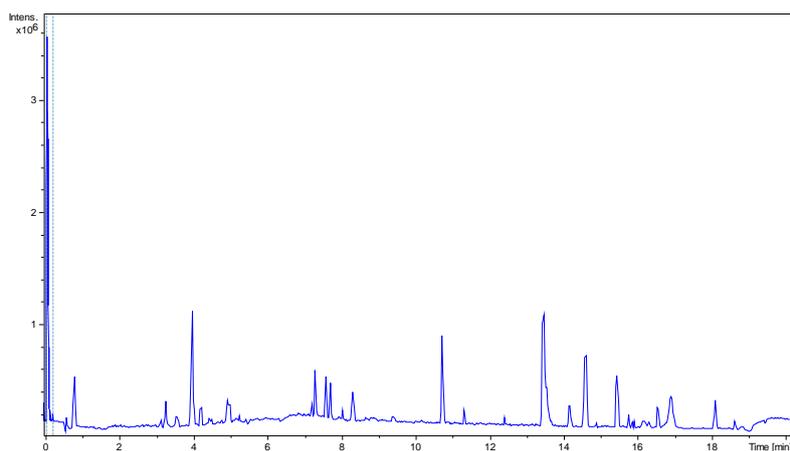
6.3. ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E DESREPLICAÇÃO

Os cromatogramas do decocto das folhas de *C. gongylodes* foram obtidos por UHPLC-UV-HRMS no modo positivo e negativo (Figuras 20 e 21). O procedimento de desreplificação foi realizado por meio de um banco de dados “*in house*” construído com as substâncias isoladas e identificadas do gênero *Cissus* descritas na literatura, totalizando 174 substâncias. Isso aumenta o grau de confiança da desreplificação (KIND; FIEHN, 2007, WOLFENDER et al., 2019), sendo classificada como desreplificação agressiva, por alguns autores (KLITGAARD et al., 2014)

A dereplificação das substâncias presentes no decocto foram realizados no software Compass TargetAnalysis 1.3 da Bruker Daltonics, que compara a massa molecular monoisotópica das substâncias presentes no banco de dados com a massa dos íons detectados. Os parâmetros utilizados pelo software foram: a tolerância de erro das massas de ± 3 mDa e ± 5 ppm e o msigma de até 30. O banco de dados construído no excel foi salvo no formato .csv para ser utilizado pelo software para realizar a desreplificação. Todas substâncias desreplificadas (Tabelas 4 e 5) se enquadraram dentro das regras de ouro para desreplificação, como a do nitrogênio e de número de carbonos (KIND e FIEHN, 2007; THEODORIDIS et al. 2012). Desta maneira, foi possível desreplificar 17 substâncias no modo negativo e 25 no positivo com nível 3 de confiança *Metabolomics standards initiative* (SUMNER et al., 2007; SUMNER et al. 2015).

Pode se observar que maior parte das substâncias presentes no decocto são substâncias fenólicas, sendo que muitos flavonoides, glicosilados ou não, e derivados do ácido cinâmico foram desreplificados (Tabelas 4 e 5). As curvas de absorção no UV observado para as substâncias do decocto, corroboram estes resultados, em sua maioria coincidem com as curvas características de flavonoides (λ_{max} de 254 e 325 nm) e de derivados do ácido cinâmico (λ_{max} de 300 e 315 nm) (GOBBO-NETO; LOPES, 2008).

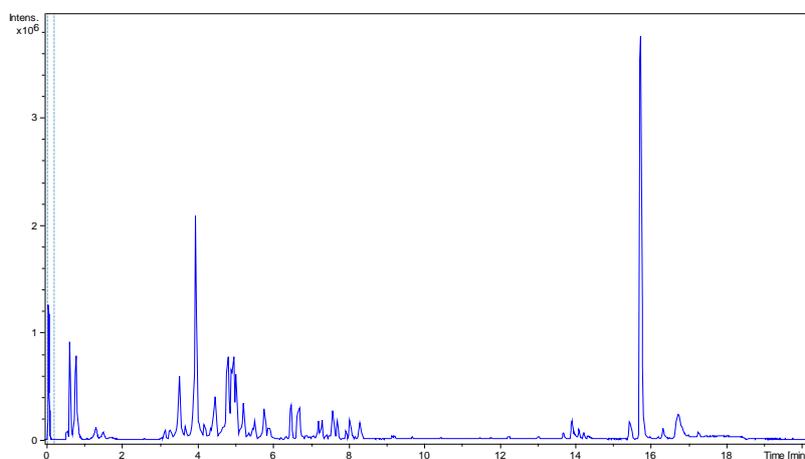
Figura 21 – Cromatograma de UHPLC-HRMS no modo positivo do decocto da *C. gongylodes*.



Fonte: Do autor.

Nota: Injeção de 20 μL da amostra a 1 mg/mL (MeCN:H₂O, 1:1, v/v), coluna RSLC C18- 100 mm \times 2,1 mm; 2,2 μm de diâmetro de partículas Acclaim™, fluxo: 0,4 mL/min, gradiente de MeCN e H₂O (ambos com 0,1% de ácido fórmico e 0,025% de hidróxido de amônio) de 5-99% de MeCN em 15 min e 99-5% em 5 min.

Figura 22 – Cromatograma de UHPLC-HRMS no modo negativo do decocto da *C. gongyloides*.



Fonte: Do autor.

Nota: Injeção de 20 μL da amostra a 1 mg/mL (MeCN:H₂O, 1:1, v/v), coluna RSLC C18- 100 mm \times 2,1 mm; 2,2 μm de diâmetro de partículas Acclaim™, fluxo: 0,4 mL/min, gradiente de MeCN e H₂O (ambos com 0,1% de ácido fórmico e 0,025% de hidróxido de amônio) de 5-99% de MeCN em 15 min e 99-5% em 5 min.

Tabela 3 – Desreplicação das substâncias presentes no decocto detectados por UHPLC-HRMS no modo negativo, usando banco de dados de *Cissus*.

Área	[M-H] ⁻ (m/z)	Rt (min)	Erro (mDa)	msigma	Fórmula Molecular	Hits	Desreplicação
345303	169.0144	0.85	-0.2	6.9	C ₇ H ₆ O ₅	1	Gallic acid
524113	169.0143	1.57	0.0	1.3	C ₇ H ₆ O ₅	1	Gallic acid
34345	169.0151	3.40	-0.8	18.8	C ₇ H ₆ O ₅	1	Gallic acid
386742	609.1467	4.38	-0.6	8.9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1	Rutin
712136	609.1465	4.82	-0.4	7.0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1	Rutin
6333898	463.0891	4.99	-0.9	2.8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	2	Quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside
2780783	447.0940	5.08	-0.7	2.5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4	Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside Luteolin-8-C-glucoside Quercetina 3-α-raminosídeo
492105	463.0896	5.21	-1.4	3.2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	2	Quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside
413299	447.0940	5.41	-0.8	8.3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4	Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside Luteolin-8-C-glucoside Quercetina 3-α-raminosídeo
771777	431.0988	5.57	-0.5	15.7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6	Kaempferol-7-O-α-L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranoside Apigenin-8-C-glucoside Apigenin-6-C-glucoside Canferol 3-α-raminosídeo Adnatoside

400655	447.0943	5.77	-1.0	9.8	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4	Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside Homoorientin Quercetina 3- α -raminosídeo
620113	301.0352	5.93	0.2	3.3	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1	Quercetin
1167325	285.0400	6.70	0.4	2.3	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2	Kaempferol Luteolina
1172874	301.0352	6.74	0.1	4.1	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1	Quercetin
13617	329.0326	6.96	-2.3	n.a.	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	1	3,3'-Dimethyllellagic acid
2699	181.0486	8.91	2.1	n.a.	C ₉ H ₁₀ O ₄	1	Syringaldehyde
1785	181.0482	11.08	2.4	26.3	C ₉ H ₁₀ O ₄	1	Syringaldehyde

Fonte: Do autor.

Tabela 4 – Desreplicação das substâncias presentes no decocto detectados por UHPLC-HRMS no modo positivo, usando banco de dados de *Cissus*.

Área	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	Rt (min)	Erro (mDa)	msigma	Fórmula Molecular	Hits	Desreplicação
23872	171,0296	1,51	-0,8	17,5	C ₇ H ₆ O ₅	1	Gallic acid
12038	165,0542	3,58	0,4	9,3	C ₉ H ₈ O ₃	1	4-Hydroxycinnamic acid
46699	163,0404	3,95	-1,5	6,5	C ₉ H ₆ O ₃	1	Hydroxychromone
10345	309,1159	4,26	-3,7	18,7	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	1	E-7-O-Methylpongamol
176700	225,1479	4,27	0,6	9,2	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	1	Vomifoliol
21284	225,1476	4,45	0,9	12,5	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	1	Vomifoliol

251296	611,1603	4,51	0,4	15,1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1	Rutin
675437	611,1588	4,83	1,9	10,5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1	Rutin
236960	433,1110	4,91	1,9	15,9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6	Kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside Vitexin (apigenin-8-C-glucoside) isovitexin (apigenin-6-C-glucoside) Canferol 3- α -raminosídeo Adnatoside
1756625	465,1006	4,98	2,2	5,4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	2	Quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside
2957700	303,0475	4,99	2,5	3,9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1	Quercetin
425539	449,1052	5,07	2,6	8,2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4	Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside Homoorientin Quercetina 3- α -raminosídeo
/911834	303,0475	5,27	2,4	2,2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1	Quercetin
344194	435,0896	5,27	2,6	7,5	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	3	Quercetin-3-O- α -L-arabinofuranoside Quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside 11-O-p-Hydroxybenzoylnorbergenin
55021	287,0518	5,28	3,2	1,9	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2	Kaempferol Luteolina
20644	449,1070	5,55	0,8	28,7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4	Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside Homoorientin (luteolin-8-C-glucoside) Quercetina 3- α -raminosídeo

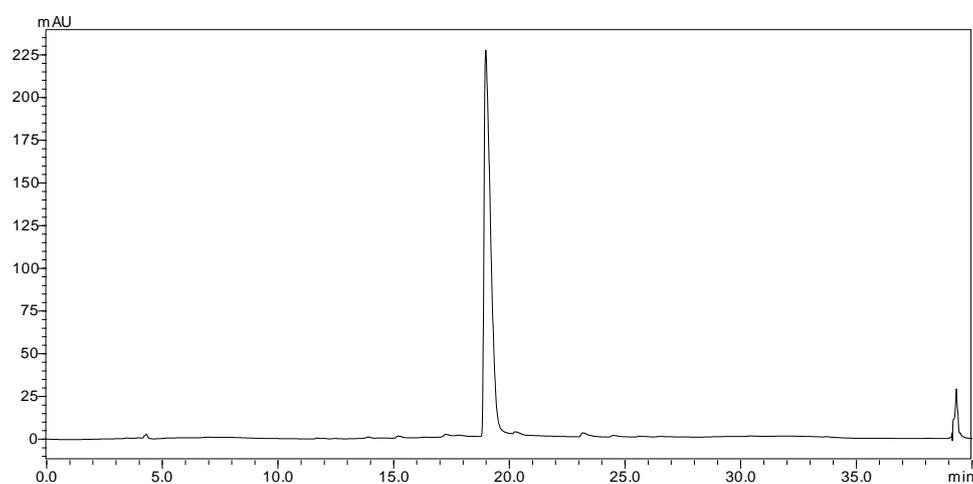
103542	433,1101	5,56	2,8	17,0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	6	Kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside Vitexin (apigenin-8-C-glucoside) Isovitexin (apigenin-6-C-glucoside) Canferol 3- α -raminosídeo Adnatoside
22979	287,0524	5,59	2,6	26,7	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2	Kaempferol Luteolina
77063	449,106	5,76	1,8	13,3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4	Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside Homoorientin (luteolin-8-C-glucoside) Quercetina 3- α -raminosídeo
13336	465,1023	5,81	0,5	26,0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	2	Quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside
36787	287,0537	6,69	1,3	24,4	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2	Kaempferol Luteolina
30813	295,0998	6,80	-3,3	24,9	C ₁₈ H ₁₄ O ₄	1	Pongamol
15542	185,0418	7,09	2,7	21,3	C ₈ H ₈ O ₅	1	Methyl gallate
16969	295,1007	7,65	-4,3	17,8	C ₁₈ H ₁₄ O ₄	1	Pongamol
45625	413,3737	14,34	4,1	29,9	C ₂₉ H ₄₈ O ₁	1	Stigmasterol

Fonte: Do autor.

6.4 ESTUDO FITOQUÍMICO

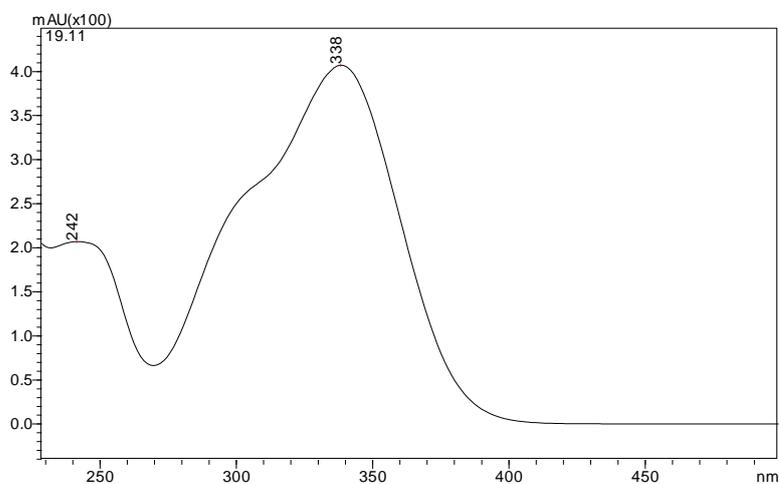
A fração FoAc foi então submetida a técnica de separação por tamanho pela Sephadex[®] LH-20 e subsequente purificação em HPLC levando ao isolamento da substância 1. Assim a substância 1 foi isolada na forma de um sólido incolor, e apresentou o tempo de retenção de 19,0 min, e o comprimento de onda 242-338 nm como pode ser observado nas Figuras 22 e 23.

Figura 23 – Cromatograma em 254 nm da substância 1 obtido por HPLC-UV-DAD (coluna C18 (ODS-4) 5 µm diâmetro de partícula e dimensões 4,6 mm x 250 mm, fluxo de 1 mL/min. Eluente: gradiente de 5 a 100 % de MeCN:H₂O com 0,1 % de ácido acético por 40 min.



Fonte: Do autor.

Figura 24 – Curva de absorção no UV da substância 1, que apresentou picos de absorção nos comprimentos de onda 242, 300 e 338 nm.



Fonte: Do autor.

Dois flavonoides glicosilados foram praticamente isolados, porém em não se apresentaram uma quantidade satisfatória para a realização de outras técnicas de separação e obtenção de espectros que pudessem ter resolução necessária para completa identificação. Há ainda uma série de frações obtidas a partir da FaAc que são promissoras para o isolamento de novas substâncias e até mesmo possivelmente inéditas que serão futuramente trabalhadas por nosso grupo de pesquisa.

6.4.1. Determinação estrutural da substância 1

Para a determinação estrutural da substância 1, fez-se necessário apenas a análise dos espectros de RMN unidimensionais de ^1H e ^{13}C . Desse modo, foi possível observar que este metabólito se trata de uma substância já isolada e pertencente ao grupo dos fenilpropanoides. A interpretação do espectro obtido juntamente com a comparação dos dados da literatura (LU et al., 2008), possibilitou a sua identificação de forma inequívoca.

No espectro de RMN de ^1H da substância 1 (Figura 24, Tabela 6) (Apêndice A1) foram observados dois conjuntos de sinais com o deslocamento químico δ 6,82 e 7,65, dos H_α [$\delta_{\text{H}\alpha}$ 6,82 (1H, *dd*, J 15,8 e 7,8 Hz)] e do H_β [$\delta_{\text{H}\beta}$ 7,65 (1H, *d*, J 15,8 Hz)], com constante de acoplamento 15,8 Hz, característica de hidrogênios olefilicos *trans*. O hidrogênio α apresenta ainda constante de acoplamento de 7,8 Hz e multiplicidade duplo duplete devido ao acoplamento com o hidrogênio ligado a carbonila α,β insaturada [$\delta_{\text{H}\gamma}$ 9,61 (1H, *d*, 7,8 Hz)].

Além disso, na região de aromáticos, entre 6 e 8 ppm, verificou-se também sinais relativos aos hidrogênios do anel aromático tri-substituído [$\delta_{\text{H}5}$ 7,04 (1H, *d*, J 8,3 Hz), $\delta_{\text{H}6}$ 7,29 (1H, *dd*, J 8,3 e 2,0 Hz), $\delta_{\text{H}2}$ 7,37 (1H, *d*, J 2,0 Hz)]. Os hidrogênios H5 e H2 apresentam desdobramento do tipo duplete devido ao acoplamento com o hidrogênio H6, com constantes de 8,3 Hz e 2,0 Hz, respectivamente. O hidrogênio H6, por sua vez, apresenta desdobramento do tipo duplo duplete com constantes de acoplamento de 8,3 e 2,0 Hz, referente ao acoplamento em orto com H5 e em meta com H2, respectivamente.

Em δ 3,81 (*s*) devido a intensidade dos sinais que integra para 6 hidrogênios e a região do deslocamento químico ser característico, foi possível identificar os sinais dos hidrogênios metoxílicos sobrepostos.

Tabela 5 – Dados de RMN do (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz)	Posição*	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^1\text{H}$ (m, J Hz)*
1	126,9	-	1	127,2	-
2	110,5	7,37 (d, 2,0)	2	110,0	7,08-7,40
3	149,0	-	3	149,5	-
4	151,6	-	4	152,1	-
5	111,6	7,04 (d, 8,3)	5	110,3	7,08-7,40
6	123,7	7,29 (dd, 8,3 e 2,0)	6	123,6	7,08-7,40
β	153,6	7,65 (d, 15,8)	B	152,9	6,91 (d, 15,8)
α	126,5	6,82 (dd, 15,8 e 7,8)	A	126,9	6,61 (dd, 15,8 e 7,7)
9	194,1	9,61 (d, 7,8)	9	193,7	9,66 (d, 7,7)
3-OCH ₃	55,6	3,81 (s)	3-OCH ₃	56,0	3,92 (s)
4-OCH ₃	55,6	3,81 (s)	4-OCH ₃	56,1	3,94 (s)

Fonte: Do autor.

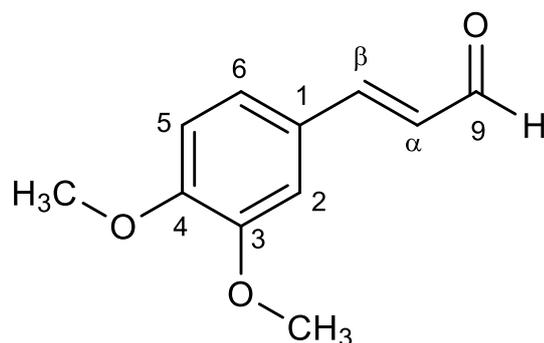
Legenda: RMN ¹H (300 MHz) e C¹³ (75 MHz) em DMSO-*d*6 e * RMN ¹H (500 MHz) e C¹³ (125 MHz) em CDCl₃ (LU et al., 2008).

No espectro de RMN de ¹³C (Apêndice A2) observou-se sinais na região de δ 100 e 170 ppm, correspondentes aos carbonos sp² do anel aromático trissubstituído [δ_{C1} 126,9, δ_{C2} 110,5, δ_{C3} 149,0, δ_{C4} 151,6, δ_{C5} 111,6 e δ_{C6} 123,7]. Os carbonos C4 e C3 apresentam substituintes metoxilas e o carbono C1 apresentou-se como carbono quaternário ligado carbono β insaturado a carbonila. O carbono C4 apresentou-se mais desblindado que o carbono C3 por estar orientado na posição *para* em relação ao grupo α e β insaturado a carbonila. Os sinais dos carbonos das metoxilas foram observados sobrepostos, com deslocamento químico δ_{C} 55,6.

Na região mais desblindada, entre δ 150 e 200, observou-se o sinal do carbono da carbonila, em δ 194,1. O carbono α insaturado a carbonila apresentou sinal em δ_{C} 126,5 e o carbono β em δ_{C} 153,6.

Então, a partir da análise espectroscópica da amostra, foi possível identificar o fenilpropanoide denominado de (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal (Figura 24) e também conhecido como 3'-oxometilisoegenol. Essa substância foi recentemente isolada dos tubérculos da espécie *Bulbophyllum retusiusculum*, uma orquídea da família Orchidaceae (FANG et al., 2018). E também isolada dos extratos etanólicos dos rizomas da espécie *Zingiber cassumunar* da família Zingiberaceae (LU et al., 2008).

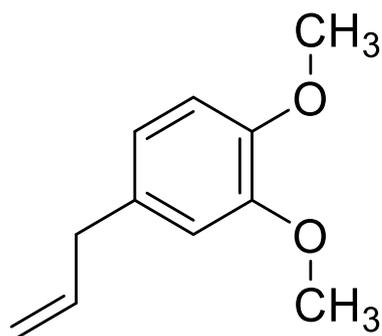
Figura 25 – Representação do fenilpropanoide denominado de (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal



Fonte: Do autor.

Em um outro estudo a substância 3'-oxometilsoeugenol foi apresentada como metabólito oxidativo do metileugenol (Figura 25) . O metileugenol é encontrado em vários alimentos como noz moscada, pimenta, capim limão, manjerição, erva doce e também em diversos óleos essenciais. Dessa forma, vários metabólitos oxidativos do metileugenol, como o 3'-oxometilsoeugenol, foram sintetizados e avaliados em células de carcinoma de cólon humano e concluíram que uma dieta rica de alimentos que possuem metileugenol e/ou seus metabólitos contribuem potencialmente como substâncias quimiopreventivas (GROH et al., 2013).

Figura 26 – Representação do metileugenol.



Fonte: Do autor.

Ainda não há relatos de estudos fitoquímicos e nem evidências do isolamento da substância (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-enal no gênero *Cissus*, sendo este o primeiro relato. Esta substâncias também não possui relato de propriedades anti-inflamatórias e antiulcerativas, o que pode ser futuramente investigado.

7 CONCLUSÃO

O decoto de *C. gongyloides* apresentou a atividade multi-alvo atuando na inibição e a dissolução de cálculos renais de maior prevalência, cálculos de CaOx e de estruvita, além de possuir a ação anti-inflamatória via inibição das principais vias da inflamação a COX e a LOX. Esse mecanismo de ação revela potencial de ser mais eficaz e com menores efeitos adversos do que o anti-inflamatórios não estereoidais atuais, que não são capazes de inibir ambas as vias, COX e LOX. Além disso, essa atividade dual tanto antiurolítica quanto anti-inflamatória é altamente desejável para o tratamento de urolitíase. Devido a *C. gongyloides* ser utilizada na alimentação dos índios Kayapó, está sendo considerada uma PANC podendo possuir um forte indício de não apresenta alto potencial toxicológico, o que agrega ainda mais ao potencial farmacológico do decoto de *C. gongyloides*. Neste sentido o decoto tem grande potencial para contribuir no desenvolvimento de tratamentos para urolitíase e ou doenças que envolvam inflamação, merecendo ser mais estudada. Vale ressaltar que este trabalho permitiu comprovar pela primeira vez dois dos usos etnofarmacológicos da espécie e estabelecer seus promissores mecanismos de ação. Por fim, também foi possível isolar e identificar a substância (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propenal pertencente a classe dos fenilpropanoides, pela primeira vez no gênero *Cissus*. Além de caracterizar a composição química do decoto, por meio de estratégia metabolômica, como um extrato rico em substâncias fenólicas como flavonoides, flavonoides glicosilados e fenilpropanoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627-635, 2018.
- ABBONA, F., et al. Synthetic struvite, $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$: correct polarity and surface features of some complementary forms. **Acta Crystallographica Section B**. 40, 223-227. 1984.
- ADEGOKE, S. A.; OPATA, O. M.; OLAJIDE, J. E. Antimicrobial activity of the aqueous, methanol and chloroform leaf extracts of *Cissus multistriata*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1168-1172, 2010.
- AFSHAR, K. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and nonopioids for acute renal colic (Protocol). **Cochrane Library**, v. 2, p. 1-9, 2010.
- AHMADU, A. A.; ONANUGA, A.; AQUINO, R. Flavonoide glycosides from the leaves of *Cissus ibuensis* Hook (Vitaceae). **The African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 7, n. 3, p. 225-230, 2010.
- AHMED, S.; HASAN, M. M.; MAHMOOD, A. Z. Antiurolithiatic plants in different countries and cultures. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 1, p. 102-115, 2016.
- AHMED, S.; HASAN, M. M. Exploring globally used antiurolithiatic plants of S to Z families: Including Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Urticaceae, Vitaceae, Zingiberaceae and Zygophyllaceae. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 1430-1436, 2017.
- AKOMOLAFE, S. F. et al. Inhibitory effect of aqueous extract of stem bark of *Cissus populnea* on ferrous sulphate - and sodium nitroprusside-induced oxidative stress in rat's testes *in vitro*. **International Scholarly Research Notices: Pharmacology**, p. 1-7, 2013.
- ALBERT, A. et al. Expression of heterologous oxalate decarboxylase in HEK293 cells confers protection against oxalate induced oxidative stress as a therapeutic approach for calcium oxalate stone disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 426-433, 2017.
- ALELIGN, T.; PETROS, B. Kidney stone disease: an update on current concepts. **Advances in Urology**, p. 1-12, 2018.
- ALMEIDA, G.S.S.A. et al. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 856-865, 2014.
- ALMEIDA, R. E. et al. Anxiolytic and anticonvulsant effects on mice of flavonoids, linalool, and α -tocopherol presents in the extract of leaves of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 6, p. 1-6, 2009.
- ALSHAWSH, M. O. et al. Assessment of antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 4, p. 453-456, 2009.

ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 223-230, 2003.

ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P.; TAKASE, I. Extração sequencial de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 844-848, 2005.

AZEVEDO, L. F. P. et al. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 209-215, 2014.

BALOUIRI, M. et al. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BARREIRA, T. F. et al. Diversity and equivalence of unconventional food plants in rural zone of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, 2015.

BAUR J. A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, p. 337-342, 2006.

BAWARI, S.; SAH, A. N.; TEWARI, D. Antiuro lithiatic activity of *Daucus carota*: An *in vitro* study. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 5, p. 880-884, 2018.

BELTRAME, F. L. et al. Estudo Fitoquímico e avaliação do potencial antiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.

BELTRAME, F.; FERREIRA, A.; CORTEZ, D. Coumarin glycoside from *Cissus sicyoides*. **Natural Product Letters**, v. 16, n. 4, p. 213-216, 2002.

BESERRA, F. P. et al. *Cissus sicyoides*: Pharmacological mechanisms involved in the anti-inflammatory and antidiarrheal activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 149, p. 1-15, 2016.

BHUJADE, A. M. et al. Evaluation of *Cissus quadrangularis* extracts as an inhibitor of COX, 5-LOX, and proinflammatory mediators. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 989-996, 2012.

BHUTANI, K. K.; KAPOOR, R.; ATAL, C. K. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 407-410, 1984.

BIESKI, I. G. C. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-36, 2012.

BIESKI, I. G. C. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of valley of Juruena region, legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383-423, 2015.

BINDHU, B.; SWETHA, A. S.; VELURAJA, K. Studies on the effect of *Phyllanthus emblica*

extract on the growth of urinary type struvite crystals *in vitro*. **Clinical Phytoscience**, v. 1, n. 3, p. 1-7, 2015.

BISSETT, J. *Pestalotiopsis-Menezesiana* on greenhouse plantings of *Cissus rhombifolia* with notes on related fungi occurring on Vitaceae. **Canadian Journal of Botany Revue Canadienne De Botanique**, v. 60, n. 12, p. 2570-2574, 1982.

BOUSLIMANI, A. et al. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 718-729, 2014.

BRANDÃO, L. G. M. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 720, p. 141-148, 2008.

BRANDÃO, S. G. et al. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 223-236, 2011.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Medica**, v. 69, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n.1, p. 75-91, 2018.

CARDINAL, S. et al. Anti-inflammatory properties of quebecol and its derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 2, p. 440-444, 2016.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CATES, R. G. et al. Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 35, p. 2616-2627, 2013.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 355-362, 2011.

CHAGAS-PAULA, D. A.; ZHANG, T.; EDRADA-EBEL, R. A Metabolomic approach to target compounds from the Asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. **Metabolites**, v. 5, p. 404-430, 2015.

CHANG, W. C. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Cissus repens* in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, p. 1-10, 2012.

CHATTERJEE, B. N. Role of Cystone in various urinary disorders. **Probe**, v. 22, n. 1, p. 27-30, 1982.

- CHAUHAN, C. K.; JOSHI, M. J.; VAIDYA, A. D. B. Growth inhibition of struvite crystals by the aqueous root extract of *Rotula aquatica*. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 48, p. 202-207, 2011.
- CHAUHAN, C. K.; JOSHI, M. J. *In vitro* crystallization, characterization and growth-inhibition study of urinary type struvite crystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 362, p. 330-337, 2013.
- CHAUHAN, C. K.; JOSHI, M. J. Growth and characterization of struvite-Na crystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 401, p. 221-226, 2014.
- CHUANG, L. et al. Ethanolic extract of *Origanum vulgare* suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1-11, 2018.
- CHUKWUEMEKA, S. E. et al. Antibacterial activity : A comparison of ripe and unripe fruit extracts of *Cissus multistriata* (Vitaceae) plant. **Journal of Bacteriology Research**, v. 3, n. 5, p. 83-87, 2011.
- CRUCES, I. L. et al. Plantas medicinais no controle de urolitíase. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 780-788, 2013.
- DALBONI, T.M. et al. Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging. **Cytokine**, v. 61, p. 716-719, 2013.
- DAS, M. et al. Phytochemical analysis , antioxidant activity and *in vitro* growth inhibition of struvite crystals by *Ipomoea eriocarpa* leaf extracts. **Food Biochemistry**, v. 40, p. 148-160, 2015.
- DAS, P. et al. Potential therapeutic activity of phlogacanthus thyriformis Hardow (Mabb) flower extract and its biofabricated silver nanoparticles against chemically induced urolithiasis in male wistar rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 621-629, 2017.
- DE FRANÇA, I. S. X.; DE SOUZA, J. A.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: beneficios e malefícios das plantas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.
- DE SOUZA, et al. A uva roxa, *Vitis vinifera L.* (Vitaceae) – seus sucos e vinhos na prevenção de doenças cardiovasculares. **Natureza On Line**, v. 4, n. 2, p. 80-86, 2006.
- DIAS, G. T. et al. Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 8-12, 2017.
- DRESCH, R. R. Potential use of secondary products of the agri-food industry for topical formulations and comparative analysis of antioxidant activity of grape leaf polyphenols. **Natural Product Research**, v. 32, n. 4, p. 486-492, 2018.
- DUAN, X. Differentiation of calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate stones using quantitative morphological information from micro-computerized and clinical computerized tomography. **The Journal of Urology**, v. 189, n. 6, p. 2350-2356, 2013.
- DUDLEY, E. et al. Targeted metabolomics and mass spectrometry. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 80, p. 45-83, 2010.

- EMMANUEL, N. Ethno-medico-botany, theory and philosophy: case of traditional medicinal plant uses in hemiplegia and neuralgia, in bui division, north west region of Camerron. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 12, p. 377-392, 2015.
- ENEMUOR, S. C.; OMALE, J. JOSEPH, E. M. Antibacterial activity: A comparison of ripe and unripe fruit extracts of *Cissus multistriata* (Vitaceae) plant. **Journal of Bacteriology Research**, v. 3, n. 5, p. 83-87, 2011.
- ERICKSON, S. B.; VRTISKA, T. J.; LIESKE, J. C. Effect of Cystone® on urinary composition and stone formation over a one year Pperiod. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 863-867, 2011.
- EVAN, A. P. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. **Pediatric Nephrology**, v. 25, p. 831-841, 2010.
- FANG, Y. S. et al. New phenylpropanoids from *Bulbophyllum retusiusculum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, n. 11, p. 1074-1081, 2018.
- FERREIRA, M. P. et al. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhdryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 170-174, 2008.
- FERNANDES, G.; BANU, J. Medicinal properties of plants from the genus *Cissus*: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 16, p. 3080-3086, 2012.
- FROCHOT, V.; DAUDON, M. Clinical value of crystalluria and quantitative morphoconstitutional analysis of urinary calculi. **International Journal of Surgery**, v. 36, p. 624-632, 2016.
- FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.
- GARCÍA, M. D. et al. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 395-400, 2000.
- GHELANI, H; CHAPALA, M; JADAV, P. Diuretic and antiurolithiatic activities of an ethanolic extract of *Acorus calamus* L. rhizome in experimental animal models. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 4, p. 431-436, 2016.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the brazilian arnica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193-1204, 2008.
- GOMES, P. N. et al. Profilaxia da litiase renal. **Acta Urológica**, v. 22, n. 3, p. 47-56, 2005.
- GORROCHATEGUI, E. et al. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: overview and workflow. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425-442, 2016

- GROH, I. A. M. et al. Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkenylbenzene methyleugenol suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p. 1-10, 2013.
- GUPTA, A. K.; KOTHIYAL, P.; PANDEY, S. Evaluation of antiurolithiatic potential of *Kigelia africana* fruits in albino rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 197-205, 2011.
- GUO, H.; LIU, Y.; CUI, Y. Chinese medicinal buccal tablet containing Lindera and Cymbopogon and others for treating recurrent ulcer of mouth. China patent CN 102772695, 2012.
- HAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 2. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.
- HENKE, M. L.; KELLEHER, N. L. Modern mass spectrometry for synthetic biology and structure-based discovery of natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 8, p. 942-950, 2016.
- JAINU, M. DEVI, C. S. S. *In vitro* and *in vivo*. Evaluation of free-radical scavenging potential of *Cissus quadrangularis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 9, p. 773-779, 2005.
- HOSSEINZADEH, H. et al. Antiurolithiatic activity of *Pinus eldarica* medw. Fruits aqueous extract in rats. **Urology Journal**, v. 7, n. 4, p. 232-237, 2010.
- JANUARIO, J. P. et al. Design and synthesis of new benzophenone derivatives with *in vivo* anti-inflammatory activity through dual inhibition of edema and neutrophil recruitment. **Molecules**, v. 23, n. 1859, p. 1-23, 2018.
- JIA, RUIZHI. Traditional chinese medicine lotion for treating vaginitis and care method. China patent CN 105726797, 2006 Mar 5.
- JIANG, H. et al. Chinese medicine formulation with anti-rheumatic effect and production method thereof. Guangxi University of Chinese Medicine. China patent CN 104840806, 2015.
- JIMÉNEZ, M. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of wild grape (*Vitis tiliifolia*). **Italian Journal of Food Science**, v. 30, p. 128-143, 2018.
- KALE, A. et al. A modified TLC bioautographic technique for the detection of antilithiatic potential of therapeutic plants from Indigenous Ayurvedic System. **Pharma methods**, v. 8, n. 1, p. 209-212, 2017.
- KALEESWARAN, B.; e al. Evaluation of anti-urolithiatic potential of ethyl acetate extract of *Pedaliium murex* L. on struvite crystal (kidney stone). **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 1-14, 2018.
- KARAMAKAR, D.; PATKI, P. S. Evaluation of efficacy and safety of a herbal formulation Cystone in the management of urolithiasis: Meta-analysis of 50 clinical studies. **The Internet Journal of Alternative Medicine**, v. 8, n. 1, 2010.
- KHAN, S. R. et al. Kidney stones. **Nature**, v. 2, p. 37-54, 2016.
- KIND, T.; FIEHN, O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by

accurate mass spectrometry. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 105, p. 1-20, 2007.

KINUPP, V.F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não-convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. Nova Odessa: Plantarum, 2014.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1871-1882, 2015.

KOEHN, F. E., CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Review Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KLITGAARD, A. et al. Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: Screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 7, p. 1933-1943, 2014.

LAIKANGBAM, R. et al. Phytomedicine for controlling urolithiatic agents. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 10, p. 6-13, 2010.

LEAL, M. L.; ALVES, R. P.; HANAZAKI, N. Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2018.

LEE, K. H. et al. Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Cissus assamica* var. *pilosissima* and *Syzygium oblatum*. **Natural Product Sciences**, v. 19, n. 4, p. 275-280, 2013.

LEKSHMI, R K; RAJESH, R; MINI, S. Ethyl acetate fraction of *Cissus quadrangularis* stem ameliorates hyperglycaemia-mediated oxidative stress and suppresses inflammatory response in nicotinamide/streptozotocin induced type 2 diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 14, n. 9, p. 1-9, 2015.

LINO, C. S. et al. Antioxidant activity of a *Cissus verticillata* fraction and tyramine, its bioactive constituent, on alloxan-induced diabetic rats. **The Open Pharmacology Journal**, v. 2, p. 63-69, 2008.

LIU, J. Chinese medicinal preparation for treatment of vitiligo and its preparation method. China patent CN 103977224, 2014.

LIU, L.; SUN, Y.; YUAN, Y. Traditional chinese medicine ointment for treating allergic dermatitis, and preparation method thereof. China patent CN 105687956, 2006 Jun 22.

LOMBARDI, J. A. Systematics of Vitaceae in South America. **Botany**, v. 85, n. 8, p. 712-721, 2007.

_____. Types of names in *Ampelocissus* and *Cissus* (Vitaceae) referring to taxa in the Caribbean, Central and N. America. **Taxon**, v. 46, p. 423-432, 1997.

_____. Typification of names of South American *Cissus* (Vitaceae). **Taxon**, v. 44, n. 2, p. 193-206, 1995.

_____. **Vitaceae: gêneros Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus**. Flora neotropica monograph 80. New York Botanical Garden, Bronx, New York, USA, 2000.

_____. Vitaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB248>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

LU, Y. et al. Rapid screening of bioactive components from *Zingiber cassumunar* using elution extrusion counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, p. 33-44, 2008.

MACRAE, C. F. et al. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, n. 3, p. 453-457. 2006.

MAIER, M. E. Design and synthesis of analogues of natural products. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 13, p. 5302-5343, 2015.

MARGALIT, A., DUFFIN, K.L., ISAKSON, P.C. Rapid quantitation of a large scope of eicosanoids in two models of inflammation: development of an electrospray and tandem mass spectrometry method and application to biological studies. **Anal. Biochem**, v. 235, n.1, p. 73-81, 1996.

MARTEL-PELLETIER, J. et al. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. 501-509, 2003.

MATE, S. G et al. Evaluation of anti-nociceptive activity of *Cissus quadrangularis* on albino mice. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 2, n. 2, p. 118-121, 2008.

MEDZHITOV, R. Overview essay inflammation: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 83-91, 2014.

MENG, H.; LIU, Y.; LAI, L. Diverse ways of perturbing the human arachidonic acid metabolic network to control inflammation. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 8, p. 2242-2250, 2015.

MIKAWLRAWNG, K; HUMAR, S. Current scenario of urolithiasis and the use of medicinal plants as antiurolithiatic agents in Manipur (North East India): A Review. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2014.

MILLER, A. B. et al. The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 4, p. 548-554, 2015.

MISGAR, M. S. Controlled trial in 100 cases with nephro-uretero-lithiasis by Cystone - an indigenous drug and other advocated methods. **Current Medical Practice**, 1982.

MISRA, B.B. et al. Optimized GC-MS metabolomics for the analysis of kidney tissue metabolites. **Metabolomics**, v. 14, n. 6, p. 0, 2018.

MOODY, J. O. et al. Anti-sickling potential of a nigerian herbal formula (Ajawaron HF) and the major plant component (*Cissus populnea* L. CPK). **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1173-1176, 2003.

MULAY, S. R.; ANDERS, H. J. Crystal nephropathies: mechanisms of crystal-induced kidney injury. **Nature**, v. 13, p. 226-240, 2014.

NAVARRO, F. F. ***Cissus gongylodes*: Caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da seguridade da utilização de extratos aquosos das folhas e caules.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FCFAR, Araraquara, 2009.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

OJEKALE, A. B. et al. *Cissus populnea* (Guill & Perr): A Study of the aqueous extract as potential spermatogenic enhancers in male wistar rats. **American Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, n. 5, p. 124-127, 2015.

OMALE, J.; OKAFOR, P. N. Comparative antioxidant capacity, membrane stabilization, polyphenol composition and cytotoxicity of the leaf and stem of *Cissus multistriata*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 17, p. 3129-3133, 2008.

OMALE, J. Polyphenol compositions and antioxidant capacity: A comparison of ripe and unripe fruit extract of *Cissus multistriata* (Vitaceae) plant. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 2, n. 5, p. 133-137, 2010.

OMALE, J. et al. Anti-ulcerogenic and Anti-inflammatory Activity of *Cissus multistriata* Extract in Experimental Animals. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 74-79, 2013.

ONYECHI, U. A.; IBEANU, N. V. Effects of diets containing *Cissus rotundifolia* flour on lipid profile of rats and postprandial glucose levels of normoglycemic human adults. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 14, p. 557-564, 2016.

PALLIO, G. et al. Use of a balanced dual cyclooxygenase-1/2 and 5-lipoxygenase inhibitor in experimental colitis. **European Journal of Pharmacology**, v. 789, p. 152-162, 2016.

PANTHONG, A. et al. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 264-270, 2007.

PARIMALA, S. et al. Analgesic and CNS depressant activity of methanolic extracts of *Cissus vitegenia* and *Cissus pallida*. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, n. 2, p. 330-332, 2013.

PATHOMWICHAIWAT, T. et al. Alkaline phosphatase activity-guided isolation of active compounds and new dammarane-type triterpenes from *Cissus quadrangularis* hexane extract. **Journal of Ethnopharmacology journal**, v. 160, p. 52-60, 2015.

- PATIL, A. S. et al. A TLC-direct bioautography method for detection of antiurolithiatic metabolites. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 5, p. 571-577, 2017.
- PHINNEY, K. W. et al. Development of a standard reference material for metabolomics research. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 11732–11738, 2013.
- PINGALE, S. S.; POKHARKAR, R. D. Acute toxicity study for *Cissus Quadrangularis* whole plant powder. **Pharmacology**, v. 2, p. 256-262, 2008.
- PINTO, A. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- PIRKER, H. et al. Transformation of traditional knowledge of medicinal plants: the case of Tyroleans (Austria) who migrated to Australia, Brazil and Peru. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n. 44, p. 1-26, 2012.
- POLO, M. M. A.; MARTIN, M. A.; GOMES, J. G. Calcium renal lithiasis: metabolic diagnosis and medical treatment. **São Paulo Medical**, v. 131, n. 1, p. 46-53, 2013.
- PRANCE, G. T. What is ethnobotany today? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32. p. 209-216, 1991.
- QIU, D. A practice soup for preventing sports injury and its use method. China patent CN 106038846, 2016.
- RAHMAN, M. A. et al. Evaluation of the Anti hyperlipidemic and Anti atherosclerotic Activities of Ethanolic Extract of *Cissus Pallida* in Atherogenic Diet Fed Rat. **International Journal for Pharmaceutical Research Scholars**, v. 2, n. 3, p. 132-138, 2013.
- RAJAMAHESWARI, K. et al. A Review on Anti-cancerous potential of *Cissus quadrangularis*. **International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 8, p. 1-3, 2017.
- RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koognan, 1996.
- RIVIÈRE, C.; PAWLUS, A. D.; MÉRILLON, J. M. Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 11, p. 1317-1333, 2012.
- RODRIGUES, J. G.; LOMBARDI, A. J.; LOVATO, B. M. Phylogeny of *Cissus* (Vitaceae) focusing on South American species. **Taxon**, v. 63, n. 2, p. 287-298, 2014.
- SAHA, S.; VERMA, R. J. Inhibition of calcium oxalate crystallisation *in vitro* by an extract of *Bergenia ciliata*. **Journal of Urology**, v. 11, n. 2, p. 187-192, 2013.
- SALGADO, M. J.; MANSI, N. D.; GAGLIARDI, A. *Cissus sicyoides*: Analysis of glycemic control in diabetic rats through biomarkers. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 4, p. 722-727, 2009.

- SANTO, A. et al. Gas exchange of two CAM species of the genus *Cissus* (vitaceae) differing in morphological features. **Photosynthesis Research**, v. 13, n. 2, p. 113-124, 1987.
- SANTOS, M. F. C. et al. New bicyclic [3.2.1] octane neolignans derivatives from *Aniba firmula* with potent *in vivo* anti-inflammatory activity on account of dual inhibition of PGE₂ production and cell recruitment. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 31-37, 2019.
- SCARDELATO, A. J.; LEGRAMANDI, V. H. P.; DO SACRAMENTO, L. V. S. Ocorrência de cristais em plantas medicinais utilizadas no tratamento da nefrolitíase: Paradoxo?. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 161-168, 2013.
- SELVAN, A. T. et al. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Cissus pallida*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 1, n. 9, p. 592-595, 2014.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DYKE, T. E. Van. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, **Nature**, v. 8, 2008.
- SHARMA, I.; KHAN, W.; AHMAD, S. *In vitro* and *ex vivo* approach for anti-urolithiatic potential of bioactive fractions of *gokhru* with simultaneous HPLC analysis of six major metabolites and their exploration in rat plasma. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n.1, p. 701-711, 2016.
- SHENG-JI, P. Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 74-79, 2001.
- SHIRWAIKAR, A.; KHAN, S.; MALINI, S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn . on ovariectomized rat. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, p. 245-250, 2003.
- SHOIBE, M. et al. *In vitro* and *in vivo* biological activities of *Cissus adnata* (Roxb.). **Biomedicines**, v. 5, n. 63, p. 1-18, 2017.
- SHI, Q. Topical ointment for treatment of acne and preparation method. China patent CN 104800429, 2015.
- SILVA, L. et al. Bicyclgermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 361-367, 2007.
- SIMONI, C. I. et al. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian cerrado plants against animal viruses. **Virus Reviews & Research**, v. 12, 2007.
- SINGH, O. I.; DEVI, A. B. Comparative study of the antiurolithiatic activity of plant hydroalcoholic extract of *Argemone mexicana*, *Cissus javana* DC and *Garcinia pendunculata*. **International Journal of Science and Research**, v. 5, n. 5, p. 2066-2070, 2016.
- SOEJIMA, A.; WEN, J. Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on three chloroplast markers. **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 278-287, 2006

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SRISSOK, K. et al. Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF-kB activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1008-1014, 2011.

SU, S. Ningbo Haokouwei Food Co., Ltd. Chinese medicinal liquor for treating osteoproliferation and preparation method. China patent CN 104800663, 2015.

SUBBA, B.; BASNET, P. Antimicrobial activity of some medicinal plants from east and central part of Nepal. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 88-92, 2014.

SUMNER, L. W. et al. Proposed Minimum Reporting Standards for Chemical Analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211-221, 2007.

SUMNER, L. W. et al. Modern Plant Metabolomics: Advanced Natural Product Gene Discoveries, Improved Technologies, and Future Prospects. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 212-229, 2015.

TARTAGLIONE, L. et al. NMR-based phytochemical analysis of *Vitis vinifera* cv *Falanghina* leaves. Characterization of a previously undescribed biflavonoid with antiproliferative activity. **Fitoterapia**, v. 125, p. 13-17, 2018.

TISELIUS, H-G; FORNANDER, A.M.; NILSSON, M.A. Effects of citrate and urinary macromolecules on crystal aggregation. **Urolithiasis** 2, p. 213-214, 1994.

TISELIUS, H-G. A hypothesis of calcium stone formation: an interpretation of stone research during the past decades. **Urological Research**, v. 39, n. 4, p. 231-243, 2011.

THEODORIDIS, G. A. et al. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Global Metabolite Profiling: A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 7-16, 2012.

TOSTES, V.; CARDOSO, L. R. Revisão: Recentes avanços em litíase urinária. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 23, n. 3, p. 166-173, 2001.

TUBARO, A. et al. In the croton oil ear test the effects of non steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. **Agents and Actions**, v. 19, p. 371-373, 1986.

VELU, V. et al. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* anti-urolithiatic activity of silver nanoparticles containing aqueous leaf extract of *Tragia involucrata*. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 7, n. 3, p. 439-449, 2017.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holist match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 53-56, 2005.

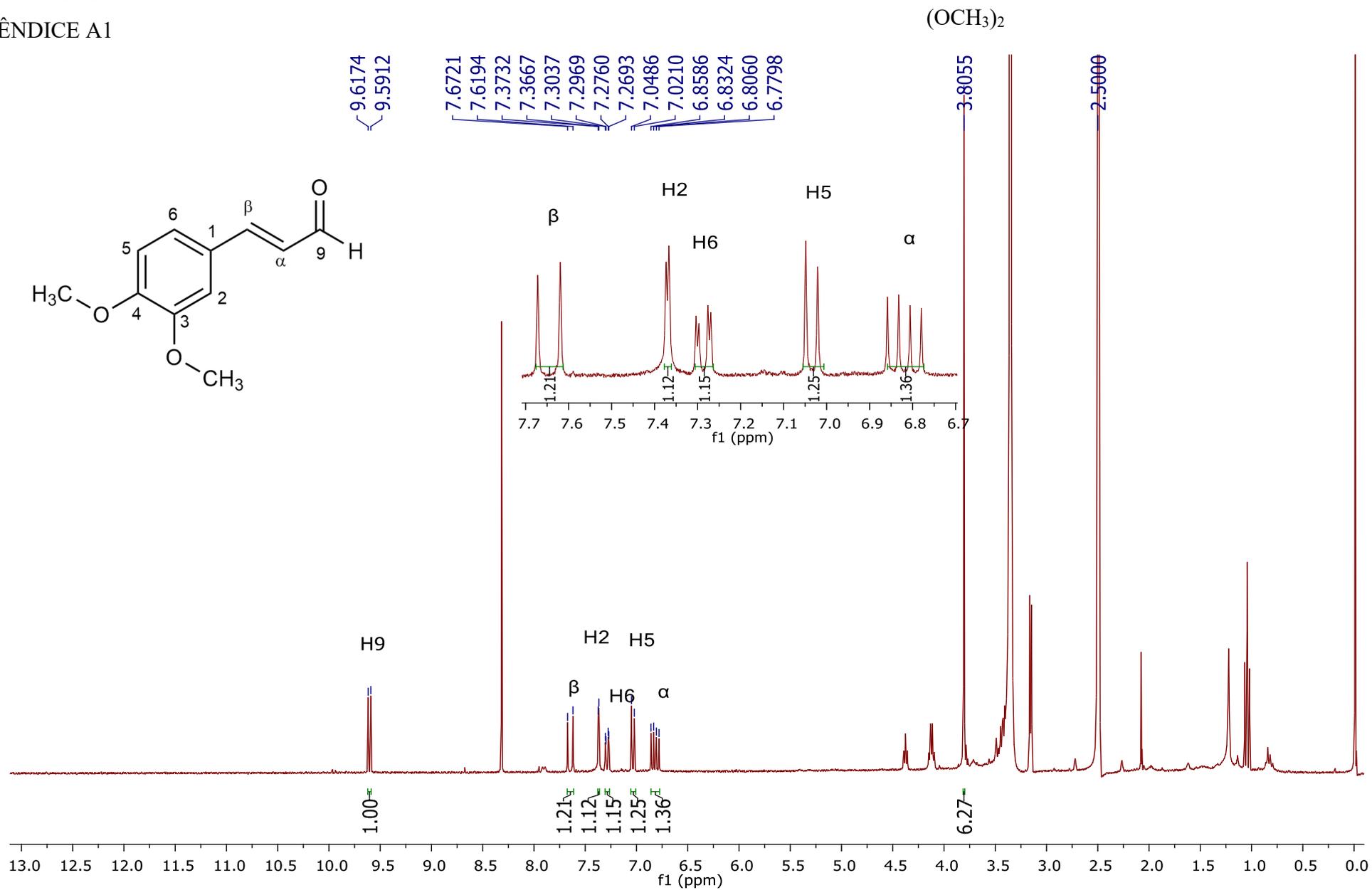
- VIANA, S. B. G. et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v. 4, n. 9, p. 1-7, 2004.
- VIJAYALAKSHMI, A. et al. *In Vitro* Antioxidant and Anticancer Activity of Flavonoid Fraction from the Aerial Parts of *Cissus quadrangularis* Linn . against Human Breast Carcinoma Cell Lines. **Journal of Chemistry**, p. 1-9, 2013.
- WAM, C. Traditional chinese medicine for treating cervical spondylosis and preparation method thereof. China patent Patent CN 105148208, 2015.
- WANG. S. et al. Traditional Chinese medicine plaster for treating mastitis and preparation method thereof. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants. China patent CN 105125793, 2015.
- WANG, N. et al. *Endothelium corneum gigeriae galli* extract inhibits calcium oxalate formation and exerts anti-urolithic effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, n. September 2018, p. 80-89, 2019.
- WOLFENDER, J. L. et al. innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products-new strategies for drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 6, p. 855-868, 2019.
- WU, C. et al. Jiangxi Herbi-Sky Co., Ltd. Application of *Corydalis decumbens* tablet for preventing and treating coronary heart disease. China patent CN 102716273. 2012.
- XIA, N. et al. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1633-1646, 2017.
- XING, M.; WANG, G.; CHEM, C. A traditional chinese medicine for treating damp-heat bile stagnation acute cholecystitis and its preparation method. China patent CN 104984203, 2015.
- XU, F. et al. Structures of new flavonoids and benzofuran-type stilbene and degranulation inhibitors of rat basophilic leukemia cells from the brazilian herbal medicine *Cissus sicyoides*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1089-1095, 2009.
- YAKUBU, M. T. et al. Effects of aqueous extract of *Cissus populnea* stem on function indices of the ovary and uterus of female wistar rats. **Centrepont Journal**, v. 20, n. 2, p. 131-141, 2014.
- YI, L. et al. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics : A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 17-34, 2016.
- YOO, M. H. et al. Efficacy of indoor plants for the removal of single and mixed volatile organic pollutants and physiological effects of the volatiles on the plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, n. 4, p. 452-458, 2006.
- YULIANA, N. D. al. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013.
- ZENI, A. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na atenção primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, 2017.

ZHANG, Y. Traditional Chinese medicine for treating mastitis and using method thereof. China patent CN 106177532, 2016.

ZHOU, X. et al. Guangxi botanical garden of medicinal Plants. Yao medicinal plaster for treating sciatica and its preparation method. China patent CN 106421182, 2017.

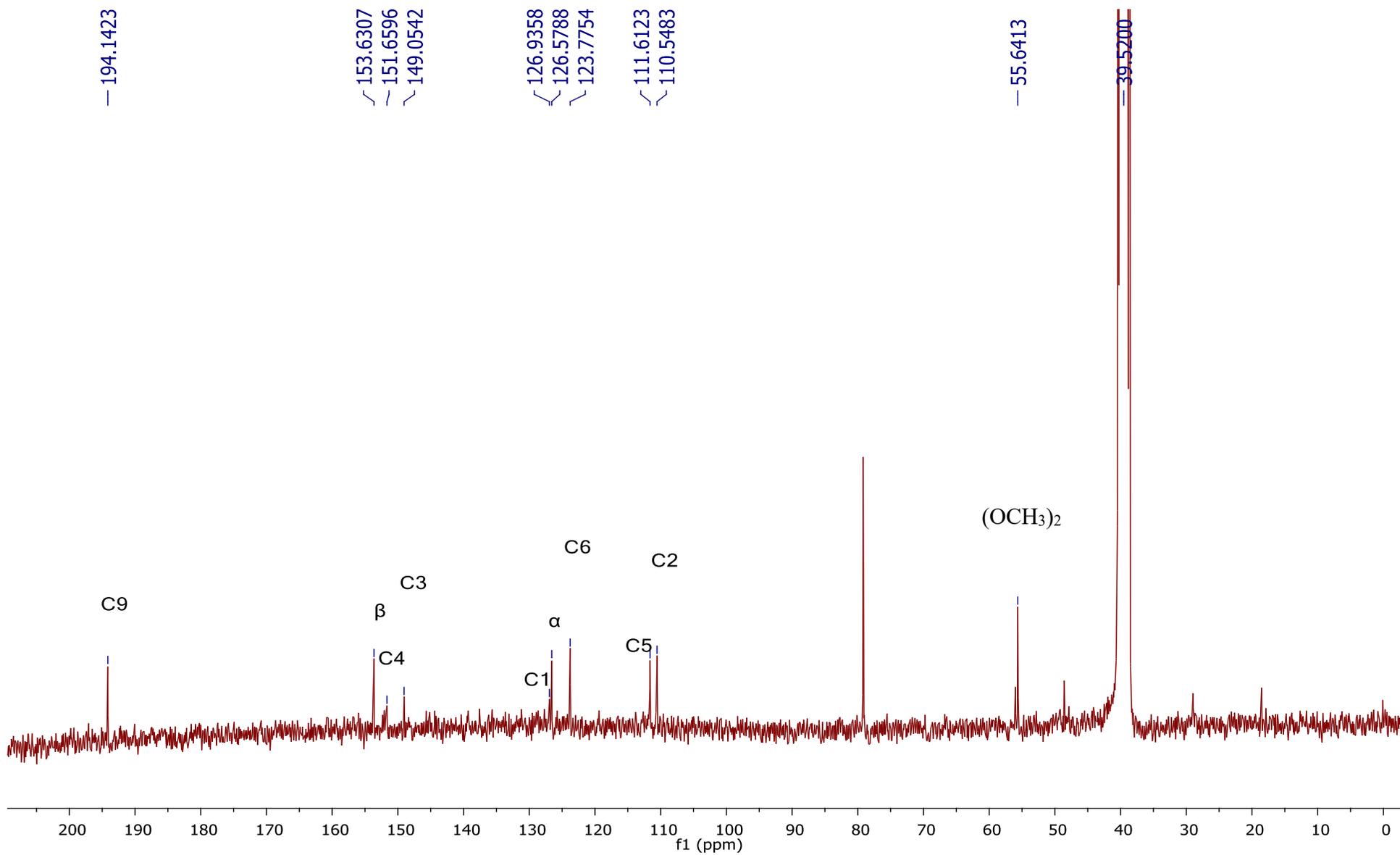
APÊNDICES

APÊNDICE A1

Figura 27 – Espectro de RMN de ¹H do (E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-prop-2-enal, 300 MHz, DMSO-d₆.

Fonte: Do autor.

APÊNDICE A2

Figura 28 – Espectro de RMN de ¹³C do (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)-prop-2-enal, 75 MHz, DMSO-d₆.

Fonte: Do autor.