



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

*Faculdade de Ciências Farmacêutica
Campus de Araraquara*

Cibele Bonacorsi

**Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de
espécies vegetais do Cerrado brasileiro**

Orientadora: *Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi*

Co-orientador: *Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca*

Araraquara

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêutica
Campus de Araraquara

Cibele Bonacorsi

**Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de
espécies vegetais do Cerrado brasileiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração Microbiologia.

Orientadora: ***Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi***

Co-orientador: ***Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca***

Araraquara

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B697a Bonacorsi, Cibele
Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de espécies vegetais do Cerrado brasileiro / Cibele Bonacorsi. – Araraquara, 2009.
216 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Maria Stella Gonçalves Raddi

Co-orientador: Luiz Marcos da Fonseca

1. *Helicobacter pylori*. 2. Plantas medicinais - Citotoxicidade. 3. Plantas medicinais – Atividade antimicrobiana. 4. Plantas medicinais – Atividade antioxidante. I. Raddi, Maria Stella Gonçalves, orient. II. Fonseca, Luiz Marcos da, co-orient. III. Título.

616.075

CAPES: 40500004

CIBELE BONACORSI

**ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori* E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
ESPÉCIES VEGETAIS DO CERRADO BRASILEIRO**

A Comissão examinadora dos trabalhos de Defesa de Tese de
Doutorado, em sessão pública realizada em 26/06/2009, considerou a candidata:

(X) Aprovada

() Reprovada

Prof. Dr. LUIZ MARCOS DA FONSECA
(Co-orientador e Presidente)

Prof. Dr. CELSO VATARU NAKAMURA
(Membro Titular)

Profa. Dra. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA
(Membro Titular)

Prof. Dr. WAGNER VILEGAS
(Membro Titular)

Profa. Dra. IRACILDA ZEPPONE CARLOS
(Membro Titular)

"Pode ser que um dia deixemos de nos falar...

Mas, enquanto houver amizade,

Faremos as pazes de novo.

Pode ser que um dia o tempo passe...

Mas, se a amizade permanecer,

Um de outro se há de lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos...

Mas, se formos amigos de verdade,

A amizade nos reaproximará.

Pode ser que um dia não mais existamos...

Mas, se ainda sobrar amizade,

Nascemos de novo, um para o outro.

Pode ser que um dia tudo acabe...

Mas, com a amizade construiremos tudo novamente,

Cada vez de forma diferente.

Sendo único e inesquecível cada momento

Que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre.

Há duas formas para viver a sua vida:

Uma é acreditar que não existe milagre.

A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre."

(Albert Einstein)

Dedico aos meus pais, *Maria Helena e Ademir* (presente no meu coração),
que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis.

Ensinaram-me que a sabedoria e a honestidade são
os bens mais preciosos que um homem pode ter.

Obrigado pelo amor, confiança e por tudo que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, *José Henrique e Ana Carolina*,
e a minha sobrinha *Isabela*.

Ao *Marco Aurélio*, pelos sete anos que estivemos juntos,
por sempre acreditar no meu potencial.

Obrigado por fazerem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À *Profa. Dra. Maria Stella G. Raddi* que aceitou o desafio de me orientar neste trabalho. Obrigada pelo conhecimento científico adquirido durante esses dez anos de convivência no laboratório e que muito contribuiu para o meu crescimento profissional. Agradeço pela oportunidade de permanecer por tantos anos na Microbiologia Clínica.

Ao *Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca* por me co-orientar nesse trabalho e pela presidência da banca examinadora no dia da minha defesa. Agradeço o enorme incentivo, prestatividade, disponibilidade e inúmeras sugestões nos ensaios quimiluminescentes.

À *Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos* por inicialmente disponibilizar seu laboratório para manutenção do *Helicobacter pylori* e por aceitar compor a banca examinadora desta Tese.

Ao *Prof. Dr. Wagner Vilegas* pela colaboração na realização deste trabalho e por também aceitar compor a banca examinadora desta Tese.

Ao *Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura* e a *Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima* por participarem da banca examinadora deste trabalho e pelas excelentes sugestões oferecidas.

Ao *Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti* e a *Profa. Dra. Maria Teresa Pepato* pela utilização do biotério do laboratório de Bioquímica.

Ao *Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto* que inicialmente abriu-nos as portas do laboratório de Microbiologia e pelos conhecimentos adquiridos durante a graduação e estágio de treinamento.

À minha querida amiga *Beth*, obrigada pelos momentos de descontração, pelas horas que passamos trabalhando no laboratório ou estudando na salinha 38, pela amizade, pelos conselhos e por ter estado perto em momentos que eu muito precisava. Agradeço por Deus ter colocado na minha vida uma amiga como você.

Aos meus amigos *Maria do Carmo* e *Antonio Francisco* (Neto), obrigada principalmente pela amizade, pelos momentos de descontração e pelo apoio nos momentos bons e ruins. D’Carmo agradeço pela ajuda que sempre me ofereceu durante todos esses anos no laboratório de Microbiologia. Sua companhia foi fundamental para que eu conseguisse ter forças e terminar esse trabalho. Obrigado pelas suas orações, por organizar com tanto carinho o café da minha defesa e pela sua presença no dia da minha defesa.

Ao amigo *Rodrigo* pela grande colaboração no trabalho com os animais, pelo incentivo e momentos de diversão. À *Rita* obrigada pela amizade e carinho.

Aos amigos que fiz no laboratório, *Karina Devienne*, *Verônica*, *Karina Ponsoni*, *Mariana*, *Tetê*, cada um hoje seguindo o seu caminho, obrigado pela amizade.

À amiga *Fabiana*, sempre com um conselho e uma palavra de carinho.

À *Nancy*, obrigada pela ajuda nos experimentos com células.

Ao *Marcos* (Bioquímica) e a *Marisa* (Imunologia) obrigada pela ajuda na parte técnica.

Às secretarias do departamento, *Eliana* e *Tirene*, às funcionárias do prédio tradicional da Faculdade de Farmácia, *Márcia*, *D. Luzia*, *Rita* e *Rose*, e ao *Max* (Hematologia), obrigada pela companhia e pela paciência com os alunos (como eu) que estão sempre precisando de alguma coisa.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, *Sonia*, *Laura* e *Cláudia*, obrigada pela dedicação, carinho, atenção e paciência.

Agradeço aos meus amigos da UNICEP, *Andréia*, *Cristiane*, *Cíntia*, *Daniela*, *Vanessa*, pelo incentivo e amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade: Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1.	INTRODUÇÃO.....	24
1.1.	Plantas medicinais.....	25
1.2.	Flora do Cerrado brasileiro.....	27
1.3.	<i>Helicobacter pylori</i> e as úlceras pépticas.....	33
2.	OBJETIVOS.....	39
2.1.	Objetivo geral.....	40
2.2.	Objetivos específicos.....	40
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1.	Espécies vegetais.....	42
3.1.1.	Etapa botânica.....	42
3.1.2.	Etapa química.....	43
3.1.2.1.	Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados das espécies vegetais.....	43
3.2.	Atividade citotóxica.....	44
3.2.1.	Linhagem celular.....	44
3.2.2.	Determinação da citotoxicidade.....	44
3.3.	Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i>	45
3.3.1.	Antimicrobianos padrões.....	45

3.3.2.	Microrganismo.....	45
3.3.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	46
3.3.3.1.	Interferência do DMSO no crescimento de <i>H. pylori</i>	46
3.3.3.2.	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos para <i>H. pylori</i>	46
3.4.	Atividade antioxidante.....	47
3.4.1.	Avaliação da capacidade sequestradora (ou redutora) de radical DPPH.....	47
3.4.2	Avaliação do <i>burst</i> oxidativo (respiratório) de LPMNs.....	48
3.4.2.1.	Indução de exsudato celular para obtenção de LPMNs.....	48
3.4.2.2.	Contagem total e diferencial de células em exsudato peritoneal.....	49
3.4.2.3.	Viabilidade de LPMNs no período de tempo do ensaio quimiluminescente.....	49
3.4.2.4.	Viabilidade dos LPMNs na presença dos extratos, frações e compostos fenólicos.....	49
3.4.2.5.	Ensaio quimiluminescentes.....	50
3.4.2.5.1.	Padronização da suspensão bacteriana.....	50
3.4.2.5.2.	<i>Burst</i> oxidativo de LPMNs neutrófilos estimulados com <i>H. pylori</i> na presença dos extratos, frações e compostos fenólicos.....	51
3.4.2.6.	Cálculo da variação da quimiluminescência.....	51
3.5.	Análise estatística.....	52
4.	RESULTADOS	53
4.1.	Citotoxicidade dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos.....	54
4.2.	Atividade anti- <i>H. pylori</i>	57
4.2.1.	Interferência do DMSO no crescimento de <i>H. pylori</i>	57

4.2.2.	Determinação da CMI dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos para <i>H. pylori</i>	58
4.3.	Atividade antioxidante.....	63
4.3.1.	Capacidade sequestradora de radical DPPH.....	63
4.3.2.	Avaliação do <i>burst</i> oxidativo de LPMNs.....	68
4.3.2.1.	LPMNs em exsudato peritoneal de rato.....	68
4.3.2.2.	Viabilidade dos LPMNs durante o tempo do ensaio e na presença dos extratos, frações e compostos fenólicos.....	68
4.3.2.3.	Suspensão bacteriana para ensaio quimiluminescente.....	68
4.3.2.4.	<i>Burst</i> oxidativo de LPMNs estimulados com <i>H. pylori</i> na presença dos extratos polares, frações e compostos fenólicos.....	70
5.	DISCUSSÃO	83
6.	CONCLUSÕES	110
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
	APÊNDICES	148
	APÊNDICE A - Procedência e preparo de meios e reagentes.....	149
	APÊNDICE B - Padronização de técnica de microdiluição em caldo para determinação da CMI para <i>H. pylori</i>	153
	APÊNDICE C - Análise de regressão linear para determinação do IC ₅₀	158
	APÊNDICE D - Efeito de diferentes concentrações de extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos sobre o crescimento de <i>H. pylori</i>	161
	APÊNDICE E - Análise de regressão linear para determinação da CE ₅₀ ...	167

APÊNDICE F - Redução do radical DPPH por extratos apolares, polares, mistura de triterpenos e compostos fenólicos.....	169
APÊNDICE G - Cinética dos ensaios quimiluminescentes dependente de luminol em LPMNs estimulados com <i>H. pylori</i>	180
ANEXO - Parecer Comitê de Ética para os experimentos com animais.....	206

RESUMO

Helicobacter pylori é, atualmente, reconhecido como o principal fator de risco para desenvolvimento da gastrite crônica e úlcera péptica. A resposta inflamatória decorrente da infecção por essa bactéria induz alterações patológicas no microambiente gástrico, com a liberação de citocinas e de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células inflamatórias, especialmente neutrófilos, que contribuem para a injúria da mucosa e desenvolvimento de câncer gástrico. Neste trabalho, a citotoxicidade basal, atividade anti-*H. pylori* e antioxidante de extratos (apolares e polares), frações, mistura de triterpenos (α -amirina e β -amirina) e compostos fenólicos (amentoflavona, (+)-catequina, galato de metila, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo e quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo) obtidos de plantas do Cerrado brasileiro, empregadas popularmente no tratamento de distúrbios gastrintestinais, foram determinadas pela técnica do vermelho neutro, microdiluição em caldo, redução do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) e quimiluminescência dependente de luminol, respectivamente. As preparações vegetais (extratos, frações e mistura de triterpenos) apresentaram baixo potencial citotóxico para a linhagem celular empregada (McCoy). Dentre os compostos fenólicos, quercetina (padrão comercial) e (+)-catequina apresentaram maior citotoxicidade quando comparadas aos extratos, frações e mistura de triterpenos. As espécies *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae) e *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) demonstraram maior potencial para o tratamento de doenças induzidas pelo *H. pylori* por proporcionarem maior atividade antibacteriana (concentração mínima inibitória = 1024 $\mu\text{g/mL}$), entretanto frações enriquecidas e substâncias isoladas não foram conclusivas para o reconhecimento de grupos ou compostos que pudessem inferir a mesma capacidade de inibição do crescimento bacteriano que a obtida para os extratos. A atividade antioxidante *in vitro*, pelo teste do DPPH, não representou, necessariamente, o efeito desempenhado pelas preparações no

sistema *ex vivo* (ensaio quimiluminescente). *Anacardium humile* (Anacardiaceae), *Qualea multiflora* e *Qualea parviflora* (Dilleniaceae), apesar de não apresentarem atividade anti-*H. pylori*, mostraram alta capacidade de sequestrar e/ou inibir a produção de EROs induzidas por essa bactéria. Dentre os compostos fenólicos, galato de metila e quercetina foram os que apresentaram maior atividade antioxidante. Em decorrência do *stress* oxidativo mediado por neutrófilos estar envolvido na patogênese das doenças gástricas, nossos resultados demonstram o potencial antiulcerogênico de algumas plantas medicinais brasileiras, os quais são concordantes com dados etnofarmacológicos.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*; plantas medicinais; citotoxicidade; atividade antimicrobiana; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterium recognized as the major cause of chronic gastritis and peptic ulcer. The *H. pylori* infection induces an inflammatory response and pathological changes in the gastric microenvironment. The host immune cells (especially neutrophils) release inflammatory mediators and large amounts of reactive oxygen species (ROS), which are related to an increased risk of developing gastric cancer. In this study, we evaluated the basal cytotoxicity, anti-*H. pylori* and antioxidant activities of extracts (apolar and polar), fractions, mixture of triterpenes (α -amirin and β -amirin) and phenolic compounds (amentoflavone, (+)-catechin, methyl gallate, quercetin 3-*O*- α -L-arabinopyranoside and quercetin-3-*O*- β -D-galactopyranoside) obtained from Brazilian Cerrado plants used to treat gastrointestinal disorders, by neutral red uptake assay, broth microdilution method, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and luminol-dependent chemiluminescence assays, respectively. A low basal cytotoxicity was showed by the vegetal preparations (extracts, fractions and mixture of triterpenes). Among the phenolic compounds tested, quercetin (commercial standard) and (+)-catechin demonstrated higher cytotoxicity as compared to extracts, fractions and mixture of triterpenes. The *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae) and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae) specie presented greater potential for the treatment of *H. pylori*-induced gastric pathologies, since they have better antibacterial activity (minimum inhibitory concentration = 1024 μ g/mL). However, fractions and isolated compounds were not conclusive to identify substances that could be accountable for the antimicrobial activity of the extracts. The antioxidant activity *in vitro* (DPPH assay) was not necessarily the same as those observed in the *ex vivo* assay (luminol-dependent chemiluminescence). Although the poor anti-*H. pylori* activity of *Anacardium humile* (Anacardiaceae), *Qualea multiflora* and *Qualea parviflora* (Dilleniaceae), these plants exhibited a high potential as ROS scavengers.

Among the phenolic compounds, methyl gallate and quercetin presented better antioxidant activity. Since neutrophil-mediated oxidative *stress* has been implicated in the pathogenesis of gastric diseases, these findings indicate the potential anti-ulcerative properties of some Brazilian medicinal plants in accordance with ethnopharmacological use.

Keywords: *Helicobacter pylori*; medicinal plants; cytotoxicity; antimicrobial activity; antioxidant activity.

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

% Δ	- Porcentagem de inibição
x g	- Força da gravidade
A	- Absorvância
<i>A. glandulosa</i>	- <i>Alchornea glandulosa</i>
<i>A. triplinervia</i>	- <i>Alchornea triplinervia</i>
<i>A. humile</i>	- <i>Anacardium humile</i>
ABIFISA	- Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde
ABIFITO	- Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica
AcOEt	- Acetato de etila
AINES	- Antiinflamatório não esteroidal
AmoxS	- Amoxicilina sensível
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
ATCC	- American Type Culture Collection
<i>B. basiloba</i>	- <i>Byrsonima basiloba</i>
<i>B. crassa</i>	- <i>Byrsonima crassa</i>
<i>B. fagifolia</i>	- <i>Byrsonima fagifolia</i>
<i>B. intermedia</i>	- <i>Byrsonima intermedia</i>
BHI	- <i>Brain Heart Infusion (Infusão cérebro e coração)</i>
CE ₅₀	- <i>Concentração eficiente 50%</i>
CMI	- Concentração mínima inibitória
<i>D. elliptica</i>	- <i>Davilla elliptica</i>

DCM	- Diclorometano
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DPPH	- 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
ESALQ	- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
EtOH	- Etanol
Extrato CHCl ₃	- Extrato clorofórmico
Extrato DCM	- Extrato diclorometano
Extrato MeOH	- Extrato metanólico
FAPESP	- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<i>G. noxia</i>	- <i>Guapira noxia</i>
<i>H. pylori</i>	- <i>Helicobacter pylori</i>
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBPM	- Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais
IC ₅₀	- Índice citotóxico 50%
ICCVAM	- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICE	- Integral da cinética de emissão
IME	- Intensidade máxima de emissão
LPMN	- Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos
MeOH	- Metanol
<i>M. pusa</i>	- <i>Mouriri pusa</i>

MtzR	- Metronidazol resistente
NCCLS	- National Committee for Clinical Laboratory Standards
NIH	- National Institute of Health
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PBSD	- PBS Dulbecco's
p/v	- Peso/volume
<i>Q. grandiflora</i>	- <i>Qualea grandiflora</i>
<i>Q. multiflora</i>	- <i>Qualea multiflora</i>
<i>Q. parviflora</i>	- <i>Qualea parviflora</i>
QL	- Quimiluminescência
$\Delta QL_{\text{Cinética}}$	- Variação de Quimiluminescência (Cinética)
$\Delta QL_{\text{Máxima}}$	- Variação de Quimiluminescência (Intensidade máxima)
<i>S. pseudoquina</i>	- <i>Strychnos pseudoquina</i>
TNF- α	- Fator de necrose tumoral-alfa
UDO	- Unidade de densidade óptica
UFC	- Unidade formadora de colônia
UFT	- Universidade Federal do Tocantins
UI	- Unidade internacional
UNESP	- Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
UNITINS	- Universidade do Tocantins
USP	- Universidade de São Paulo
WHO	- World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Biomass brasileiros.....	28
Figura 2 -	Micrografia eletrônica de varredura da bactéria <i>Helicobacter pylori</i> .	35
Figura 3 -	Colonização por <i>Helicobacter pylori</i> no mundo.....	35
Figura 4 -	Efeito do DMSO sobre o crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	57
Figura 5 -	Quimiluminescência (QL) dos sistemas LPMNs/luminol/zymosan e LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i> (cepa ATCC 43504). Cinéticas representativas de, no mínimo, três experimentos independentes.....	69
Figura 6 -	(A) Estrutura geral dos flavonóis; (B) quercetina (R = H), quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (R = α -L-arabinopiranosídeo) e quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (R = β -D-galactopiranosídeo).....	87
Figura 7 -	Geração de espécies reativas de oxigênio durante o <i>burst</i> oxidativo de fagócitos.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Índice citotóxico 50% (IC ₅₀) de extratos CHCl ₃ , DCM e MeOH para células McCoy.....	55
Tabela 2 -	Índice citotóxico 50% (IC ₅₀) de frações de <i>Byrsonima crassa</i> , <i>Guapira noxia</i> e <i>Strychnos pseudoquina</i> para células McCoy.....	56
Tabela 3 -	Índice citotóxico 50% (IC ₅₀) de compostos fenólicos e mistura de triterpenos isolados de <i>Byrsonima crassa</i> para células McCoy.....	56
Tabela 4 -	Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> por extratos apolares (extratos CHCl ₃ e DCM) de diferentes espécies vegetais.....	59
Tabela 5 -	Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> por extratos polares (extratos MeOH) de diferentes espécies vegetais.....	60
Tabela 6 -	Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> por frações de <i>Byrsonima crassa</i> , <i>Guapira noxia</i> e <i>Strychnos pseudoquina</i>	61
Tabela 7 -	Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> por compostos fenólicos e mistura de triterpenos isolados de <i>Byrsonima crassa</i>	62
Tabela 8 -	Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE ₅₀) dos extratos apolares (extratos CHCl ₃ e DCM) de diferentes espécies vegetais.....	64
Tabela 9 -	Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE ₅₀) de extratos polares (extratos MeOH) de diferentes espécies vegetais.....	65
Tabela 10 -	Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE ₅₀) de frações de <i>Byrsonima crassa</i> , <i>Guapira noxia</i> e <i>Strychnos pseudoquina</i>	66

Tabela 11 -	Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE ₅₀) de compostos fenólicos e mistura de triterpenos isolados de <i>Byrsonima crassa</i>	67
Tabela 12 -	Quimiluminescência (QL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) do sistema LPMNs/luminol/zymosan e LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i>	69
Tabela 13 -	Variação da quimiluminescência (Δ QL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) dos sistemas LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i> (controle) e LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i> com diferentes concentrações de extratos MeOH.....	72
Tabela 14 -	Variação da quimiluminescência (Δ QL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) dos sistemas LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i> (controle) e LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i> com diferentes concentrações de frações.....	76
Tabela 15 -	Variação da quimiluminescência (Δ QL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) dos sistemas LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i> (controle) e LPMNs/luminol/ <i>H. pylori</i> com diferentes concentrações de compostos fenólicos.....	78
Tabela 16 -	Redução do radical DPPH e redução no valor da ICE por extratos MeOH de diferentes espécies vegetais.....	80
Tabela 17 -	Redução do radical DPPH e redução no valor da ICE por diferentes frações.....	81
Tabela 18 -	Redução do radical DPPH e redução no valor da ICE por compostos fenólicos.....	82

Tabela 19 -	Substâncias descritas em extratos apolares de espécies vegetais do Cerrado brasileiro.....	101
Tabela 20 -	Substâncias descritas em extratos polares de espécies vegetais do Cerrado brasileiro.....	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais

A medicina popular pode ser entendida como um conjunto de conhecimentos e práticas médicas que se desenvolvem numa dinâmica própria, com base no conhecimento empírico herdado dos antepassados, onde as plantas desempenhavam importante papel na preparação de medicamentos. Assim, o uso de espécies vegetais, com a finalidade de curar doenças, remonta ao início da civilização, a partir do momento em que o homem despertou sua consciência e começou a utilizar e modificar os recursos naturais para seu próprio benefício (Di STASI, 1995).

A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e como fonte de alimentos, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-Romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa se desenvolveu com tal grandiosidade que, até hoje, muitas espécies vegetais e preparações de uso medicinal são estudadas, na tentativa de se descobrir novas substâncias ativas com atividades farmacológicas (VIEGAS et al., 2006). Enciclopédia da medicina tradicional chinesa, datada de 1977, lista mais de 5.500 fontes naturais, das quais 82,8% são plantas, que constituem a base de mais de 100.000 prescrições (ZHU; WOERDENBAG, 1995; HOESSEL et al., 1999).

No Brasil, desde os primeiros habitantes que aqui chegaram, têm-se relatos da utilização de plantas como fonte de alimentos e medicamentos. Contudo, as primeiras informações sobre os hábitos indígenas quanto ao uso de plantas para tratamento de doenças só começaram a ser propagadas com o início da colonização portuguesa (ALMEIDA et al., 2008). Entre os anos de 1560 a 1580, os jesuítas descreveram em suas cartas, encaminhadas a Portugal, várias plantas comestíveis e medicinais do Brasil. O padre José de Anchieta relatou o emprego, pelos índios brasileiros, da hortelã pimenta (*Mentha piperita*) no tratamento de distúrbios digestivos, de doenças nervosas (ação calmante) e para aliviar nevralgias, bem

como, a ação emética da ipecacuanha ou ipeca (*Psychotria ipecacuanha*) e as propriedades anti-séptica, antiinflamatória e cicatrizante do óleo ou bálsamo copaíba (*Copaifera sp*) (CALAINHO, 2005; VEIGA Jr et al., 2005; ERVAS DO SÍTIO, 2009). Publicações recentes confirmam a atividade antiinflamatória da copaíba (RAMOS et al., 2006a; RAMOS et al., 2006b).

A prática milenar do uso de plantas medicinais ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o seu processo evolutivo e chegou, até os dias atuais, como fonte de recurso terapêutico empregado por grande parte da população de diferentes países (Di STASI, 1995). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 60% da população mundial faz uso de tratamentos ou medicamentos recomendados pela medicina popular, sendo esse índice ainda maior em países emergentes (WHO, 2000a; WHO, 2002a,b).

Dentre os fatores que definem o emprego popular das plantas, nos cuidados com a saúde, destacam-se os altos preços dos medicamentos quimicamente definidos, a crença quanto à atividade terapêutica e ausência de efeitos colaterais das preparações vegetais por grande parte da população (RATES, 2001; YUNES; CALIXTO, 2001; VIEIRA et al., 2007). Segundo a OMS, “o uso tradicional de plantas medicinais tem seus benefícios comprovados, mas precisa ser tratado com as mesmas precauções que as da medicina alopática tradicional” (Da SILVA, 2007; De FRANÇA et al., 2008). A literatura demonstra que metabólitos secundários isolados de plantas podem apresentar alta toxicidade como, por exemplo, os glicosídeos digitálicos isolados de plantas do gênero *Digitalis* (YUNES; CALIXTO, 2001; SIMÕES et al., 2003).

A indústria de produtos fitoterápicos tem apresentado, em geral, um crescimento anual em seus lucros de 25% (FETROW; AVILA, 2000). Em muitos países o interesse da população pelas terapias naturais, incluindo o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, tem aumentado enormemente (WHO, 2000b; IGNATTI et al., 2006).

Publicações relatam que, nos últimos 25 anos, mais de 20% das prescrições dispensadas nos Estados Unidos estavam relacionadas a medicamentos que apresentam princípios ativos de origem natural ou semi-sintética, sendo a grande maioria procedente de plantas superiores (NEWMAN, et al., 2003; VIEGAS et al., 2006); em Cuba, a flora rica do país permite vasta tradição no uso de fitoterápicos (VIZOSO et al., 2000); na África do Sul, o uso medicinal de plantas movimentava vários setores da economia (VERSCHAEVE et al., 2004); na Alemanha, vários fitoterápicos já foram regulamentados, mantendo esse país como um dos maiores mercados mundiais de drogas de origem vegetal (FETROW; AVILA, 2000; ÉPOCA, 2004).

No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), o consumo de plantas medicinais, vendidas em feiras livres, e de medicamentos fitoterápicos comercializados em farmácias e drogarias, movimentava um mercado de 500 milhões de reais por ano (VIEIRA, 2007). De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), antiga Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica (ABIFITO), considerando toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico movimentava um bilhão de reais por ano e empregava mais de 100 mil pessoas no país (ABIFISA, 2008). Embora o Brasil seja um dos maiores consumidores mundiais de medicamentos, possua grande riqueza natural e um amplo patrimônio étnico-cultural, o mercado farmacêutico brasileiro ainda é dominado por multinacionais ou por indústrias de capital não majoritariamente nacional (LOPES, 2004; MARINHO, 2006).

1.2. Flora do Cerrado brasileiro

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo e, devido a sua dimensão continental e a grande variação geomorfológica e climática, abriga sete biomas, 49 ecorregiões e um número incalculável de ecossistemas. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), os biomas brasileiros são:

Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal, Costeiros e Campos Sulinos ou Pampas (Figura 1) (IBAMA, 2008; IBGE, 2008).



Figura 1 - Biomas brasileiros

(Fonte: IBAMA, 2008)

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia, ocupando 21% do território nacional. O termo Cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorre no Brasil Central (KLINK; MACHADO, 2005).

A biodiversidade do Cerrado é elevada, porém ainda pouco explorada cientificamente. O número de plantas vasculares (vegetais superiores) é superior àquele encontrado na maioria

das regiões do mundo; plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies (MENDONÇA et al., 1998). No Cerrado, 44% da flora é endêmica, sendo a mais diversificada savana tropical do mundo (KLINK; MACHADO, 2005). Em virtude da diversidade de espécies vegetais, esse bioma vem sendo atualmente utilizado como fonte de material vegetal para o estudo do potencial farmacológico de plantas, já utilizadas pela população, para o tratamento de diferentes doenças.

Os estudos das plantas medicinais, principalmente a partir dos anos 80, tiveram uma reorientação, inclusive no Brasil, devido ao surgimento de novos métodos analíticos de alta tecnologia, os quais permitem isolar componentes presentes nas plantas mesmo que em baixas quantidades (LIRA, 2007). O desenvolvimento de bioensaios simplificados, novos métodos de *screening*, introdução de testes *in vitro* que mimetizam situações análogas *in vivo*, entre tanto outros, também determinaram o ressurgimento do interesse na investigação de produtos naturais, perdido durante a década de 60, como possível fonte de novos protótipos para indústria farmacêutica (YUNES et al., 2001; SCHENKEL et al., 2003). Em decorrência do progresso tecnológico alcançado por técnicas cromatográficas e de elucidação estrutural, a possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de espécies vegetais é, portanto, imensurável (GURBUZ et al., 2002).

Atualmente, apesar do volume de publicações, sabe-se que a pesquisa envolvendo plantas medicinais é complexa e apresenta um caráter multidisciplinar, principalmente quando o objetivo é avaliar diferentes ações biológicas e farmacológicas, bem como isolar substâncias ativas úteis para a terapêutica (SOUZA-BRITO, 1996; MACIEL et al., 2002; FERREIRA, 2005). Além da multidisciplinaridade, o sucesso das pesquisas com plantas depende da seleção adequada das espécies a serem estudadas. A escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) é importante devido ao acúmulo, muitas vezes milenar, de informações sobre o emprego de determinadas plantas no tratamento de doenças (HOLETZ et

al., 2002). Todavia, a seleção com base em pesquisas já publicadas, que descrevem o perfil fitoquímico e ações terapêuticas de um mesmo gênero ou família, pode aumentar a possibilidade de encontrar espécies com atividade farmacológica e isolar novas substâncias biologicamente ativas.

Como mencionado, um grande número de plantas vasculares é relatado no Brasil Central, as quais estão incluídas em cerca de 150 famílias (MENDONÇA et al., 1998; MIRANDA et al., 2006). Estudo etnofarmacológico realizado no Cerrado demonstrou um grande número de espécies vegetais utilizada no tratamento de diferentes afecções, especialmente transtornos gastrintestinais, como gastrite e úlceras pépticas (gástricas e duodenais) (SILVA et al., 2000). Vários gêneros, empregados na medicina popular brasileira, tais como *Alchornea* (Euphorbiaceae), *Anacardium* (Anacardiaceae), *Byrsonima* (Malpighiaceae), *Davilla* (Dilleniaceae), *Guapira* (Nyctaginaceae), *Mouriri* (Melastomataceae), *Qualea* (Vochysiaceae), *Strychnos* (Loganiaceae), entre outros, vêm sendo analisados quanto ao perfil fitoquímico e diferentes atividades biológicas (anti-úlceras, antioxidante, analgésica, antiinflamatória, antimicrobiana, imunomodulatória, citotóxica, mutagênica e anti-mutagênica) dentro do Programa BIOTA/FAPESP (BIOTA/FAPESP, 2003).

Byrsonima crassa é conhecida popularmente como murici do cerrado ou murici vermelho e suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular no tratamento de infecções cutâneas, diarreias e disfunções gástricas, incluindo úlceras (SILVA et al., 2001; SANNOMIYA et al., 2003; SANNOMIYA et al., 2005a). Estudos fitoquímicos realizados com extratos e infusões dessa espécie demonstraram a presença de alguns compostos biologicamente ativos como quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, amentoflavona, (+)-catequina e (-)-epicatequina (SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a; SANNOMIYA et al., 2005b). O potencial

antiulcerogênico de extrato metanólico (extrato MeOH) obtido de folhas de *B. crassa* foi relacionado à presença de flavonóides (SANNOMIYA et al., 2005a). Recente publicação, utilizando modelo de úlcera induzida por etanol (EtOH), ácido clorídrico/etanol (HCl/EtOH) e antiinflamatórios não esteroidais (AINES) em animais, demonstrou que o extrato MeOH de folhas de *B. fagifolia* (conhecida como murici do mato) acelerou a cicatrização da mucosa ulcerada e estimulando o processo proliferativo e a secreção de muco (LIMA et al., 2008).

Dentre as espécies vegetais consumidas pela população, destaca-se *Anacardium humile*, conhecida popularmente como cajuí, caju do cerrado, cajuzinho do campo. A utilização dessa planta é bastante vasta: o fruto (pseudofruto) é usado na fabricação de sucos, doces e vinhos; na medicina popular é empregada no tratamento de manchas de pele (resina), em processos inflamatórios (casca), como purgativo (raiz) e antidiarréico (folha) (POTT; POTT, 1994; SERRA et al., 2003). O gênero *Anacardium*, além de flavonóides, sintetiza vários outros metabólitos secundários, como ácidos anacárdicos e taninos, compostos descritos em outras espécies vegetais que apresentam atividade antioxidante, anti-úlcera e antibacteriana (FUKAI et al., 2002; SERRA, et al., 2003; FUNATOGAWA, et al., 2004; TREVISAN, et al., 2006; KONAN; BACCHI, 2007). Em modelo animal, o extrato MeOH de folhas de *A. humile* demonstrou inibir lesões gástricas induzidas por EtOH absoluto e piroxicam (LUIZ-FERREIRA et al., 2008).

Alcalóides, flavonóides e outros compostos fenólicos, além de terpenóides, são descritos em diferentes espécies do gênero *Alchornea* (EBI, 2001; URREA-BULLA et al., 2004). *A. glandulosa*, árvore com cerca de 10 a 20 metros de altura, é popularmente conhecida como tapiá ou tamanqueiro (PASCOTTO, 2006). Esteróides, terpenóides, alcalóides e outros compostos fenólicos são encontrados nas folhas dessa espécie (CONEGERO et al., 2003). A fração acetato etila (AcOEt), obtida do extrato MeOH de folhas de *A. glandulosa* inibiu a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e

fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em macrófagos ativados, sugerindo o potencial antiinflamatório dessa espécie vegetal (LOPES et al., 2005). Estudos etnofarmacológicos reportam que algumas espécies do gênero *Alchornea* são popularmente empregadas no tratamento de doenças gástricas, incluindo úlceras (OSABEDE; OKOYE, 2003). O extrato MeOH obtido de folhas de *A. glandulosa* demonstrou reduzir, de maneira dose-dependente, lesões na mucosa gástrica de camundongos induzidas por EtOH absoluto (CALVO et al., 2007).

Davilla elliptica, conhecida popularmente como sambaibinha, lixinha, lixeirinha e cipó-caboclo, é encontrada em cerrados abertos. Informações etnofarmacológicas indicam que a infusão das partes aéreas de *D. elliptica* é usada para o tratamento de gastrites e outros distúrbios gastrintestinais (CALVO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2008). O extrato clorofórmico (extrato CHCl₃) obtido de folhas desta espécie vegetal apresentou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, além de estimular a liberação de H₂O₂, NO e TNF- α , sugerindo uma atividade imunomodulatória (LOPES et al., 2007).

A espécie *Mouriri pusa*, árvore que mede de 2 a 7 metros, é popularmente conhecida como puçá-preto ou jaboticaba-do-cerrado e apresenta frutos comestíveis bastante apreciados pela população nativa das diversas regiões de Cerrado (ANDREO et al., 2006). Poucos estudos descrevem as possíveis atividades biológicas dessa planta. O potencial antiulcerogênica do extrato MeOH de folhas de *M. pusa* foi evidenciado por Andreo et al. (2006), justificado pela presença de vários flavonóides e outros compostos polifenólicos, como taninos, presentes nessa espécie vegetal.

Outra espécie típica do Cerrado brasileiro e que apresenta utilização em problemas estomacais é a *Guapira noxia*, conhecida como maria mole ou pau-mole, todavia poucos são os estudos químico-farmacológicos sobre essa espécie. Severi et al. (2006a) relatam a presença de flavonóides no extrato MeOH de folhas de *G. noxia*.

O gênero *Qualea* é constituído por árvores tropicais e distribuído em, aproximadamente, 200 espécies, das quais três são predominantes no Cerrado brasileiro: *Q. grandiflora*, *Q. parviflora* e *Q. multiflora*. As cascas, entrecascas e folhas de *Q. grandiflora*, popularmente conhecida como pau-terra, são usadas para limpeza de úlceras externas, com antiinflamatório e no tratamento de desordens gastrintestinais (POTT; POTT, 1994; ALMEIDA et al., 1998). Hiruma-Lima et al. (2006) relataram a presença de terpenóides, taninos, catequinas, quercetina e outros polifenóis no extrato alcoólico de cascas dessa espécie, o qual também apresentou atividade antiulcerogênica.

Strychnos pseudoquina é uma árvore encontrada no Cerrado que geralmente alcança de 3 a 5 metros de altura, sendo conhecida popularmente por quina do Cerrado. Suas folhas são utilizadas, pela população, no tratamento de distúrbios gastrintestinais, com destaque para as úlceras gástricas. Alcalóides e flavonóides são descritos no perfil fitoquímico de *S. pseudoquina*. Estudo recente *in vivo* demonstrou que o extrato MeOH e a fração alcaloídica obtidos de suas folhas apresentam capacidade de proteger a mucosa gástrica das lesões induzidas por AINES e agentes ulcerogênicos necrotizantes como HCl/EtOH (Da SILVA et al., 2005).

1.3. *Helicobacter pylori* e as úlceras pépticas

Nas últimas décadas, o tratamento da úlcera péptica tem sido objetivo de várias pesquisas e extratos, frações e substâncias isoladas de plantas demonstram ser eficazes no tratamento dessa afecção (FUKAI et al., 2002; SANNOMIYA et al., 2005a; ZAYACHKIVSKA et al., 2005; BABINCOVÁ et al., 2008; FALCÃO et al., 2008; LUIZ-FERREIRA et al., 2008). Essa doença foi considerada, por mais de um século, uma das principais causas de morbidade em diversas regiões do mundo (CHAN; LEUNG, 2002). Nos Estados Unidos, aproximadamente 4 milhões de pessoas apresentam úlcera péptica, sendo que

a cada ano 350 mil novos casos são relatados, 100 mil pacientes são hospitalizados e, pelo menos, 3 mil pessoas morrem em decorrência dessa enfermidade (KURATA, 1989; COTRAM, 1999). A úlcera duodenal ainda é, nos Estados Unidos, uma das doenças mais comuns que afeta o trato gastrintestinal (SHRESTHA; LAU, 2007).

A prevalência da úlcera difere ao redor do mundo, sendo a úlcera duodenal predominante em países ocidentais e as úlceras gástricas mais frequentes na Ásia, especialmente no Japão (SCHWESINGER et al., 2001). Embora a incidência da doença ulcerosa péptica nos países ocidentais tenha declinado nas últimas décadas, até o início dos anos 90, pelo menos, um em cada dez americanos relatava ter úlcera gástrica ou duodenal diagnosticada clinicamente (SONNEMBERG; EVERHART, 1996).

Há alguns anos acreditava-se que a gastrite crônica e úlceras pépticas fossem resultantes apenas do desequilíbrio entre a quantidade de muco no estômago, cuja função é proteger esse órgão da ação de enzimas digestivas, e a produção de suco gástrico (enzimas proteolíticas e ácido hidrocloreídrico), associado ao uso de algumas drogas (especialmente AINES) ou, até mesmo, a hábitos alimentares inadequados. Nessas condições, um processo inflamatório era iniciado, podendo progredir para uma área ulcerada. O padrão de tratamento consistia em administrar medicamentos que inibiam a liberação dos ácidos associados a uma dieta alimentar para reduzir a irritação da mucosa estomacal (WALLACE; GRANGER, 1996; MAITY et al., 2003).

Em fevereiro de 1994, o Consenso do Instituto Nacional de Saúde (National Institute of Health - NIH) concluiu que a maior causa de úlcera péptica era decorrente da infecção por *Helicobacter pylori* (Figura 2) e que todos os pacientes diagnosticados deveriam ser submetidos à terapia antimicrobiana (NIH, 1994; SALYERS; WHITT, 1994; FERNANDEZ, 2004). Atualmente, estima-se que 50% da população mundial devam estar colonizadas pelo *H. pylori*, podendo ser esse percentual muito maior em países emergentes (Figura 3)

(AGOSTINHO, 2003; KUSTERS, 2006; CLYNE et al., 2007; THE *Helicobacter* FOUNDATION, 2009).



Figura 2 - Micrografia eletrônica de varredura da bactéria *Helicobacter pylori*

(Fonte: QUEENSLAND HEALTH, 2008)

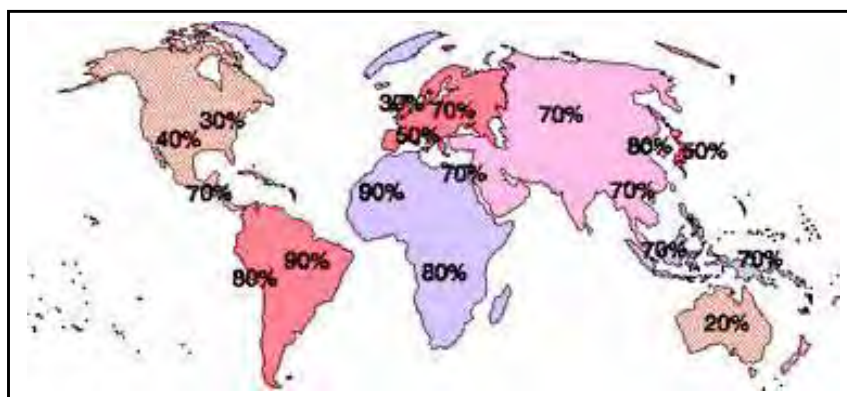


Figura 3 – Colonização por *Helicobacter pylori* no mundo

(Fonte: THE *Helicobacter* FOUNDATION, 2009)

Os esquemas terapêuticos para tratamento de distúrbios gastrintestinais associados ao *H. pylori* preconizam a utilização de um regime multidroga, sendo os antimicrobianos de escolha a amoxicilina, claritromicina, furazolidona e metronidazol (CHATSUWAN; AMYES, 1999; GONZALEZ et al., 2001; COELHO; ZATERKA, 2005). O aparecimento de cepas de

H. pylori resistentes à terapia antimicrobiana, principalmente aos imidazólicos (metronidazol) e macrolídeos (claritromicina), vem sendo um dos fatores responsáveis pelas falhas no tratamento (BOYANOVA, 1999; KANAMARU et al., 2001; FUNATOGAWA et al., 2004; KIM et al., 2009). O alto custo dos medicamentos também contribui para o insucesso da terapêutica. Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), apenas 20% dos pacientes diagnosticados com alguma doença adquirem os medicamentos necessários para o tratamento (SANTOS, 2001).

Considerando que as terapias para erradicação do *H. pylori* podem ser ineficazes e que efeitos colaterais podem ocorrer, a pesquisa de novas drogas para terapias alternativas é de grande importância (STEGE et al., 2006). Diversos trabalhos demonstram que as plantas podem ser fontes de substâncias capazes de atuar contra o *H. pylori* (FABRY et al., 1996; YESILADA et al., 1999; ANKLI et al., 2002; SHIKOV et al., 2008). Annuk et al. (1999), Yoshida et al. (2000) e Funatogawa et al. (2004) associaram taninos à atividade anti-*H. pylori* das plantas por eles avaliadas; Beil et al. (1995), Bae et al. (1999) e Fukai et al. (2002) justificaram essa atividade decorrente da presença de flavonóides e Shirataki et al. (2001) devido a isoflavonas.

Atualmente, uma nova preocupação relacionada à colonização do trato gastrointestinal pelo *H. pylori* é a sua associação com o desenvolvimento de câncer gástrico e linfoma de tecido linfóide associado à mucosa (FUKAI et al., 2002; FUNATOGAWA et al., 2004; YUEN et al., 2005). A resposta inflamatória decorrente da infecção pelo *H. pylori* induz alterações patológicas no microambiente gástrico, com a liberação de citocinas e grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células inflamatórias, especialmente leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (LPMNs), que podem contribuir para a carcinogênese (BAGCHI et al., 2002; CORREA, 2004; AREND et al., 2005; MATTHEWS; BUTLER, 2005; YUAN et al., 2006; AUGUSTO et al., 2007). O aumento da taxa de mitose

observado em células da mucosa gástrica colonizada por *H. pylori* eleva a possibilidade de erros espontâneos durante a replicação. A infecção por *H. pylori* também pode resultar na diminuição dos níveis de ácido ascórbico gástrico, um potente antioxidante que cuja redução pode contribuir para o risco de lesão do DNA decorrente da liberação intragástrica de EROs (KIM et al., 2005; ZHANG; FARTHING, 2005).

Embora o organismo humano utilize o oxigênio e reações de oxidação para fins benéficos de geração de energia e destruição de microrganismos, alguns efeitos indesejáveis são atribuídos as EROs, especialmente, quando geradas em quantidades excessivas (ANDERSON; PHILLIPS, 1999; SOUZA et al., 2003; WANG, et al., 2006). A geração de EROs pelas células pode ser direcional ou constitutiva. Fagócitos, como neutrófilos, são produtores de EROs, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 , radical hidroxil (OH^{\bullet}) e ácido hipocloroso (HOCl), que são importantes na destruição de microrganismos invasores, células tumorais e em outras atividades biológicas (RAMASARMA, 1990; BABIOR, 2000; BORUTAITE; BROWN, 2001). No entanto, as espécies reativas podem ser tóxicas para alvos intra e extracelulares, em procariotos e eucariotos, e sua excessiva produção pode acarretar injúria celular (RAMASARMA, 1990; HAMPTON et al., 1998; ALLEN et al., 2005; ALLEN, 2007). O HOCl, como as demais EROs, ataca uma ampla ordem de moléculas, como ácido nucléico e proteínas (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996).

Compostos com propriedade antioxidante protegem as células do dano ao DNA mediado pelas espécies reativas, que pode resultar em mutação e, subsequente, mutagênese (LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001). Mecanismos de defesa antioxidantes limitam os níveis de EROs e substâncias antioxidantes podem inibir a produção ou capturar radicais livres e outros oxidantes, reduzindo a concentração de EROs (ARUOMA, 1996). Vários estudos demonstram o efeito gastroprotetor de algumas substâncias com atividade antioxidante

presente em plantas (GULCIN et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a; ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

Vários métodos *in vitro* foram propostos para determinar a capacidade antioxidante em matrizes biológicas, componentes alimentares, extratos de plantas e substâncias químicas isoladas (HALLIWELL et al., 1995; MATLE et al., 2000; FENGLIN et al., 2004). A propriedade antioxidante de substâncias pode ser avaliada pela capacidade de sequestrarem radicais livres. O ensaio espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) é um teste que permite fazer uma avaliação indireta do potencial antioxidante de diferentes compostos (FENGLIN et al., 2004, NISHIZAWA et al., 2005). O DPPH é reduzido por substâncias que doam átomos de hidrogênio, tornando-se um composto estável, as quais estão associadas a propriedades antioxidantes (FENGLIN et al., 2004; CHENG et al., 2006).

Pró-oxidantes e antioxidantes também podem ser estudados em sistemas biológicos através de ensaios que medem a produção de EROs, como, por exemplo, nos testes de quimiluminescência (YILDIZ; DEMIRYÜREK, 1998; PRIOR; CAO, 1999; TOMEI; SALVADOR, 2007). As técnicas quimiluminescentes são métodos sensíveis que permitem o monitoramento contínuo da produção de EROs, diferenciando estágios metabólicos através da utilização de diferentes sondas. Um antioxidante reduz ou não permite que EROs oxidem o substrato (sondas como luminol e lucigenina), resultando na diminuição da quimiluminescência do sistema (HIRAYAMA et al., 1997).

Em decorrência do reconhecimento do *H. pylori* como a causa mais importante na gênese da úlcera péptica, associado ao potencial terapêutico atribuído a várias espécies vegetais brasileiras empregadas na medicina popular, a atividade anti-*H. pylori*, antioxidante, bem como o potencial citotóxico de plantas do Cerrado brasileiro, empregadas no tratamento de transtornos gastrintestinais e processos inflamatórios, foram avaliados neste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Nosso trabalho propôs dar continuidade ao estudo integrado químico-farmacológico das plantas medicinais, constantes do Projeto Biota/Fapesp avaliando algumas atividades biológicas de espécies vegetais com potencial antiulcerogênico.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a citotoxicidade basal, atividade anti-*Helicobacter pylori* e o potencial antioxidante de:

- 1) extratos apolares e polares de espécies pertencentes aos gêneros *Alchornea* (*A. glandulosa* e *A. triplinervia*), *Anacardium* (*A. humile*), *Byrsonima* (*B. basiloba*, *B. crassa* e *B. intermedia*), *Davilla* (*D. elliptica*), *Guapira* (*G. noxia*), *Mouriri* (*M. pusa*), *Qualea* (*Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*) e *Strychnos* (*S. pseudoquina*);
- 2) frações obtidas de *B. crassa* (fração aquosa e AcOEt), *G. noxia* (fração flavonóides/flavonoídica e saponinas) e *S. pseudoquina* (fração alcalóides/alcaloídica, intermediária e flavonóides/flavonoídica);
- 3) mistura de triterpenóides (α -amirina e β -amirina) obtida de extrato apolar de *B. crassa*;
- 4) compostos fenólicos (amentoflavona, (+)-catequina, galato de metila, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo) isolados do extrato polar de *B. crassa* e quercetina (padrão comercial).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécies vegetais

3.1.1. Etapa botânica

As espécies estudadas, *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *A. humile*, *B. basiloba*, *B. crassa*, *B. intermedia*, *D. elliptica*, *G. noxia*, *M. pusa*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora*, *Q. parviflora*, *S. pseudoquina*, estão inseridas no projeto temático de bioprospecção, intitulado “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores da Mata Atlântica e do Cerrado”, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP) (Programa BIOTA/FAPESP - Processo: 02/05503-6).

As folhas da *A. glandulosa* foram coletadas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), município de Piracicaba, São Paulo, Brasil. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Jorge Y. Tamashiro e uma exsicata (número de *voucher* 132828) foi depositada no Herbário da Universidade de Campinas (UNICAMP). As folhas de *A. triplinervia* foram coletadas no Jardim Botânico do Instituto de Biociências da UNESP, município de Botucatu, São Paulo, Brasil e identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Y. Tamashiro. Uma exsicata de número 14873 foi depositada no Herbário “Irina Delanova Gemtchujnicov” da UNESP, Campus de Botucatu.

As folhas de *A. humile* foram coletadas na rodovia Monte do Carmo, Porto Nacional, Tocantins, Brasil, e identificadas pelo Prof. Eduardo Ribeiro dos Santos da Universidade do Tocantins (UNITINS), com o auxílio da Profª. Dra. Clélia A. Hiruma-Lima, do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP). Uma exsicata foi depositada no Herbário da UNITINS sob o número 1922.

S. pseudoquina e *B. crassa* (folhas) foram coletadas no município de Porto Nacional, Tocantins, Brasil, e identificadas pelo Prof. Eduardo Ribeiro dos Santos. Exsicatas foram depositadas no Herbário da UNITINS sob os números 3291 e 3377. As folhas de *B. basiloba*

e *B. intermedia* foram colhidas de plantas da região do município de Pratânia, São Paulo, Brasil e identificadas no Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP). As exsicatas encontram-se depositadas no Herbário “Irina Delanova Gemtchujnicov” sob os números 24163 e 24164, respectivamente.

Folhas de *D. elliptica* e *M. pusa* foram coletadas em Porto Nacional e Brejinho de Nazaré, Tocantins, Brasil, e identificadas pela Profa. Dra. Solange de Fátima Lolis. Exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Tocantins (UFT) sob os números 4583 e 4548, respectivamente.

As folhas de *G. noxia* foram coletadas na fazenda Palmeiras da Serra, município de Pratânia, São Paulo, Brasil. A coleta foi realizada por Clemente José Campos e Juliana Severi e seu registro de exsicata encontra-se depositado no Herbário da UNESP, Campus de Botucatu.

As cascas de *Q. grandiflora* foram coletadas na estrada Pedro Afonso, Tocantins, Brasil; as cascas de *Q. multiflora* e *Q. parviflora* também foram coletadas no Estado de Tocantins. A identificação das espécies vegetais foi realizada pela Profa. Dra. Solange de Fátima Lolis, catalogadas com os números de exsicatas 4158, 3379 e 9226, respectivamente, e depositadas no Herbário da UNITINS.

3.1.2. Etapa química

3.1.2.1. Obtenção dos extratos, frações e compostos isolados das espécies vegetais

A obtenção dos extratos e frações foi de responsabilidade da equipe coordenada pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas e encontra-se descrita em: Calvo et al. (2007) para *A. glandulosa* e *A. triplinervia*; Ferreira (2005) para *A. humile*; Lira et al. (2008) para *B. basiloba*; Sannomiya et al. (2004) e Cardoso et al. (2006) para *B. crassa*; Sannomiya et al. (2007) para *B. intermedia*; Michelin et al. (2005) para *D. elliptica*; Severi et al. (2006b) e Severi (2007) para

G. noxia; Andreo et al. (2006) para *M. pusa*; Nasser (2007) para *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*; Da Silva et al. (2005) e Santos et al. (2006) para *S. pseudoquina*.

Os compostos fenólicos, amentoflavona, (+)-catequina, galato de metila, quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, isolados do extrato MeOH de folhas de *B. crassa* (SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a; SANNOMIYA et al., 2005c), foram cedidos por Miriam Sannomiya. A mistura de triterpenóides (α -amirina e β -amirina), obtida do extrato CHCl₃ de folhas de *B. crassa* (HIGUCHI, et al., 2008), foi cedida pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas. O flavonóide quercetina foi adquirido da Sigma-Aldrich (Q-0125).

Para realização dos ensaios, os extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos isolados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 50 mg/mL ou 100 mg/mL e mantidos à -20°C ao abrigo da luz. A procedência dos reagentes, preparo de meios e soluções estão descritos no APÊNDICE A.

3.2. Atividade citotóxica

3.2.1. Linhagem celular

Linhagem celular McCoy B (ATCC 1696), adquirida do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, foi mantida em meio Eagle adicionado de 7,5% de soro fetal bovino. As células McCoy B são fibroblastos (linhagem contínua) originados de camundongos.

3.2.2. Determinação da citotoxicidade

Duzentos microlitros de meio Eagle suplementado com 7,5% de soro fetal bovino, contendo 6×10^4 células McCoy/mL foram distribuídos em cavidades de microplacas (96 wells), as quais foram incubadas por 24 horas a 35-37°C. Posteriormente, o meio foi removido e diferentes concentrações (31,25 a 500 μ g/mL em meio Eagle) dos extratos, frações, mistura

de triterpenos e compostos foram adicionadas sobre o tapete celular. As placas foram reveladas pela técnica do vermelho neutro (VN) (BORENFREUND; PUERNER, 1985), após incubação por 24 horas. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro multicanal (Spectra & Rainbow Readers da Tecan Austria), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm (FRESHNEY, 1994). O índice citotóxico 50% (IC₅₀), concentração do agente que reduz em 50% a absorvância espectrofotométrica, foi determinado. Os testes foram acompanhados de crescimento celular controle (na ausência dos extratos, frações, mistura de triterpenos ou compostos fenólicos) e controle de absorvância (extratos, frações, mistura de triterpenos ou compostos na ausência de células). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes. As curvas dose-efeito (concentração x absorvância) para determinação dos IC₅₀ foram obtidas através de análise de regressão linear. A cisplatina (Tecnoplatin[®] da Zodiac) substância citotóxica empregada em terapias antitumorais, foi utilizada como padrão de citotoxicidade.

3.3. Atividade anti-*Helicobacter pylori*

3.3.1. Antimicrobianos padrões

Amoxicilina (Genix Indústria Farmacêutica Ltda, lote F406087) e metronidazol (Natural Pharma, lote W215279) foram solubilizados em DMSO para preparação de soluções a 50 mg/mL. A partir dessas soluções, foram preparadas as concentrações empregadas nos ensaios de atividade antimicrobiana.

3.3.2. Microrganismo

Helicobacter pylori (cepa ATCC 43504), amoxicilina sensível (AmoxS) e metronidazol resistente (MtzR), foi semeado em placas contendo ágar Columbia,

suplementado com 10% de sangue de carneiro, incubadas por 72 horas a 36°-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂.

3.3.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos para *H. pylori* foi realizada através da técnica espectrofotométrica de microdiluição em caldo, após padronização (APÊNDICE B).

3.3.3.1. Interferência do DMSO no crescimento de *H. pylori*

Cavidades de microplaca (96 wells) foram preenchidas com 100 µL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo concentrações variadas de DMSO (1 a 10 %) sobre os quais foi adicionado o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* (10⁶ UFC/mL em caldo BHI). Leitura espectrofotométrica em 620 nm foi realizada e a microplaca incubada a 36°-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por 72 horas. Após incubação, a placa foi homogeneizada e nova leitura espectrofotométrica foi realizada em mesmo comprimento de onda. As concentrações de DMSO que interferem no crescimento do *H. pylori* foram determinadas. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes.

3.3.3.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos para *H. pylori*

Cavidades de microplaca (96 wells) foram preenchidas com 100 µL de caldo BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo diferentes concentrações (64 a 1024 µg/mL em caldo BHI) dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos sobre os quais foi adicionado o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* (10⁶ UFC/mL

em caldo BHI contendo 10% de soro fetal bovino). Leitura espectrofotométrica em 620 nm foi realizada e a microplaca incubada a 36°-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por 72 horas. Após incubação, a placa foi homogeneizada e nova leitura espectrofotométrica foi realizada em mesmo comprimento de onda. A primeira leitura teve por objetivo eliminar a absorvância inicial a ser descontada da leitura obtida após incubação, com a finalidade de computar somente o crescimento bacteriano. Os testes foram acompanhados de crescimento bacteriano controle (na ausência dos extratos, frações, mistura de triterpenos ou compostos fenólicos) e controle de absorvância (meio de cultura acrescido de diferentes concentrações dos extratos, frações, mistura de triterpenos ou compostos). A definição de CMI é reportada na padronização da técnica de microdiluição em caldo (APÊNDICE B).

3.4. Atividade antioxidante

3.4.1. Avaliação da capacidade sequestradora (ou redutora) de radical DPPH

Solução de DPPH a 0,004% em MeOH foi utilizada neste ensaio espectrofotométrico. A cada 50 µL da amostra teste (extrato, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos) em diversas concentrações (5 a 100 µg/mL em EtOH) foram adicionados 100 µL da solução de DPPH, sendo as absorvâncias determinadas a 540 nm em espectrofotômetro multicanal, após 30 minutos de reação a 25°C. Solução de DPPH (100 µL) adicionada de 50µL de solução de DMSO em MeOH foi empregada como controle de máxima absorção. A equação utilizada para determinar a porcentagem de inibição (% Δ) é apresentada a seguir, onde A_o representa a absorvância do DPPH sem a adição das amostras (extratos, frações, mistura de triterpenos ou compostos fenólicos) e A corresponde a absorvância obtida na presença das amostras, após 30 minutos de reação (FENGLIN et al., 2004; CHENG et al., 2006).

$$\% \Delta = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

A concentração eficiente 50% (CE₅₀), concentração do antioxidante necessária para reduzir em 50% a quantidade do radical DPPH em solução, foi determinada por análise de regressão linear. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, repetidos, no mínimo, três vezes e acompanhados dos antioxidantes controles: quercetina e trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E).

3.4.2. Avaliação do *burst* oxidativo (respiratório) de LPMNs

3.4.2.1. Indução de exsudato celular para obtenção de LPMNs

Solução (10 mL) de glicogênio de ostra a 0,5% (p/v) em NaCl a 0,85% (p/v) foi injetada, via intraperitoneal, em rato tipo *Rattus norvegicus albinus* (macho, 150-200 g). Após 12 horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 20 mL de tampão PBS Dulbecco's (PBSD) sem cálcio, contendo 10 UI heparina/mL. A suspensão celular obtida foi lavada 2 vezes com PBSD sem cálcio (300 x g, 5 min, 4°C) e ressuspendida no mesmo tampão. Em tubos siliconizados cônicos, com capacidade para 15 mL, foram adicionados 5 mL de Histopaque[®] densidade 1077 e, vagarosamente, o mesmo volume da suspensão celular. Os tubos foram centrifugados por 30 min a 800 x g, o sedimento lavado 3 vezes em tampão PBSD sem cálcio e ressuspendido na mesma solução tampão. Um *pool* de LPMNs, obtido de 3 animais diferentes, foi empregado em cada experimento. A execução dos ensaios utilizando animais recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara – UNESP (ANEXO).

3.4.2.2. Contagem total e diferencial de células em exsudato peritoneal

A contagem total de LPMNs foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial após confecção de lâmina, em citocentrífuga e corada pelo método May-Grünwald-Giemsa. Para a determinação do percentual de LPMNs presente na suspensão celular foram observadas 500 células por lâmina preparada. Suspensões contendo, no mínimo, 90% do tipo celular desejado foram utilizadas nos ensaios. As células foram conservadas em banho de gelo até a realização dos experimentos.

3.4.2.3. Viabilidade de LPMNs no período de tempo do ensaio quimiluminescente

A viabilidade de LPMNs foi determinada utilizando a técnica colorimétrica do vermelho neutro. Tampão PBS (100 µL) contendo 4×10^6 células/mL foi distribuído em tubos tipo eppendorf, sobre o qual foram adicionados 100 µL de solução de vermelho neutro (2 mg/mL em PBS) no tempo inicial ($t = 0$) e final ($t = 90$ min), período de duração dos ensaios quimiluminescentes. Após incubação por 3 horas (37°C) com solução de vermelho neutro, os tubos foram centrifugados (300 x g, 5 min), os sobrenadantes desprezados e adicionados 200 µL de solução de ácido acético/etanol a 50% (1:10). Após homogeneização, 100 µL foram transferidos para microplaca e a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro multicanal, comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm. Os testes foram realizados com um *pool* celular obtido de 3 animais diferentes e repetidos, no mínimo, três vezes.

3.4.2.4. Viabilidade dos LPMNs na presença dos extratos, frações e compostos fenólicos

Tampão PBS (100 µL) contendo 4×10^6 células/mL foi distribuído em tubos tipo eppendorfs, sobre o qual foram adicionados 100 µL de tampão PBS contendo 200 µg/mL dos extratos, frações ou compostos fenólicos. Após 90 minutos de incubação (37°C), os tubos

foram centrifugados (300 x g, 5 min), os sobrenadantes desprezados e adicionados 200 µL de solução de vermelho neutro (1 mg/mL em PBS). Após incubação por 3 horas (37°C), os eppendorfs foram novamente centrifugados (300 x g, 5 min), os sobrenadantes desprezados e adicionados 200 µL de solução de ácido acético/etanol a 50% (1:10). Posteriormente, 100 µL foram transferidos para microplaca e a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro multicanal, comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm. Os ensaios foram acompanhados de controle positivo de viabilidade celular (LPMNs na ausência dos extratos, frações ou compostos fenólicos) e controle de absorvância (PBS acrescido dos extratos, frações ou compostos fenólicos). Os testes foram realizados com um *pool* celular obtido de 3 animais diferentes e repetidos, no mínimo, três vezes.

3.4.2.5. Ensaio quimiluminescentes

As reações quimiluminescentes seguiram recomendações descritas por KITAGAWA et al. (2003) e GALICE et al. (2006), sendo realizadas em luminômetro BioOrbit modelo 1251. O aparelho encontra-se interfaceado a um microcomputador e os resultados são processados através do software Multiuse versão 2.0. Os ensaios foram realizados sob orientação do Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

3.4.2.5.1. Padronização da suspensão bacteriana

Para realização do ensaio quimiluminescente, adicionou-se aos tubos de reação: tampão PBS, suspensão celular (LPMNs 2×10^6 células/mL) e luminol (2×10^{-5} M). Após posicionamento dos tubos na câmara de leitura do luminômetro, a reação foi disparada através da adição do estímulo imunológico, zymosan 700 µg/mL (estímulo controle) ou suspensão de *H. pylori* (0,15 - 0,3 UDO), utilizando dispensador externo, com volume final de 1 mL por

tubo. As reações foram realizadas à 37°C e o *burst* oxidativo monitorado por um período de 90 minutos. A intensidade máxima de emissão (IME) e a integral da cinética de emissão (ICE) foram determinadas no final da reação. Os testes foram realizados com um *pool* celular obtido de 3 animais diferentes e repetidos, no mínimo, três vezes.

3.4.2.5.2. *Burst* oxidativo de LPMNs estimulados com *H. pylori* na presença dos extratos, frações e compostos fenólicos

Para avaliação do *burst* oxidativo de LPMNs estimulados com *H. pylori* na presença dos extratos, frações e compostos fenólicos, adicionou-se aos tubos de reação: tampão PBS, suspensão celular (LPMNs 2×10^6 células/mL) e luminol (2×10^{-5} M). Após posicionamento dos tubos na câmara de leitura do luminômetro, a reação foi disparada através da adição de estímulo imunológico, zymosan 700 µg/mL (estímulo controle) ou *H. pylori* (0,2 UDO), utilizando dispensador externo. Após 15 minutos (a 37°C), foram adicionadas diferentes concentrações dos extratos, frações e compostos fenólicos aos tubos de reação, com volume final de 1 mL por tubo. O *burst* oxidativo foi monitorado por mais 75 minutos (a 37°C). A IME e a ICE foram determinadas no final da reação. Os testes foram realizados com um *pool* celular obtido de 3 animais diferentes e repetidos, no mínimo, três vezes.

3.4.2.6. Cálculo da variação da quimiluminescência

A variação da quimiluminescência (ΔQL) expressa a IME e ICE após correção com a linha de base (células na ausência de estímulo ativador do *burst* oxidativo), sendo representada da seguinte forma:

$\Delta QL_{Máxima} = \text{IME das células estimuladas} - \text{IME das células na ausência de estímulo}$

$\Delta QL_{Cinética} = \text{ICE das células estimuladas} - \text{ICE das células na ausência de estímulo}$

3.5. Análise estatística

A interpretação dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA), sendo 0,05 o nível de significância (LAPPONI, 1997). O IC₅₀ e CE₅₀ foram definidos através de análise de regressão linear com limite de confiança 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos

Os IC_{50} obtidos, através de análise de regressão linear, para os extratos apolares (extratos $CHCl_3$ e diclorometano (DCM)) e polares (extratos MeOH) das plantas avaliadas são apresentados na Tabela 1. Os valores dos IC_{50} para as frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos isolados de *B. crassa* são apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Os altos valores de IC_{50} dos extratos e frações vegetais revelaram baixo poder citotóxico para a linhagem celular utilizada. A quercetina e a (+)-catequina apresentaram maior potencial citotóxico em relação aos extratos e frações, bem como para os demais compostos fenólicos e mistura de triterpenos. A curva dose-efeito de um extrato MeOH e de um composto fenólico, utilizada para determinação do IC_{50} , é apresentada no APÊNDICE C.

Tabela 1 - Índice citotóxico 50% (IC₅₀) de extratos CHCl₃, DCM e MeOH para células McCoy

Espécie vegetal	IC ₅₀ (µg/mL) ¹	
	Extrato apolar (CHCl ₃ ou DCM)	Extrato polar (MeOH)
<i>Alchornea glandulosa</i>	226 ± 8,0	295 ± 6,0
<i>Alchornea triplinervia</i>	298 ± 8,5	286 ± 5,0
<i>Anacardium humile</i> ²	263 ± 5,5	275 ± 6,0
<i>Byrsonima basiloba</i>	228 ± 4,7	366 ± 8,1
<i>Byrsonima crassa</i>	201 ± 5,3	281 ± 4,2
<i>Byrsonima intermedia</i>	266 ± 5,6	340 ± 5,4
<i>Davilla elliptica</i>	258 ± 6,2	306 ± 7,0
<i>Guapira noxia</i>	313 ± 7,3	239 ± 5,2
<i>Mouriri pusa</i> ²	274 ± 4,3	310 ± 4,0
<i>Qualea grandiflora</i>	238 ± 3,9	254 ± 4,3
<i>Qualea multiflora</i>	263 ± 4,5	267 ± 5,3
<i>Qualea parviflora</i>	239 ± 5,8	255 ± 6,0
<i>Strychnos pseudoquina</i> ²	336 ± 4,8	375 ± 3,9
Cisplatina	41,9 ± 0,5	

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão; ²Extrato DCM

Tabela 2 - Índice citotóxico 50% (IC₅₀) de frações de *Byrsonima crassa*, *Guapira noxia* e *Strychnos pseudoquina* para células McCoy

Espécie vegetal (fração)	IC ₅₀ (µg/mL)*
<i>Byrsonima crassa</i> (aquosa)	413 ± 7,5
<i>Byrsonima crassa</i> (AcOEt)	308 ± 5,5
<i>Guapira noxia</i> (flavonoídica)	256 ± 3,5
<i>Guapira noxia</i> (saponinas)	253 ± 3,2
<i>Strychnos pseudoquina</i> (alcaloídica)	413 ± 5,9
<i>Strychnos pseudoquina</i> (intermediária)	378 ± 4,1
<i>Strychnos pseudoquina</i> (flavonoídica)	261 ± 3,2
Cisplatina	41,9 ± 0,5

*Valor apresentado como média ± desvio padrão

Tabela 3 - Índice citotóxico 50% (IC₅₀) de compostos fenólicos e mistura de triterpenos isolados de *Byrsonima crassa* para células McCoy

Composto isolado ou mistura	IC ₅₀ (µg/mL)*
Amentoflavona	366,0 ± 6,4
(+)-catequina	164,0 ± 5,2
Galato de Metila	297,0 ± 7,5
Quercetina-3- <i>O</i> -α-L-arabinopiranosídeo	> 500,0
Quercetina-3- <i>O</i> -β-D-galactopiranosídeo	> 500,0
Triterpenóides (α-amirina + β-amirina)	292 ± 7,3
Quercetina	94,5 ± 5,4
Cisplatina	41,9 ± 0,5

*Valor apresentado como média ± desvio padrão

4.2. Atividade anti-*H. pylori*

4.2.1. Interferência do DMSO no crescimento de *H. pylori*

A Figura 4 apresenta o efeito de diferentes concentrações de DMSO sobre o crescimento de *H. pylori*, após 72 horas de incubação. Na presença de 1,25% e 2,5% de DMSO o crescimento bacteriano foi $97,6 \% \pm 8,0$ e $93,2 \% \pm 0,9$, respectivamente. Para garantir que o DMSO utilizado para solubilizar as amostras não interferisse no crescimento do *H. pylori*, todos os ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados na presença de concentrações de DMSO não superiores a 1,25%.

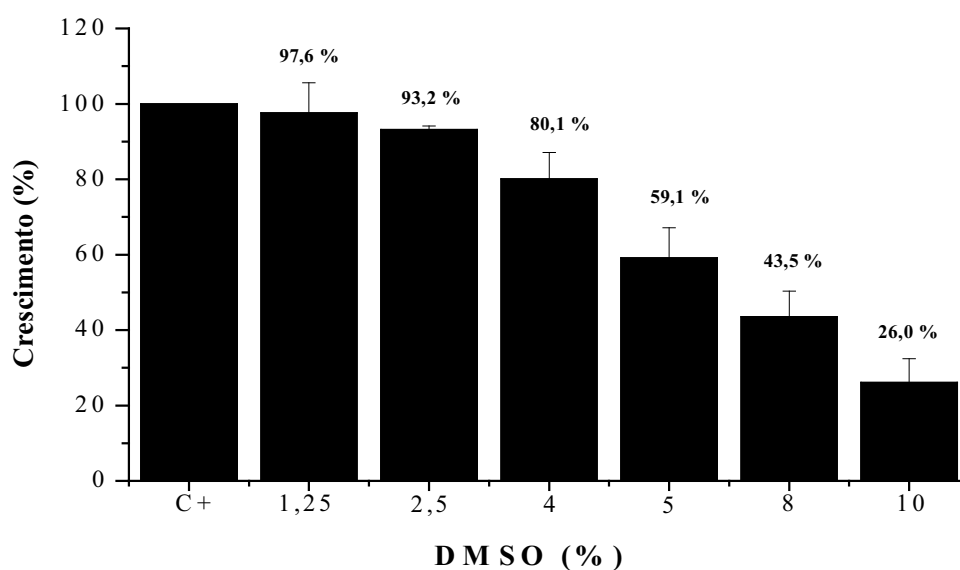


Figura 4 - Efeito do DMSO sobre o crescimento de *Helicobacte pylori*

4.2.2. Determinação da CMI dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos para *H. pylori*

O efeito dos extratos CHCl₃, DCM e MeOH na inibição do crescimento de *H. pylori* é apresentado nas Tabelas de 4 e 5. A CMI dos extratos CHCl₃ e MeOH de *B. crassa* e extrato CHCl₃ de *D. elliptica* foi de 1024 µg/mL; para os demais extratos (apolares e polares) a maior concentração utilizada não inibiu o crescimento bacteriano (considerando redução na absorvância superior a 90%). Na concentração de 1024 µg/mL, os extratos CHCl₃ de *A. glandulosa* e *B. intermedia* inibiram o crescimento bacteriano em 69,7% e 87,1%, respectivamente.

As frações flavonoídicas (Tabela 6) obtidas de *G. noxia* e *S. pseudoquina* apresentaram melhor atividade inibitória para *H. pylori* quando comparadas as demais frações avaliadas. Entretanto, a CMI não foi alcançada na maior concentração testada (1024 µg/mL). Em relação aos compostos fenólicos, quercetina e amentoflavona inibiram o crescimento bacteriano em 47,4% e 43,5%, respectivamente, na concentração 1024 µg/mL (Tabela 7). A mistura de triterpenos (α -amirina e β -amirina) inibiu o crescimento de *H. pylori* em 35,6% na maior concentração testada (Tabela 7).

As curvas de crescimento de *H. pylori* na presença de diferentes concentrações dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos são apresentadas no APÊNDICE D.

Tabela 4 - Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* por extratos apolares (extratos CHCl₃ e DCM) de diferentes espécies vegetais

Espécie vegetal (extrato apolar)	Inibição de crescimento (%) [*]				
	Concentração (µg/mL)				
	64	128	256	512	1024
<i>Alchornea glandulosa</i> (CHCl ₃)	5,7 ± 0,5	6,6 ± 0,6	6,5 ± 0,5	9,1 ± 0,7	69,7 ± 1,2
<i>Alchornea triplinervia</i> (CHCl ₃)	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3	4,3 ± 0,4	5,1 ± 0,4	4,3 ± 0,5
<i>Anacardium humile</i> (DCM)	0 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,0 ± 0,3
<i>Byrsonima basiloba</i> (CHCl ₃)	0 ± 0,3	1,4 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	1,4 ± 0,5
<i>Byrsonima crassa</i> (CHCl ₃)	34,7 ± 2,0	39,4 ± 2,2	50,2 ± 2,7	78,4 ± 2,4	98,6 ± 2,1
<i>Byrsonima intermedia</i> (CHCl ₃)	11,9 ± 0,5	21,9 ± 0,6	36,7 ± 0,8	60,5 ± 2,1	87,1 ± 2,2
<i>Davilla elliptica</i> (CHCl ₃)	0 ± 0,5	7,2 ± 0,3	10,1 ± 0,4	46,4 ± 1,0	97,6 ± 2,2
<i>Guapira noxia</i> (CHCl ₃)	0,5 ± 0	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,3	3,2 ± 0,3	3,0 ± 0,4
<i>Mouriri pusa</i> (DCM)	34,6 ± 0,6	34,1 ± 0,5	32,9 ± 0,7	32,9 ± 0,7	34,2 ± 0,5
<i>Qualea grandiflora</i> (CHCl ₃)	0 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,4	3,9 ± 0,2
<i>Qualea multiflora</i> (CHCl ₃)	0 ± 0	1,4 ± 0,3	0 ± 0,3	0 ± 0,4	0 ± 0,4
<i>Qualea parviflora</i> (CHCl ₃)	7,2 ± 0,2	7,2 ± 0,3	8,7 ± 0,2	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,2
<i>Strychnos pseudoquina</i> (DCM)	5,2 ± 0,4	6,4 ± 0,6	7,7 ± 0,5	7,7 ± 0,5	7,7 ± 0,4

^{*}Valor apresentado como média ± desvio padrão

Tabela 5 - Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* por extratos polares (extratos MeOH) de diferentes espécies vegetais

Espécie vegetal (extrato polar)	Inibição de crescimento (%) [*]				
	Concentração (µg/mL)				
	64	128	256	512	1024
<i>Alchornea glandulosa</i>	1,3 ± 0,5	6,7 ± 0,3	8,0 ± 0,4	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,5
<i>Alchornea triplinervia</i>	6,8 ± 0,3	8,0 ± 0,4	10,2 ± 0,4	10,2 ± 0,4	10,2 ± 0,6
<i>Anacardium humile</i>	0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	6,0 ± 0,2	20,6 ± 0,6	22,8 ± 0,5
<i>Byrsonima basiloba</i>	0 ± 0,2	0 ± 0,3	2,8 ± 0	5,2 ± 0,2	5,6 ± 0,2
<i>Byrsonima crassa</i>	18,6 ± 0,5	22,9 ± 0,6	27,1 ± 0,7	40,0 ± 1,1	92,9 ± 0,5
<i>Byrsonima intermedia</i>	7,8 ± 0,2	9,2 ± 0,4	13,6 ± 0,8	17,5 ± 1,1	50,0 ± 0,9
<i>Davilla elliptica</i>	1,4 ± 0,5	4,2 ± 0,3	6,9 ± 0,4	11,4 ± 1,0	42,6 ± 1,2
<i>Guapira noxia</i>	15,1 ± 0,6	15,9 ± 0,5	16,1 ± 0,6	16,0 ± 0,4	16,1 ± 0,5
<i>Mouriri pusa</i>	21,1 ± 0,4	21,5 ± 0,4	22,8 ± 0,3	21,5 ± 0,4	27,0 ± 0,6
<i>Qualea grandiflora</i>	0,8 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,3	2,6 ± 0,4
<i>Qualea multiflora</i>	0 ± 0	0 ± 0,1	0 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1
<i>Qualea parviflora</i>	9,3 ± 0,2	8,8 ± 0,5	8,9 ± 0,4	8,8 ± 0,5	8,8 ± 0,4
<i>Strychnos pseudoquina</i>	2,7 ± 0,3	7,1 ± 0,4	8,0 ± 0,5	8,0 ± 0,3	8,0 ± 0,6

^{*}Valor apresentado como média ± desvio padrão

Tabela 6 - Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* por frações de *Byrsonima crassa*, *Guapira noxia* e *Strychnos pseudoquina*

Espécie vegetal (fração)	Inibição de crescimento (%) [*]				
	Concentração (µg/mL)				
	64	128	256	512	1024
<i>Byrsonima crassa</i> (aquosa)	0 ± 0,2	0 ± 0,3	0 ± 0,4	0 ± 0,2	0,9 ± 0,3
<i>Byrsonima crassa</i> (AcOEt)	5,1 ± 0,3	11,5 ± 0,5	11,5 ± 0,4	11,6 ± 0,4	13,2 ± 0,5
<i>Guapira noxia</i> (flavonoídica)	4,7 ± 2,0	10,3 ± 0,5	12,0 ± 0,7	12,8 ± 0,4	19,6 ± 0,8
<i>Guapira noxia</i> (saponinas)	10,3 ± 0,5	10,4 ± 0,6	10,8 ± 0,5	11,6 ± 0,6	11,7 ± 0,2
<i>Strychnos pseudoquina</i> (alcaloídica)	0 ± 0,3	0 ± 0,3	0 ± 0,2	0 ± 0,1	0 ± 0,3
<i>Strychnos pseudoquina</i> (intermediária)	1,3 ± 0,4	3,9 ± 0,3	3,1 ± 0,3	4,4 ± 0,3	5,7 ± 0,2
<i>Strychnos pseudoquina</i> (flavonoídica)	12,2 ± 0,4	15,6 ± 0,5	20,7 ± 0,3	20,3 ± 0,5	24,1 ± 0,5

^{*}Valor apresentado como média ± desvio padrão

Tabela 7 - Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* por compostos fenólicos e mistura de triterpenos isolados de *Byrsonima crassa*

Composto isolado ou mistura	Inibição de crescimento (%) [*]				
	Concentração (µg/mL)				
	64	128	256	512	1024
Amentoflavona	1,5 ± 0,3	4,3 ± 0,4	15,5 ± 0,6	15,9 ± 0,4	43,5 ± 0,6
(+)-catequina	1,5 ± 0,2	8,8 ± 0,6	8,8 ± 0,4	10,3 ± 0,4	10,3 ± 0,5
Galato de metila	5,8 ± 0,2	5,8 ± 0,4	7,3 ± 0,5	7,3 ± 0,3	7,4 ± 0,8
Quercetina-3-O-α-L- arabinopiranosídeo	8,2 ± 0,3	16,4 ± 0,4	17,4 ± 0,3	17,4 ± 0,6	17,8 ± 0,4
Quercetina-3-O-β-D- galactopiranosídeo	3,0 ± 0,6	3,5 ± 0,5	6,0 ± 0,6	9,7 ± 0,7	9,8 ± 0,7
Triterpenóides (α-amirina + β-amirina)	2,7 ± 0,3	16,4 ± 0,5	22,4 ± 0,6	28,8 ± 0,4	35,6 ± 0,7
Quercetina	7,9 ± 0,5	15,0 ± 0,8	17,4 ± 0,5	21,6 ± 0,8	47,4 ± 0,5

^{*}Valor apresentado como média ± desvio padrão

4.3. Atividade antioxidante

4.3.1. Capacidade sequestradora de radical DPPH

Os resultados demonstraram que extratos apolares (Tabela 8) apresentam menor capacidade sequestradora do radical DPPH que extratos polares (Tabela 9). A atividade antioxidante dos extratos MeOH de *A. humile*, *B. crassa* e *Q. parviflora* foi comparável a obtida para os controles (quercetina e trolox). As Tabelas 10 e 11 apresentam a porcentagem de redução do DPPH pelas frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos. Dentre as frações avaliadas, a aquosa e AcOEt de *B. crassa* e a fração flavonoídica de *G. noxia* mostraram os menores valores de CE_{50} . Ao contrário dos triterpenos, todos os compostos fenólicos apresentaram potencial antioxidante dose-dependente pela técnica de redução do radical DPPH.

No APÊNDICE E são exemplificados um gráfico onde foi possível estabelecer uma reta de regressão linear para determinação da CE_{50} e outro onde não foi possível estabelecer essa regressão.

A Porcentagem de redução do radical DPPH dos extratos apolares e polares, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos também é apresentada na forma de gráficos no APÊNDICE F.

Tabela 8 - Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE₅₀) dos extratos apolares (CHCl₃ e DCM) de diferentes espécies vegetais

Espécie vegetal (extrato apolar)	Redução do DPPH (%) ¹										CE ₅₀
	5	10	20	40	50	80	100				
	Concentração (µg/mL)										
<i>Alchornea glandulosa</i>	8,6 ± 0,2	9,1 ± 0,2	13,1 ± 0,8	14,3 ± 0,8	17,5 ± 0,6	21,2 ± 0,4	22,9 ± 0,6				ND ²
<i>Alchornea triplinervia</i>	1,7 ± 0,1	6,7 ± 0,3	13,0 ± 0,7	29,3 ± 0,7	34,7 ± 0,8	47,1 ± 0,8	49 ± 1,2				≈ 100
<i>Anacardium humile</i> ³	5,2 ± 0,3	5,2 ± 0,3	6,6 ± 0,5	6,0 ± 0,3	7,4 ± 0,3	16,6 ± 0,5	19,6 ± 1,3				ND ²
<i>Byrsonima basiloba</i>	4,2 ± 0,5	8,7 ± 0,5	12,1 ± 0,5	24,7 ± 0,2	31,3 ± 0,5	45,1 ± 0,8	54,2 ± 1,5				89,6
<i>Byrsonima crassa</i>	0 ± 0,2	0 ± 0,3	0 ± 0,4	3,8 ± 0,2	3,3 ± 0,3	7,8 ± 0,3	9,6 ± 0,8				ND ²
<i>Byrsonima intermedia</i>	0 ± 0,3	0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,5 ± 0,2	7,1 ± 0,5	8,3 ± 0,6				ND ²
<i>Davilla elliptica</i>	0 ± 0,4	0 ± 0,4	0 ± 0,3	0 ± 0,3	0 ± 0,5	5,3 ± 0,2	4,2 ± 0,3				ND ²
<i>Guapira noxia</i>	0 ± 0,2	0 ± 0,2	1,4 ± 0,3	3,9 ± 0,4	4,0 ± 0,3	10,0 ± 0,8	11,0 ± 0,5				ND ²
<i>Mouriri pusa</i> ³	1,9 ± 0,5	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,3	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,3	5,2 ± 0,3	7,4 ± 0,5				ND ²
<i>Qualea grandiflora</i>	0 ± 0,2	1,4 ± 0,3	3,8 ± 0,4	5,0 ± 0,3	6,9 ± 0,5	11,2 ± 0,5	12,1 ± 0,6				ND ²
<i>Qualea multiflora</i>	0 ± 0,4	0 ± 0,3	0 ± 0,4	2,1 ± 0,2	3,3 ± 0,6	9,3 ± 0,5	12,1 ± 0,6				ND ²
<i>Qualea parviflora</i>	0,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,5	6,4 ± 0,5	7,4 ± 0,5	10,3 ± 0,7	15,8 ± 0,4				ND ²
<i>Strychnos pseudoquina</i> ³	6,7 ± 0,4	9,3 ± 0,4	7,9 ± 0,3	6,6 ± 0,4	5,4 ± 0,4	5,9 ± 0,3	6,9 ± 0,3				ND ²
Quercetina (controle)	94,6 ± 1,1	97,2 ± 0,9	96,9 ± 1,8	97,2 ± 1,8	96,9 ± 1,5	97,4 ± 1,5	97,0 ± 1,7				< 5
Trolox (controle)	80,4 ± 1,5	98,0 ± 1,5	97,7 ± 1,4	98,3 ± 2,1	98,4 ± 1,9	98,6 ± 1,4	98,4 ± 1,8				< 5

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão; ²ND (não determinado), a máxima concentração do extrato testada não foi capaz de reduzir em 50% a quantidade de radical DPPH na mistura reacional; ³Extrato DCM

Tabela 9 - Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE₅₀) de extratos polares (MeOH) de diferentes espécies vegetais

Espécie vegetal (extrato polar)	Redução do DPPH (%) [*]										CE ₅₀
	Concentração (µg/mL)										
	5	10	20	40	50	80	100	100	100	CE ₅₀	
<i>Alchornea glandulosa</i>	28,5 ± 0,8	50,3 ± 0,4	72,4 ± 0,9	78,3 ± 1,1	80,1 ± 0,9	80,6 ± 0,9	83,8 ± 1,2	83,8 ± 1,2	83,8 ± 1,2	10,0	
<i>Alchornea triplinervia</i>	46,0 ± 0,4	67,2 ± 0,5	77,4 ± 0,9	79,8 ± 1,0	76,9 ± 0,9	79,6 ± 0,7	78,5 ± 1,0	78,5 ± 1,0	78,5 ± 1,0	5,9	
<i>Anacardium humile</i>	59,4 ± 0,7	73,2 ± 1,2	74,3 ± 0,5	74,1 ± 0,9	73,7 ± 0,8	73,4 ± 1,0	73,7 ± 1,3	73,7 ± 1,3	73,7 ± 1,3	< 5,0	
<i>Byrsonima basiloba</i>	22,6 ± 0,6	42,1 ± 1,1	64,8 ± 0,6	73,4 ± 0,8	73,2 ± 0,7	74,2 ± 1,0	74,6 ± 0,9	74,6 ± 0,9	74,6 ± 0,9	14,2	
<i>Byrsonima crassa</i>	61,9 ± 1,2	81,9 ± 1,5	85,2 ± 1,1	86,4 ± 0,9	85,9 ± 0,7	86,3 ± 1,2	86,2 ± 0,6	86,2 ± 0,6	86,2 ± 0,6	< 5,0	
<i>Byrsonima intermedia</i>	27,0 ± 1,3	47,1 ± 1,1	73,1 ± 1,0	76,3 ± 0,9	77,7 ± 1,2	77,8 ± 1,3	78,0 ± 0,6	78,0 ± 0,6	78,0 ± 0,6	12,0	
<i>Davilla elliptica</i>	36,0 ± 0,7	59,7 ± 0,8	76,3 ± 1,1	76,9 ± 1,1	77,0 ± 1,1	77,1 ± 0,9	77,8 ± 0,7	77,8 ± 0,7	77,8 ± 0,7	8,8	
<i>Guapira noxia</i>	8,9 ± 0,5	16,0 ± 0,7	27,8 ± 0,7	50,7 ± 0,5	58,6 ± 1,0	80,8 ± 0,8	85,3 ± 0,9	85,3 ± 0,9	85,3 ± 0,9	40,0	
<i>Mouriri pusa</i>	39,9 ± 0,7	57,4 ± 0,8	59,6 ± 0,8	63,0 ± 0,6	64,2 ± 0,5	67,5 ± 0,5	67,1 ± 0,8	67,1 ± 0,8	67,1 ± 0,8	7,9	
<i>Qualea grandiflora</i>	34,5 ± 0,8	62,5 ± 0,8	77,5 ± 0,5	80,1 ± 1,2	80,0 ± 0,9	80,5 ± 0,4	81,5 ± 0,9	81,5 ± 0,9	81,5 ± 0,9	8,6	
<i>Qualea multiflora</i>	50,9 ± 1,1	72,7 ± 1,1	74,6 ± 0,7	77,4 ± 1,3	78,6 ± 0,9	81,3 ± 0,7	80,7 ± 0,7	80,7 ± 0,7	80,7 ± 0,7	5,0	
<i>Qualea parviflora</i>	53,0 ± 0,7	71,7 ± 1,2	74,1 ± 1,0	77,0 ± 1,0	78,8 ± 1,0	81,3 ± 0,9	81,2 ± 1,0	81,2 ± 1,0	81,2 ± 1,0	< 5,0	
<i>Strychnos pseudoquina</i>	1,0 ± 0,3	7,2 ± 0,7	11,6 ± 0,5	19,9 ± 0,9	24,8 ± 0,8	35,5 ± 0,9	43,4 ± 0,5	43,4 ± 0,5	43,4 ± 0,5	113,2	
Quercetina (controle)	94,6 ± 1,1	97,2 ± 0,9	96,9 ± 1,8	97,2 ± 1,8	96,9 ± 1,5	97,4 ± 1,5	97,0 ± 1,7	97,0 ± 1,7	97,0 ± 1,7	< 5	
Trolox (controle)	80,4 ± 1,5	98,0 ± 1,5	97,7 ± 1,4	98,3 ± 2,1	98,4 ± 1,9	98,6 ± 1,4	98,4 ± 1,8	98,4 ± 1,8	98,4 ± 1,8	< 5	

^{*}Valor apresentado como média ± desvio padrão

Tabela 10 - Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE₅₀) de frações de *Byrsonima crassa*, *Guapira noxia* e *Strychnos pseudoquina*

Espécie vegetal (fração)	Redução do DPPH (%) ¹										CE ₅₀
	5	10	20	40	50	80	100	100	80	50	
	Concentração (µg/mL)										
<i>Byrsonima crassa</i> (aquosa)	26,0 ± 0,5	47,8 ± 0,6	66,5 ± 0,9	88,6 ± 0,9	91,2 ± 1,1	91,4 ± 1,0	91,9 ± 1,3	91,9 ± 1,3	91,4 ± 1,0	91,2 ± 1,1	13,0
<i>Byrsonima crassa</i> (AcOEt)	13,8 ± 0,2	28,4 ± 0,5	50,2 ± 0,6	81,2 ± 1,0	82,8 ± 1,1	90,4 ± 0,8	90,8 ± 0,9	90,8 ± 0,9	90,4 ± 0,8	82,8 ± 1,1	19,8
<i>Guapira noxia</i> (flavonoídica)	11,1 ± 0,3	27,6 ± 0,7	52,1 ± 0,7	85,0 ± 0,9	91,7 ± 1,3	93,5 ± 1,2	93,2 ± 1,3	93,2 ± 1,3	93,5 ± 1,2	91,7 ± 1,3	19,0
<i>Guapira noxia</i> (saponinas)	5,7 ± 0,5	13,2 ± 0,4	36,1 ± 0,6	64,9 ± 0,9	83,6 ± 0,8	92,9 ± 0,9	93,3 ± 1,0	93,3 ± 1,0	92,9 ± 0,9	83,6 ± 0,8	34,8
<i>Strychnos pseudoquina</i> (alcaloídica)	4,8 ± 0,2	6,2 ± 0,5	7,1 ± 0,6	10,0 ± 1,0	11,4 ± 1,1	17,8 ± 0,9	14,2 ± 1,1	14,2 ± 1,1	17,8 ± 0,9	11,4 ± 1,1	ND ²
<i>Strychnos pseudoquina</i> (intermediária)	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,4	3,2 ± 0,3	5,0 ± 0,6	7,2 ± 0,6	10,6 ± 0,5	10,6 ± 0,5	7,2 ± 0,6	5,0 ± 0,6	ND ²
<i>Strychnos pseudoquina</i> (flavonoídica)	6,7 ± 0,5	14,1 ± 0,7	27,7 ± 0,5	48,0 ± 0,8	58,2 ± 0,9	78,0 ± 1,3	80,4 ± 1,2	80,4 ± 1,2	78,0 ± 1,3	58,2 ± 0,9	45,0
Quercetina (controle)	94,6 ± 1,1	97,2 ± 0,9	96,9 ± 1,8	97,2 ± 1,8	96,9 ± 1,5	97,4 ± 1,5	97,0 ± 1,7	97,0 ± 1,7	97,4 ± 1,5	96,9 ± 1,5	< 5
Trolox (controle)	80,4 ± 1,5	98,0 ± 1,5	97,7 ± 1,4	98,3 ± 2,1	98,4 ± 1,9	98,6 ± 1,4	98,4 ± 1,8	98,4 ± 1,8	98,6 ± 1,4	98,4 ± 1,9	< 5

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão; ²ND (não determinado), a máxima concentração do extrato testada não foi capaz de reduzir em 50% a quantidade de radical DPPH na mistura reacional

Tabela 11 - Redução do radical DPPH e concentração eficiente 50% (CE₅₀) de compostos fenólicos e mistura de triterpenos isolados de*Byrsonima crassa*

Composto isolado ou mistura	Redução do DPPH (%) ¹							CE ₅₀
	5	10	20	40	50	80	100	
	Concentração (µg/mL)							
Amentoflavona	36,4 ± 0,6	50,3 ± 0,7	67,2 ± 1,0	90,6 ± 1,1	95,7 ± 1,0	95,8 ± 1,3	95,6 ± 1,5	10
(+)-catequina	93,6 ± 1,1	96,3 ± 1,0	95,3 ± 1,0	94,9 ± 0,9	94,7 ± 0,9	94,3 ± 1,1	94,0 ± 1,2	< 5
Galato de metila	95,1 ± 0,5	97,2 ± 0,5	96,6 ± 0,5	96,8 ± 0,5	97,1 ± 0,5	97,3 ± 0,5	96,9 ± 0,5	< 5
Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo	40,8 ± 0,6	56,6 ± 0,7	83,7 ± 0,9	94,1 ± 0,8	96,1 ± 1,1	95,6 ± 1,0	96,0 ± 1,1	8,0
Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo	38,3 ± 0,3	53,9 ± 0,7	80,3 ± 0,7	92,2 ± 0,9	94,0 ± 1,0	93,4 ± 1,1	93,4 ± 0,9	9,9
Triterpenóides (α-amirina + β-amirina)	0,1 ± 0,2	0 ± 0,2	0 ± 0,3	0 ± 0,4	0 ± 0,1	0 ± 0,4	0 ± 0,3	ND ²
Quercetina (controle)	94,6 ± 1,1	97,2 ± 0,9	96,9 ± 1,8	97,2 ± 1,8	96,9 ± 1,5	97,4 ± 1,5	97,0 ± 1,7	< 5
Trolox (controle)	80,4 ± 1,5	98,0 ± 1,5	97,7 ± 1,4	98,3 ± 2,1	98,4 ± 1,9	98,6 ± 1,4	98,4 ± 1,8	< 5

¹Valor apresentado como média ± desvio padrão; ²ND (não determinado), a máxima concentração do extrato testada não foi capaz de reduzir em 50% a quantidade de radical DPPH na mistura reacional

4.3.2. Avaliação do *burst* oxidativo de LPMNs

4.3.2.1. LPMNs em exsudato peritoneal de rato

A média de LPMN neutrófilos, em exsudato de *Rattus norvegicus albinus* induzido com glicogênio de ostra, foi $92,8 \pm 2,9\%$. Os valores representam a contagem de 500 células por preparação.

4.3.2.2. Viabilidade dos LPMNs durante o tempo do ensaio e na presença dos extratos, frações e compostos fenólicos

A viabilidade dos LPMNs foi mantida em mais de 90%, após manutenção dessas células em tampão PBS, a 37°C, durante noventa minutos (período de tempo dos ensaios quimiluminescentes). A exposição dos neutrófilos aos extratos, frações e compostos fenólicos a uma concentração de 100 µg/mL (máxima concentração empregada nos ensaios quimiluminescentes), por um período de 90 minutos, não acarretou redução significativa na viabilidade celular.

4.3.2.3. Suspensão bacteriana para ensaio quimiluminescente

O perfil da cinética de emissão de luz para o sistema LPMNs/luminol/*H.pylori* é apresentado na Figura 5, onde observa-se diferenças significativas entre a quimiluminescência do sistema LPMNs/luminol/*H. pylori* (0,15, 0,2 e 0,3 UDO) e a linha de base (LPMNs/luminol). A emissão de luz foi mais intensa nos ensaios realizados com suspensão de *H. pylori* a 0,2 UDO (Tabela 12). O zymosan foi empregado como estímulo controle para avaliar a capacidade de resposta dos LPMNs.

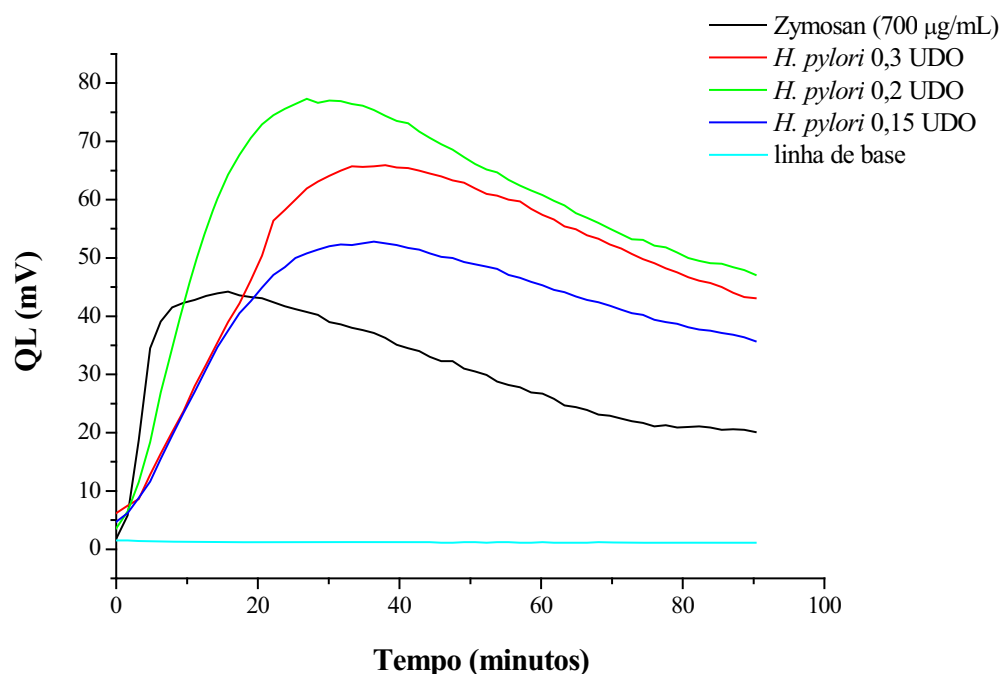


Figura 5 - Quimiluminescência (QL) dos sistemas LPMNs/luminol/zymosan e LPMNs/luminol/*H. pylori* (cepa ATCC 43504). Cinéticas representativas de, no mínimo, três experimentos independentes.

Tabela 12 - Quimiluminescência (QL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) do sistema LPMNs/luminol/zymosan e LPMNs/luminol/*H. pylori*

Estímulo	QL para IME (mV)*	QL para ICE (mV)*
Zymosan (700 µg/mL)	44,2 ± 7,2	1,66 x 10 ⁵ ± 23900
<i>H. pylori</i> (0,3 UDO)	65,9 ± 7,2	2,76 x 10 ⁵ ± 22080
<i>H. pylori</i> (0,2 UDO)	77,3 ± 12,4	3,17 x 10 ⁵ ± 41210
<i>H. pylori</i> (0,15 UDO)	52,8 ± 5,2	2,20 x 10 ⁵ ± 23800
Linha de base	1,5 ± 1,2	0,06 x 10 ⁵ ± 1800

*Valor apresentado como média ± desvio padrão

4.3.2.4. *Burst* oxidativo de LPMNs estimulados com *H. pylori* na presença dos extratos polares, frações e compostos fenólicos

O efeito de diferentes concentrações de extratos MeOH, frações e compostos fenólicos na quimiluminescência dependente de luminol em LPMNs é apresentado nas Tabelas 13, 14 e 15, respectivamente. Os resultados mostram que os extratos de *A. glandulosa*, *A. triplinervia*, *B. crassa*, *G. noxia*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*, em todas as concentrações testadas (5, 50 e 100 µg/mL) reduziram de maneira significativa o *burt* oxidativo de LPMNs induzido por *H. pylori*. Entretanto, o extrato MeOH de *G. noxia* reduziu de maneira menos expressiva o *burst* oxidativo em comparação aos demais extratos polares. Para *A. humile*, *B. basiloba*, *B. intermedia*, *D. elliptica*, *M. pusa*, *Q. grandiflora* foi observada diminuição estatisticamente significativa no *burst* de LPMNs induzido por *H. pylori* na presença de 50 e 100 µg/mL dos extratos. O extrato de *S. pseudoquina* não foi capaz de diminuir de maneira significativa o *burst* oxidativo nas concentrações testadas.

A fração aquosa e AcOEt de *B. crassa* reduziram de maneira significativa o *burst* oxidativo de LPMNs ativado pelo *H. pylori* nas concentrações de 100 e 50 µg/mL. A fração flavonoídica de *G. noxia* apresentou melhor atividade que a fração enriquecida de saponinas. Em relação a espécie *S. pseudoquina*, verificou-se que a fração flavonoídica reduziu de maneira mais expressiva o *burst* de LPMN que a fração intermediária e alcaloídica.

Considerando os resultados obtidos na presença dos compostos fenólicos, a (+)-catequina e o galato de metila mostraram potente atividade antioxidante nas concentrações de 5, 50 e 100 µg/mL. A amentoflavona também foi capaz de reduzir de maneira significativa o *burst* de LPMNs, mas de maneira menos expressiva que a (+)-catequina e o galato de metila. A quercetina, diferente de suas formas glicosídicas, foi capaz de reduzir de maneira significativa o *burst* de LPMNs estimulados com *H. pylori* em todas as concentrações

avaliadas (1, 5, 50 e 100 µg/mL). As cinéticas de emissão de luz obtidas com os extratos, frações e compostos fenólicos são apresentadas no APÊNDICE G.

As Tabelas 16, 17 e 18 demonstram os resultados da porcentagem de redução do radical DPPH e redução no valor da ICE nos ensaios quimiluminescentes por extratos MeOH, frações e compostos fenólicos.

Tabela 13 - Variação da quimiluminescência (ΔQL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* (controle) e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extratos MeOH

Espécie vegetal	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	ΔQL para IME (mV) ¹	ΔQL para ICE (valor da integral) ²	Redução na integral (%)	valor-P ³
<i>Alchornea glandulosa</i>	100	43,7	$0,52 \times 10^5 \pm 2197$	82,4	< 0,05*
	50	38,5	$0,54 \times 10^5 \pm 2279$	81,6	< 0,05*
	5	64,5	$2,32 \times 10^5 \pm 9838$	21,6	< 0,05*
	controle	84,4	$2,96 \times 10^5 \pm 12542$	-	-
<i>Alchornea triplinervia</i>	100	27,3	$0,23 \times 10^5 \pm 1144$	90,2	< 0,05*
	50	28,3	$0,26 \times 10^5 \pm 1301$	88,9	< 0,05*
	5	42,6	$1,67 \times 10^5 \pm 8245$	28,6	< 0,05*
	controle	64,3	$2,34 \times 10^5 \pm 11565$	-	-
<i>Anacardium humile</i>	100	33,4	$0,11 \times 10^5 \pm 1113$	95,0	< 0,05*
	50	30,7	$0,21 \times 10^5 \pm 2047$	90,5	< 0,05*
	5	48,1	$2,00 \times 10^5 \pm 8077$	9,1	> 0,05
	controle	57,0	$2,20 \times 10^5 \pm 13718$	-	-
<i>Byrsonima basiloba</i>	100	19,3	$0,19 \times 10^5 \pm 464$	93,4	< 0,05*
	50	19,0	$0,30 \times 10^5 \pm 2376$	89,7	< 0,05*
	5	74,1	$2,92 \times 10^5 \pm 8077$	0	> 0,05
	controle	74,1	$2,90 \times 10^5 \pm 3502$	-	-

continua na página seguinte

Resultados

<i>continuação</i>	Concentração (µg/mL)	ΔQL para IME (mV) ¹	ΔQL para ICE (valor da integral) ²	Redução na integral (%)	valor-P ³
<i>Espécie vegetal</i>					
<i>Byrsonima crassa</i>	100	35,1	0,10 x 10 ⁵ ± 956	96,8	< 0,05*
	50	40,5	0,22 x 10 ⁵ ± 1982	93,0	< 0,05*
	5	55,5	2,19 x 10 ⁵ ± 20163	30,5	< 0,05*
	controle	78,3	3,15 x 10 ⁵ ± 22334	-	-
<i>Byrsonima intermedia</i>	100	34,2	0,37 x 10 ⁵ ± 2373	74,1	< 0,05*
	50	39,3	0,57 x 10 ⁵ ± 3648	60,1	< 0,05*
	5	46,0	1,22 x 10 ⁵ ± 7767	14,6	> 0,05
	controle	51,0	1,43 x 10 ⁵ ± 9123	-	-
<i>Davilla elliptica</i>	100	27,1	0,16 x 10 ⁵ ± 891	94,6	< 0,05*
	50	26,1	0,29 x 10 ⁵ ± 1651	90,3	< 0,05*
	5	65,3	2,80 x 10 ⁵ ± 15811	6,0	> 0,05
	controle	71,0	2,98 x 10 ⁵ ± 16869	-	-
<i>Guapira noxia</i>	100	35,0	1,55 x 10 ⁵ ± 4391	35,4	< 0,05*
	50	39,7	1,71 x 10 ⁵ ± 4842	28,8	< 0,05*
	5	49,8	1,89 x 10 ⁵ ± 5340	21,3	< 0,05*
	controle	58,6	2,40 x 10 ⁵ ± 6787	-	-

continua na página seguinte

<i>continuação</i>	Concentração (µg/mL)	ΔQL para IME (mV) ¹	ΔQL para ICE (valor da integral) ²	Redução na integral (%)	valor-P ³
<i>Mouriri pusa</i>	100	41,4	0,16 x 10 ⁵ ± 459	93,0	< 0,05*
	50	47,6	0,18 x 10 ⁵ ± 520	92,2	< 0,05*
	5	50,0	2,30 x 10 ⁵ ± 4127	0	> 0,05
	controle	53,3	2,30 x 10 ⁵ ± 4038	-	-
<i>Qualea grandiflora</i>	100	28,1	0,14 x 10 ⁵ ± 765	93,6	< 0,05*
	50	29,1	0,15 x 10 ⁵ ± 867	93,1	< 0,05*
	5	48,7	1,95 x 10 ⁵ ± 6878	10,5	> 0,05
	controle	50,3	2,18 x 10 ⁵ ± 7691	-	-
<i>Qualea multiflora</i>	100	36,5	0,13 x 10 ⁵ ± 1117	95,0	< 0,05*
	50	30,3	0,17 x 10 ⁵ ± 1432	93,5	< 0,05*
	5	35,7	1,37 x 10 ⁵ ± 11586	47,3	< 0,05*
	controle	63,5	2,60 x 10 ⁵ ± 22417	-	-
<i>Qualea parviflora</i>	100	31,3	0,11 x 10 ⁵ ± 931	95,0	< 0,05*
	50	27,0	0,14 x 10 ⁵ ± 1194	93,6	< 0,05*
	5	31,2	1,14 x 10 ⁵ ± 9655	48,0	< 0,05*
	controle	54,3	2,20 x 10 ⁵ ± 18681	-	-

continua na página seguinte

Resultados

continuação

Espécie vegetal	Concentração (µg/mL)	ΔQL para IME (mV)¹	ΔQL para ICE (valor da integral)²	Redução na integral (%)	valor-P³
<i>Strychnos pseudoquina</i>	100	65,1	$2,50 \times 10^5 \pm 21491$	0	> 0,05
	50	65,2	$2,50 \times 10^5 \pm 17907$	0	> 0,05
	5	65,2	$2,33 \times 10^5 \pm 16466$	4	> 0,05
	controle	67,8	$2,43 \times 10^5 \pm 17202$	-	-

¹Valor apresentado como média; ²Valor apresentado como média ± desvio padrão; ³Obtido através da comparação da ICE do controle e ICE obtida nos ensaios realizados na presença de diferentes concentrações dos extratos MeOH; *Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)

Tabela 14 - Variação da quimiluminescência (ΔQL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) dos sistemas LPMNs/lumino/*H. pylori* (controle) e LPMNs/lumino/*H. pylori* com diferentes concentrações de frações

Espécie vegetal (fração)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	ΔQL para IME (mV) ¹	ΔQL para ICE (valor da integral) ²	Redução na integral (%)	valor-P ³
<i>Byrsonima crassa</i> (aquosa)	100 50	45,9 33,6	$0,24 \times 10^5 \pm 1674$ $0,21 \times 10^5 \pm 1451$	91,7 92,7	< 0,05* < 0,05*
	5 controle	65,3 66,4	$2,69 \times 10^5 \pm 19010$ $2,88 \times 10^5 \pm 20382$	6,6 -	> 0,05 -
<i>Byrsonima crassa</i> (AcOEt)	100 50	24,7 24,6	$0,47 \times 10^5 \pm 2985$ $0,66 \times 10^5 \pm 4195$	83,5 76,8	< 0,05* < 0,05*
	5 controle	67,6 66,4	$2,72 \times 10^5 \pm 17338$ $2,84 \times 10^5 \pm 18054$	4,2 -	> 0,05 -
<i>Guapira noxia</i> (flavonoídica)	100 50	22,6 35,2	$0,90 \times 10^5 \pm 2559$ $1,48 \times 10^5 \pm 4199$	65,1 42,6	< 0,05* < 0,05*
	5 controle	53,0 65,0	$2,20 \times 10^5 \pm 6225$ $2,58 \times 10^5 \pm 7289$	14,7 -	< 0,05* -
<i>Guapira noxia</i> (saponinas)	100 50	35,4 47,3	$1,57 \times 10^5 \pm 5550$ $1,86 \times 10^5 \pm 6562$	34,9 22,8	< 0,05* < 0,05*
	5 controle	53,7 55,8	$2,38 \times 10^5 \pm 8401$ $2,41 \times 10^5 \pm 8528$	1,2 -	> 0,05 -

continua na página seguinte

Resultados

continuação

Espécie vegetal (fração)	Concentração (µg/mL)	ΔQL para IME (mV) ¹	ΔQL para ICE (valor da integral) ²	Redução na integral (%)	valor-P ³
<i>Strychnos pseudoquina</i> (alcaloídica)	100 50 5 controle	52,6 49,9 59,0 55,8	1,82 x 10 ⁵ ± 9028 1,86 x 10 ⁵ ± 9197 2,32 x 10 ⁵ ± 13159 2,24 x 10 ⁵ ± 11082	18,7 16,9 0 -	> 0,05 (0,054) > 0,05 (0,06) > 0,05 -
<i>Strychnos pseudoquina</i> (intermediária)	100 50 5 controle	30,5 28,1 60,4 62,1	1,10 x 10 ⁵ ± 3087 1,26 x 10 ⁵ ± 3576 2,45 x 10 ⁵ ± 6936 2,45 x 10 ⁵ ± 6928	55,1 48,6 0 -	< 0,05* < 0,05* > 0,05 -
<i>Strychnos pseudoquina</i> (flavonoídica)	100 50 5 controle	22,6 29,3 29,3 62,0	0,94 x 10 ⁵ ± 2659 1,02 x 10 ⁵ ± 2879 1,18 x 10 ⁵ ± 3332 2,45 x 10 ⁵ ± 6929	61,6 58,4 51,8 -	< 0,05* < 0,05* < 0,05* -

¹Valor apresentado como média; ²Valor apresentado como média ± desvio padrão; ³Obtido através da comparação da ICE do controle e ICE obtida nos ensaios realizados na presença de diferentes concentrações das frações; *Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)

Tabela 15 - Variação da quimiluminescência (ΔQL) para intensidade máxima de emissão (IME) e integral da cinética de emissão (ICE) dos sistemas LPMNs/lumino/*H. pylori* (controle) e LPMNs/lumino/*H. pylori* com diferentes concentrações de compostos fenólicos

Substância	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	ΔQL para IME (mV) ¹	ΔQL para ICE (valor da integral) ²	Redução na integral (%)	valor-P ³
Amentoflavona	100	37,2	$1,13 \times 10^5 \pm 2407$	56,2	< 0,05*
	50	41,8	$1,76 \times 10^5 \pm 3760$	31,8	< 0,05*
	5	52,7	$2,15 \times 10^5 \pm 4355$	16,7	< 0,05*
	1	64,1	$2,44 \times 10^5 \pm 5173$	5,4	> 0,05
	controle	70,3	$2,58 \times 10^5 \pm 5482$	-	-
(+) -catequina	100	23,8	$0,05 \times 10^5 \pm 70$	97,8	< 0,05*
	50	35,4	$0,10 \times 10^5 \pm 146$	95,5	< 0,05*
	5	44,3	$1,6 \times 10^5 \pm 2297$	28,3	< 0,05*
	1	53,5	$2,37 \times 10^5 \pm 5173$	0	> 0,05
	controle	58,3	$2,23 \times 10^5 \pm 3363$	-	-
Galato de metila	100	39,3	$0,16 \times 10^5 \pm 455$	94,2	< 0,05*
	50	35,8	$0,15 \times 10^5 \pm 423$	94,5	< 0,05*
	5	37,9	$0,74 \times 10^5 \pm 2094$	73,1	< 0,05*
	1	59,3	$2,62 \times 10^5 \pm 7404$	4,7	> 0,05
	controle	63,9	$2,75 \times 10^5 \pm 7764$	-	-

continua na página seguinte

Resultados

continuação

Espécie vegetal	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$\Delta\text{QL para IME}$ (mV) ¹	$\Delta\text{QL para ICE}$ (valor da integral) ²	Redução na integral (%)	valor-P ³
Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo	100	28,4	$0,87 \times 10^5 \pm 1852$	63,0	< 0,05*
	50	31,9	$1,36 \times 10^5 \pm 2893$	42,1	< 0,05*
	5	52,7	$2,14 \times 10^5 \pm 4355$	8,9	< 0,05*
	1	64,1	$2,43 \times 10^5 \pm 5173$	0	> 0,05
	controle	63,9	$2,35 \times 10^5 \pm 4984$	-	-
Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	100	31,3	$0,95 \times 10^5 \pm 1852$	59,6	< 0,05*
	50	35,2	$1,50 \times 10^5 \pm 2893$	36,2	< 0,05*
	5	53,8	$2,18 \times 10^5 \pm 4355$	7,2	> 0,05
	1	65,4	$2,47 \times 10^5 \pm 5173$	0	> 0,05
	controle	63,9	$2,35 \times 10^5 \pm 4984$	-	-
Quercetina	100	36,1	$0,13 \times 10^5 \pm 499$	94,8	< 0,05*
	50	38,1	$0,15 \times 10^5 \pm 578$	94,0	< 0,05*
	5	38,3	$0,18 \times 10^5 \pm 1101$	92,7	< 0,05*
	1	36,9	$1,11 \times 10^5 \pm 3211$	55,2	< 0,05*
	controle	55,2	$2,48 \times 10^5 \pm 5987$	-	-

¹Valor apresentado como média \pm desvio padrão; ²Obtido através da comparação da ICE do controle e ICE obtida nos ensaios realizados na presença de diferentes concentrações de compostos fenólicos; ³Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Tabela 16 - Redução do radical DPPH e redução no valor da ICE por extratos MeOH de diferentes espécies vegetais

Espécie vegetal	Redução DPPH (%)			Redução integral (%)		
	Concentrações (µg/mL)					
	5	50	100	5	50	100
<i>Alchornea glandulosa</i>	28,5	80,1	83,8	21,6*	81,6*	82,4*
<i>Alchornea triplinervia</i>	46,0	76,9	78,5	28,6*	88,9*	90,2*
<i>Anacardium humile</i>	59,4	73,7	73,7	9,1	90,5*	95,0*
<i>Byrsonima basiloba</i>	22,6	73,2	74,6	0	89,7*	93,4*
<i>Byrsonima crassa</i>	61,9	85,9	86,2	30,5*	93,0*	96,8*
<i>Byrsonima intermedia</i>	27,0	77,7	78,0	14,6	60,1*	74,1*
<i>Davilla elliptica</i>	36,0	77,0	77,8	6,0	90,3*	94,6*
<i>Guapira noxia</i>	8,9	58,6	85,3	21,3*	28,8*	35,4*
<i>Mouriri pusa</i>	39,9	64,2	67,1	0	92,2*	93,0*
<i>Qualea grandiflora</i>	34,5	80,0	81,5	10,5	93,1*	93,6*
<i>Qualea multiflora</i>	50,9	78,6	80,7	47,3*	93,5*	95,0*
<i>Qualea parviflora</i>	53,0	78,8	81,2	48,0*	93,6*	95,0*
<i>Strychnos pseudoquina</i>	1,0	24,8	43,4	4,0	0	0

* Diferença estatisticamente significativa na redução da ICE ($p < 0,05$)

Tabela 17 - Redução do radical DPPH e redução no valor da ICE por diferentes frações

Espécie vegetal (fração)	Redução DPPH (%)			Redução integral (%)		
	Concentrações (µg/mL)					
	5	50	100	5	50	100
<i>Byrsonima crassa</i> (aquosa)	26,0	91,2	91,9	6,6	92,7*	91,7*
<i>Byrsonima crassa</i> (acetato de etila)	13,8	82,8	90,8	4,2	76,8*	83,5*
<i>Guapira noxia</i> (flavonóides)	11,1	91,7	93,2	14,7*	42,6*	65,1*
<i>Guapira noxia</i> (saponinas)	5,7	83,6	93,3	1,2	22,8*	34,9*
<i>Strychnos pseudoquina</i> (alcalóides)	4,8	11,4	14,2	0	16,9	18,7
<i>Strychnos pseudoquina</i> (intermediária)	2,4	5,0	10,6	0	48,6*	55,1*
<i>Strychnos pseudoquina</i> (flavonóides)	6,7	58,2	80,4	51,8*	58,4*	61,6*

* Diferença estatisticamente significativa na redução da ICE ($p < 0,05$)

Tabela 18 - Redução do radical DPPH e redução no valor da ICE por compostos fenólicos

Composto fenólico	Redução DPPH (%)			Redução integral (%)		
	Concentrações (µg/mL)					
	5	50	100	5	50	100
Amento flavona	36,4	95,7	95,6	16,3*	31,8*	56,6*
(+)-catequina	93,6	94,7	94,0	28,3*	95,5*	97,8*
Galato de metila	95,1	97,1	96,9	73,1*	94,5*	94,2*
Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo	40,8	96,1	96,0	8,9*	42,1*	63,0*
Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo	38,3	96,9	93,4	7,2	36,2*	59,6*
Quercetina (controle)	94,6	0	97,0	92,7*	94,0*	94,8*

* Diferença estatisticamente significativa na redução da ICE ($p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

A utilização de plantas, no tratamento, cura ou mesmo na prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Apesar da grande evolução da medicina alopática, a partir da segunda metade do século XX, ainda existem obstáculos básicos na utilização dessa terapia, principalmente, por populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento médico à aquisição de medicamentos (VEIGA Jr et al., 2005). Agregar conhecimentos científicos ao uso popular das plantas traz grandes vantagens, principalmente, em países cuja maioria da população é de baixo poder econômico.

Estudos multidisciplinares tornam-se, cada vez mais importantes, para uma abordagem terapêutica das plantas empregadas na medicina popular. As plantas utilizadas tradicionalmente podem ser fontes potenciais de novas substâncias ativas, no entanto, muitas espécies podem apresentar atividade citotóxica e genotóxica capazes, até mesmo, de induzir o desenvolvimento de câncer (AMES, 1983; AMES; GOLD, 1990; VARANDA, 2006). Ensaio de citotoxicidade basal *in vitro* são os primeiros testes utilizados para avaliar a potencialidade de novos compostos para aplicação terapêutica e vêm sendo empregados como adjuvante dos testes *in vivo*, possibilitando a redução no número de animais utilizados na avaliação da toxicidade aguda de substâncias e preparações (VALADARES, 2006; VIEIRA; VALADARES, 2008). Esse trabalho avaliou o potencial citotóxico de espécies vegetais brasileiras, empregadas pela população no tratamento de doenças, especialmente àquelas associadas ao trato gastrointestinal, através da técnica de captação do corante vital vermelho neutro recomendada pelo Comitê de Coordenação Interagências para Validação de Métodos Alternativos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM) (CASTAÑO; GÓMEZ-LECHÓN, 2005; VALADARES, 2006).

Com exceção de *G. noxia*, a citotoxicidade dos extratos MeOH (polares) foi equivalente ou menor a observada para os extratos DCM e CHCl₃ (apolares). Lee et al. (2008) demonstraram o potencial citotóxico do ácido ursólico, triterpeno pentacíclico, sobre diversas

linhagens de células tumorais. Akihisa et al. (2006) atribuíram a citotoxicidade do extrato de folhas de *Perilla frutescens* var. *japonica* às altas concentrações de ácido oleanóico e ursólico (compostos triterpênicos) presentes na preparação. A presença de triterpenos nos extratos apolares, na maioria das espécies vegetais avaliadas, poderia justificar a maior citotoxicidade dessas preparações em relação aos extratos polares (Tabelas 19 e 20, apresentadas ao final discussão).

Os compostos triterpênicos, em decorrência da característica estrutural, podem interagir com componentes celulares, especialmente esteróis, promovendo perturbações na permeabilidade seletiva da membrana plasmática (ANISIMOV, 1987; CHEN et al., 2001; TURINA; PERILLO, 2003). Apesar do potencial citotóxico desses compostos ser relatado, a mistura α -amirina e β -amirina apresentou baixa citotoxicidade ($IC_{50} = 292 \mu\text{g/mL}$) para a linhagem celular empregada nesse estudo.

Os maiores IC_{50} foram obtidos para os extratos polares de *B. basiloba* ($366 \mu\text{g/mL}$), *B. intermedia* ($IC_{50} = 340 \mu\text{g/mL}$) e *S. pseudoquina* ($IC_{50} = 375 \mu\text{g/mL}$), indicando serem os menos citotóxicos, nos quais a presença de triterpenos não é descrita (Tabela 20). A presença de alantoína e de um ciclitol relatada, exclusivamente, em *G. noxia* (Tabela 20) poderia ser responsável pela maior citotoxicidade do extrato MeOH dessa espécie ($IC_{50} = 239 \mu\text{g/mL}$), entretanto, não verificamos na literatura estudos que atribuam potencial citotóxico a esses compostos.

É reconhecido que extratos, infusões e outras preparações obtidas de plantas proporcionam uma mistura complexa de diferentes substâncias químicas, as quais podem atuar sinérgica ou antagonicamente na indução da citotoxicidade e de outras atividades biológicas (STERMITZ et al., 2000; SAVELEV et al., 2003; CHUNG et al., 2004; SERAFIN et al., 2007; HUANG et al., 2008). Assim, alguns compostos fenólicos foram avaliados isoladamente quanto à citotoxicidade basal. A quercetina ($IC_{50} = 94,5 \mu\text{g/mL}$) e a (+)-

catequina ($IC_{50} = 164 \mu\text{g/mL}$) apresentaram maior potencial citotóxico em relação ao galato de metila ($IC_{50} = 297 \mu\text{g/mL}$), amentoflavona ($IC_{50} = 366 \mu\text{g/mL}$) e formas glicosídicas da quercetina ($IC_{50s} > 500 \mu\text{g/mL}$). Análises cromatográficas demonstram a presença predominante de flavonóides e catequinas na fração AcOEt ($IC_{50} = 308 \mu\text{g/mL}$) e de taninos na fração aquosa ($IC_{50} = 413 \mu\text{g/mL}$) de *B. crassa*, que poderia justificar a diferença de toxicidade observada para essas frações (SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a; CARDOSO et al., 2006).

O gênero *Strychnos* é conhecido por apresentar substâncias tóxicas, especialmente alcalóides, entretanto investigações fitoquímicas realizadas com várias espécies pertencentes a esse gênero demonstram uma grande diversidade estrutural desses compostos com efeitos biológicos variados (RASOANAIVO et al., 1996; PHILIPPE et al., 2004; SILVA et al., 2005). A fração enriquecida de alcalóides obtida de *S. pseudoquina* demonstrou baixa citotoxicidade ($IC_{50} = 413 \mu\text{g/mL}$) no teste realizado *in vitro*. Estudo *in vivo*, utilizando essa mesma fração, demonstrou ausência de sinais e sintomas de toxicidade aguda em ratos (Da SILVA et al., 2005).

A relação estrutura - atividade citotóxica de compostos polifenólicos, é relatada, principalmente para flavonóides, incluindo ensaios utilizando diferentes linhagens tumorais. Chang et al. (2007, 2008) demonstraram que a citotoxicidade desses compostos pode estar relacionada à presença de 2,3-dupla ligação no anel heterocíclico (anel C), *orto*-hidroxilação no anel B e o número de hidroxilas na estrutura. A substituição da hidroxila na posição C3 e a presença de glicosídeo no anel C, como na quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo e quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, confirmam a diminuição da citotoxicidade desses compostos em relação à aglicona. A Figura 6 apresenta a estrutura geral dos flavonóis e as diferenças estruturais entre a quercetina e os dois derivados glicosilados avaliados.

Publicação recente atribui o potencial citotóxico de diferentes extratos de raízes e folhas de *Euterpe precatoria* (açazeiro) à presença de quercetina e catequina nessas preparações, sendo a maior citotoxicidade relatada para o extrato contendo o flavonol (GALOTTA et al., 2008). A diferença do IC₅₀ da quercetina em relação à (+)-catequina pode contribuir para maior ou menor toxicidade dos extratos polares, visto que ambos compostos podem estar presentes nessas preparações.

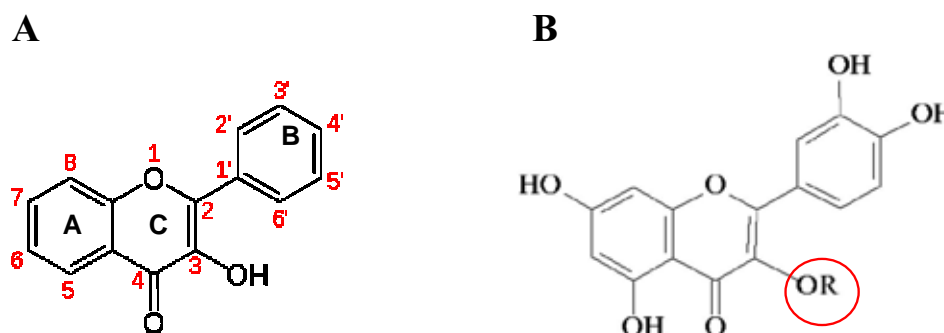


Figura 6 – (A) Estrutura geral dos flavonóis; (B) quercetina ($R = H$), quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo ($R = \alpha$ -L-arabinopiranosídeo) e quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo ($R = \beta$ -D-galactopiranosídeo)

A grande variedade de metabólitos secundários derivados de plantas tem despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência, e, principalmente, das indústrias farmacêuticas, que vêem neles uma fonte de moléculas úteis para a clínica médica (SIMÕES et al., 2003). A busca de compostos de origem vegetal com atividade antimicrobiana tem sido o principal objetivo de muitos grupos de pesquisa, pois, apesar do grande arsenal terapêutico disponível no mercado, o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos tem

crescido de maneira assustadora (SOARES, 2001; YUNES; CALIXTO, 2001; AQIL et al., 2005; CORREIA et al., 2008).

A descoberta do *H. pylori*, na década de oitenta, pelos pesquisadores australianos Robin Warren e Barry Marshall, teve consequência direta nos esquemas de tratamento das doenças gástricas, através da introdução da terapia antimicrobiana (SUERBAUM; JOSENHANS, 2007). No entanto, nos últimos anos, com o aumento do número de cepas de *H. pylori* resistente aos antimicrobianos, comumente empregados nas terapias de erradicação, pesquisas têm buscado em fontes naturais, especialmente em espécies vegetais, novos compostos ativos (GERRITS et al., 2006; STEGE et al., 2006; NDIP et al., 2007; SELGRAD; MALFERTHEINER, 2008).

Em decorrência da relação entre os distúrbios gástricos e a bactéria *H. pylori*, associado ao uso popular de plantas no tratamento de úlceras e gastrites, foi avaliada a atividade anti-*H. pylori* de extratos, frações e substâncias obtidas das espécies propostas. No Brasil, poucos são os relatos da atividade de produtos naturais para *H. pylori*, principalmente em decorrência das dificuldades de cultivo dessa bactéria e de testes padronizados que utilizam baixas quantidades de uma substância ou preparação.

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado microrganismo. A atividade anti-*H. pylori* dos extratos, frações e substâncias foi quantificada por técnica de microdiluição em caldo, previamente padronizada (APÊNDICE B). A CMI de 1024 µg/mL foi definida apenas para os extratos MeOH e CHCl₃ de *B. crassa* e CHCl₃ de *D. elliptica*, para as demais preparações e substâncias não foi possível estabelecer a CMI na maior concentração avaliada.

Alguns trabalhos demonstram a atividade antibacteriana de terpenóides (BARRE et al., 1997; FONTANAY et al., 2008; HIGUCHI et al., 2008), cujo mecanismo de ação ainda

não é totalmente compreendido, mas que possivelmente envolva interação com componentes lipofílicos e alteração na permeabilidade seletiva de membranas celulares microbianas (COWAN, 1999; HARAGUCHI et al., 1999; MALLAVADHANI et al., 2004). Gadhi et al. (2001) atribuíram atividade anti-*H. pylori* da fração CHCl₃ de *Aristolochia paucinervis* aos ácidos graxos e terpenos. Shikov et al. (2008) também associaram a atividade antibacteriana de extrato oleoso obtido de flores de *Chamomilla recutita* a ácidos graxos, cumarinas e terpenos. A presença de terpenos reportada nos extratos MeOH e CHCl₃ de *B. crassa* e CHCl₃ de *D. elliptica* poderia justificar a CMI (1024 µg/mL), entretanto esses compostos também são descritos em outros extratos para os quais não foi possível definir a CMI nessa mesma concentração (Tabelas 19 e 20).

Análise fitoquímica do extrato MeOH de *B. crassa* (Tabela 20) demonstra, além de terpenos, a presença de diferentes compostos fenólicos (ácido gálico e derivados) e polifenólicos (flavonóides, catequinas e taninos). Mabe et al. (1999) evidenciaram o efeito inibidor de catequinas, como (-)-epicatequina galato e (-)-epigallocatequina galato, no crescimento de diferentes cepas de *H. pylori*. Outros trabalhos descrevem o potencial anti-*H. pylori* de diferentes flavonóides e de diversos compostos polifenólicos (FUKAI et al., 2002; SHIN et al., 2005). Ustun et al. (2006) verificaram o efeito inibidor de alguns flavonóides, como quercetina 3-metil éter, quercetina 3,7-dimetil éter e kaempferol 3,7-dimetil éter, isolados de folhas *Cistus laurifolius*, no crescimento de uma cepa padrão de *H. pylori* (NCTC 11637). Funatogawa et al. (2004) demonstraram a atividade anti-*H. pylori* de alguns taninos hidrolisáveis. A CMI do extrato MeOH de *B. crassa* para *H. pylori* pode estar relacionada não somente às classes de compostos, mas também ao perfil quantitativo das diferentes substâncias presentes nessa preparação, visto que vários constituintes também são relatados nos extratos polares de outras espécies vegetais que não apresentaram essa mesma atividade.

Apesar da CMI ser definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade, a relação concentração e inibição de crescimento é demonstrada como sendo aplicável na triagem do potencial antimicrobiano de extratos e outras preparações vegetais (TABAK et al., 1999; CHATTERJEE et al., 2004; VELURI et al., 2004; CASTILLO-JUÁREZ et al., 2007). Na concentração de 1024 µg/mL, os extratos CHCl₃ e MeOH de *B. intermedia* e CHCl₃ de *A. glandulosa* inibiram em 87,1%, 50,0% e 69,7%, respectivamente, o crescimento do *H. pylori*, demonstrando que os resultados obtidos com essas espécies vegetais, além da *B. crassa* e *D. elliptica*, corroboram com o seu uso popular em distúrbios gástricos que, geralmente, estão associados a colonização por essa bactéria.

Com o objetivo de verificar quais possíveis classes de compostos que poderiam apresentar efeito anti-*H. pylori*, frações foram avaliadas quanto a capacidade de inibir o crescimento dessa bactéria. A baixa atividade observada para a fração aquosa e AcOEt de *B. crassa* não possibilitou inferir somente aos taninos, catequinas e flavonóides o potencial antimicrobiano demonstrado para o extrato MeOH.

Estudos têm demonstrado correlação entre presença de compostos fenólicos, especialmente flavonóides, e atividade anti-*H. pylori* em diferentes espécies vegetais (FUKAI et al., 2002; USTUN et al., 2006). Quercetina e os cinco compostos fenólicos isolados do extrato MeOH de *B. crassa* também foram avaliados quanto a capacidade de inibir o crescimento de *H. pylori*, todavia apresentaram menor atividade antimicrobiana (quercetina > amentoflavona > quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo > (+)-catequina > quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo > galato de metila) que a obtida para o extrato MeOH. Esses resultados apontam para um possível sinergismo entre compostos presentes nesse extrato. Em estudo recente, Lai et al. (2008) demonstraram melhor atividade anti-*H. pylori* de extratos MeOH e CHCl₃ de *Phyllanthus urinaria* (quebra pedras) em relação a oito compostos fenólicos

isolados da mesma planta. Vários trabalhos apontam o efeito sinérgico de compostos presentes em preparações vegetais e também quando associados a antibióticos quanto a atividade antimicrobiana (STERMITZ et al., 2000; LIN et al., 2005; SERAFIN et al., 2007; HEMAISWARY et al., 2008).

Porinas são proteínas transmembranares, presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas, responsáveis pela difusão de íons e de moléculas de baixo peso molecular, que participam do processo de nutrição microbiana. Os canais internos das porinas podem apresentar diâmetros variados e distribuição de cargas positivas e negativas, decorrente da presença de aminoácidos carregados, os quais geram um campo eletrostático, podendo dificultar a passagem de algumas substâncias (HANCOCK, 1987; ALVAREZ et al., 2008). Por exemplo, em relação aos antibióticos, porinas seletivas para cátions favorecem a passagem de β -lactâmicos através da membrana externa em *Escherichia coli*, enquanto que as seletivas para ânions fazem o inverso (NIKAIDO et al., 1983).

Em recente trabalho, Alvarez et al. (2008) reportaram que a quercetina poderia neutralizar aminoácidos carregados presentes nos canais das porinas, facilitando a entrada de outros flavonóides na célula bacteriana. Arima et al. (2002) demonstraram o efeito sinérgico de combinações quercetina-quercitrina, quercetina-morina e quercetina-rutina, as quais foram mais ativas contra *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis* que os compostos isoladamente.

A literatura relata que a baixa atividade antimicrobiana demonstrada por alguns extratos *in vitro* não implica, necessariamente, na incapacidade de atividade *in vivo* (NDIP et al., 2007). Bever (1983) e Garcia et al. (2003) demonstraram que o potencial imunomodulador de compostos e preparações vegetais, com baixa atividade antimicrobiana *in vitro*, pode contribuir para a destruição de agentes infecciosos.

Nos últimos anos, vários estudos associam o *stress* oxidativo ao desenvolvimento ou agravamento de diversas afecções, incluindo desordens gástricas, doenças reumáticas,

cardiovasculares e neurodegenerativas (OHSHIMA et al., 2003; SHIMOYAMA et al., 2003; EFRAIM et al., 2006; AUGUSTO et al., 2007). A produção excessiva de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), associada a liberação de enzimas granulares por células do sistema imunológico, causam danos fisiológicos importantes às células, agravando o processo inflamatório (PARIJ et al., 1998; Di STASI et al., 2004).

Embora os mecanismos envolvidos na inflamação gástrica induzida pelo *H. pylori* ainda não estejam completamente esclarecidos, o papel dos LPMNs e de EROs na patogênese de doenças associadas a essa bactéria é amplamente reportado (SHIMOYAMA et al., 2003; KIM, 2005; ATHERTON, 2006; WANG et al., 2008). Nos estágios iniciais da colonização, um grande número de LPMNs migra para o sítio da infecção no lúmen gástrico, cuja presença é mantida durante a fase crônica da doença, não garantindo, porém, a eliminação do *H. pylori* (KEENAN et al., 2005). Algumas citocinas, como a interleucina-8 (IL-8), liberadas por mononucleares, especialmente macrófagos, e proteínas expressas pelo próprio *H. pylori* parecem ser importantes para manutenção do intenso infiltrado neutrofilico na mucosa gástrica (ERNEST; GOLD, 2000; AUGUSTO et al., 2007; SHIH et al., 2007).

O *burst* oxidativo de fagócitos pode ser ativado por um grande número de moléculas biológicas, incluindo a HP-NAP (*H. pylori* neutrophil-activating protein), gerando uma variedade de EROs (SATIN et al., 2000; SHIMOYAMA et al., 2003; WANG et al., 2008). Independente da natureza, o estímulo leva a ativação da proteína quinase C, que fosforila o complexo enzimático NADPH oxidase. O complexo NADPH oxidase catalisa a transferência de elétrons de NADPH para o oxigênio molecular (O_2), gerando $O_2^{\bullet-}$ que serve como material inicial para a produção de uma vasta seleção de oxidantes reativos. A maior parte do $O_2^{\bullet-}$, em meio aquoso, é convertida em H_2O_2 e O_2 , por dismutação espontânea ou pela ação da superóxido dismutase (SOD), podendo ainda reagir com óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito (ONOO⁻). A mieloperoxidase (MPO), liberada a partir de grânulos azurófilos

dos LPMNs, na presença de H_2O_2 catalisa a oxidação de cloreto (Cl^-) com geração do $HOCl$, potente agente bactericida (HAMPTON et al., 1998; BABIOR, 2000; BERGT et al., 2001; BARREIROS et al., 2006). A Figura 7 apresenta, esquematicamente, as possíveis reações geradoras de EROs e ERNs em fagócitos ativados.

O $HOCl$ ainda pode dar origem a outras moléculas citotóxicas, como monocloraminas (NH_2Cl , $R-NHCl$), após reação com amônia, gerada à partir da metabolização da uréia pela enzima urease de *H. pylori* (ABE et al., 2000; AUGUSTO et al., 2007). A severidade das lesões, aumento do risco de apoptose celular e lesão do DNA na mucosa gástrica parecem estar relacionados com a intensidade do *stress* oxidativo mediado por EROs (MIZUKI et al., 2000; SMOOT et al., 2000; BAGGHI et al., 2002; DING et al., 2007). Assim, a incorporação de drogas ou preparações antioxidantes na terapia de erradicação do *H. pylori* pode diminuir o *stress* oxidativo e níveis de citocinas, bem como favorecer a eliminação da bactéria (DUNN et al., 1997; HAHM et al., 1998a,b; LEE et al., 2008; YANG; CHIEN, 2009).

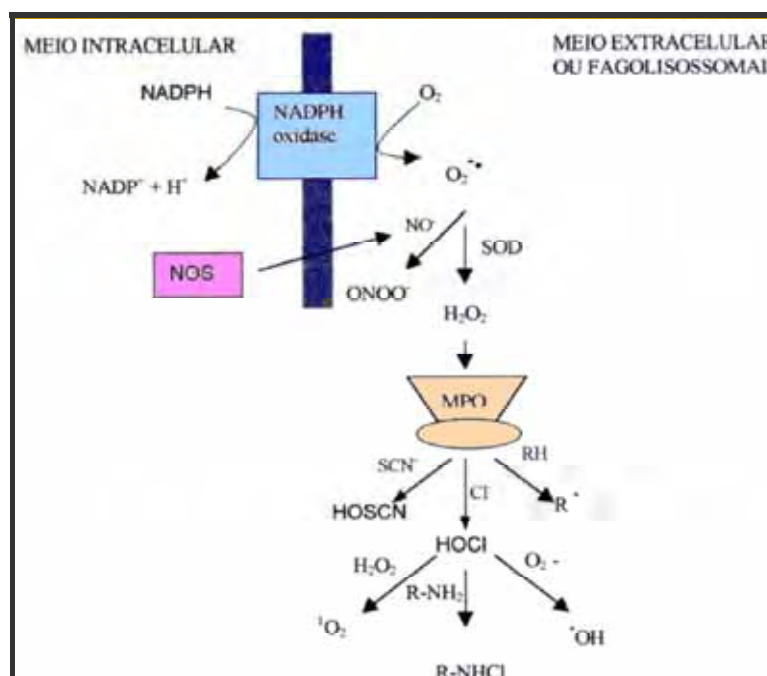


Figura 7 - Geração de espécies reativas durante o *burst* oxidativo de fagócitos

(Adaptado de HAMPTON et al., 1998)

Vários estudos associam o efeito gastroprotetor de extratos e substâncias isoladas de espécies vegetais com a atividade antioxidante (GULCIN et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a; ZAYACHKIVSKA et al., 2005; UMAMAHESWARI et al. 2007). Nesse trabalho comparamos o potencial antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas por técnica *in vitro* e *ex-vivo*, quanto a capacidade sequestradora de radical livre (DPPH) e moduladora do *burst* oxidativo de LPMNs estimulados com *H. pylori*.

Apesar de não ser gerado *in vivo*, o radical DPPH, devido a sua relativa estabilidade, tem sido amplamente utilizado na triagem do potencial antioxidante de extratos e compostos isolados de plantas (PÉREZ et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que maior atividade sequestradora do radical DPPH foi obtida para os extratos MeOH e, dentre as frações, para a aquosa e AcOEt de *B. crassa* e enriquecida de flavonóides de *G. noxia*. Compostos fenólicos, como flavonóides, taninos, ácidos fenólicos e derivados, são reconhecidos pelo potencial antioxidante, estando normalmente presentes em maiores concentrações em preparações polares (FUKUDA et al., 2003; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; LIMA et al., 2006; CONFORTI et al., 2008). A presença predominante de flavonóides e catequinas na fração AcOEt e de taninos na fração aquosa de *B. crassa* justifica o potencial antioxidante dessas frações (SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a; CARDOSO et al., 2006).

Com exceção do extrato MeOH de *G. noxia* ($CE_{50} = 40 \mu\text{g/mL}$) e *S. pseudoquina* ($CE_{50} = 113,2$), os demais apresentaram valor de $CE_{50} \leq 14,2 \mu\text{g/mL}$, resultados que, possivelmente, estejam relacionados às classes e quantidade de compostos fenólicos presentes nesses extratos. Pesquisas demonstram a atividade antioxidante, normalmente, para flavonóides e ácidos fenólicos, entretanto alguns trabalhos têm reportado esse potencial para outros compostos fenólicos como, por exemplo, taninos (FENGLIN et al., 2004; SIDDHURAJU; MANIAN, 2007). Siddhuraju et al. (2002) demonstraram que as altas

concentrações de taninos, em preparações de cascas de caule de *Cassia fistula*, conferiam a essas preparações elevada capacidade sequestradora do radical DPPH. A presença de taninos não é relatada no extrato MeOH de *G. noxia* e *S. pseudoquina* (Tabela 20), os quais demonstraram os maiores valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, menor potencial de redução do radical DPPH.

As espécies pertencentes ao gênero *Strychnos* são conhecidas por apresentarem grande quantidade de alcalóides. A fração alcaloídica de *S. pseudoquina* apresentou baixa capacidade sequestradora do radical DPPH, demonstrando que a atividade obtida com o seu extrato MeOH seja, possivelmente, decorrente dos flavonóides e não dos alcalóides presentes nessa preparação. Baseando-se no mecanismo de redução do radical DPPH, é possível inferir que os extratos polares possuam maior quantidade e/ou diversidade de substâncias capazes de doar hidrogênio a esse radical.

A atividade antioxidante de compostos químicos está relacionada à capacidade de doar elétrons, gerando produtos menos reativos. Barreiros et al. (2006) relatam que a propriedade antioxidante de flavonóides está associada à estabilidade do radical flavanoil formado após a reação com o agente oxidante, sendo essa estabilidade dependente da capacidade do flavonóide em deslocar ou estabilizar o elétron desemparelhado.

Os compostos fenólicos obtidos a partir do extrato MeOH de *B. crassa*, especialmente (+)-catequina e galato de metila, apresentaram potencial antioxidante comparável ao da quercetina e trolox, empregados como padrões nos ensaios com o DPPH. Para os compostos fenólicos, na menor concentração avaliada (5 µg/mL), a ordem de capacidade sequestradora do radical DPPH foi: galato de metila > quercetina > (+)-catequina > quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo > quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo > amentoflavona, sendo pouca a diferença desse potencial para os três primeiros compostos.

Flavonóides, ácidos fenólicos e derivados (galato de metila, de etila, de propila e outros galato-ésteres) são as principais classes de compostos fenólicos distribuídas nas espécies vegetais (NENADIS et al., 2004). A atividade antioxidante desses compostos deve-se, principalmente, à sua característica estrutural, que desempenha um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e de outros compostos oxidantes, como também na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como de propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Em geral, o sequestro de radicais livres e atividade antioxidante dos compostos polifenólicos, como flavonóides, depende principalmente do número e posição das hidroxilas nos anéis aromáticos (A e B), um grupo 3'4'-catecol (duas hidroxilas em posições vizinhas) no anel B e uma hidroxila na posição C3 do anel heterocíclico (Figura 6) (LU; FOO, 2000; HEIM et al., 2002; LUIS et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2008). A presença de hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A é, normalmente, de menor importância. A glicosilação na posição C3 do anel heterocíclico e a ausência de uma dupla ligação na posição 2,3 conjugada a um oxo-carbono na posição 4 parecem reduzir o potencial antioxidante dos flavonóides (HEIM et al., 2002; CAI et al., 2004; MAMEDE; PASTORE, 2004; OLIVEIRA et al., 2007).

Vários estudos têm demonstrado que agliconas são mais potentes antioxidantes que seus correspondentes glicosilados (GAO et al., 1999; HEIM et al., 2002; CAI et al., 2004). Analisando os valores de CE_{50} verificamos que a quercetina apresentou melhor atividade sequestradora do radical DPPH que seus derivados glicosilados (quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo), sendo esses resultados concordantes com a literatura.

Alguns trabalhos citam o potencial antioxidante do ácido gálico e seus derivados (KIKUZAKI et al., 2002; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; MIHARA et al., 2005). O galato de metila tem-se revelado um eficaz antioxidante em uma variedade de experimentos

acelulares (HSIEH et al., 2004). Moléculas menores parecem proporcionar maior acessibilidade ao radical DPPH, em decorrência de um menor impedimento estérico (MAGALHÃES et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que o galato de metila apresenta alta capacidade redutora do radical DPPH. A menor atividade antioxidante da amentoflavona quando comparada a quercetina, (+)-catequina e ácido gálico é consistente com outros estudos (BAGGETT, et al., 2005; HYUN et al., 2006).

Os extratos MeOH, por demonstrarem melhor potencial antioxidante pela técnica do DPPH, frações e compostos fenólicos foram avaliados quanto a capacidade de reduzirem ou inibirem o *burst* oxidativo gerado em LPMNs quando ativados por *H. pylori*. Nas maiores concentrações avaliadas (50 e 100 µg/mL), com exceção de *G. noxia* e *S. pseudoquina*, os extratos reduziram fortemente o *burst* oxidativo, resultados compatíveis aos observados no ensaio *in vitro*. No entanto, na menor concentração testada (5 µg/mL), os extratos de *A. humile*, *A. triplinervia*, *B. basiloba*, *B. crassa*, *D. elliptica*, *M. pusa* e *Q. grandiflora* demonstraram maior capacidade de sequestrar o radical DPPH que reduzirem o *burst* oxidativo de fagócitos (Tabela 16, apresentada nos resultados). É necessário enfatizar que a redução do DPPH *in vitro* é uma única reação química, podendo não ter a mesma similaridade com as diversas reações que ocorrem em sistemas biológicos. Assim, substâncias presentes nos extratos atuam sequestrando/reduzindo EROs já formadas, como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2 , HOCl, e/ou inibindo a atividade de enzimas que participam da geração dessas espécies, como a NADPH oxidase e a MPO.

A literatura relata o efeito inibidor de compostos fenólicos sobre o metabolismo oxidativo e degranulação de LPMNs (KANASHIRO et al., 2004; KANASHIRO et al., 2007; SOUSA et al., 2007). Recentemente, Paula et al. (2009) demonstraram o efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *Tamarindus indica* na inibição da quimiluminescência dependente de luminol e lucigenina de LPMNs ativados, por diferentes estímulos (zymosan opsonizado,

PMA e fMLP), que foi relacionada a presença de alta concentração de flavonóides e outros polifenóis no extrato. Fernandes et al. (2004) atribuíram o potencial antioxidante do extrato aquoso de *Sutherlandia frutescens* a taninos e flavonóides na preparação. Os ensaios quimiluminescentes utilizando extratos de *G. noxia* e *S pseudoquina* demonstraram a baixa capacidade na redução do *burst* oxidativo de LPMNs por essas preparações, já as frações flavonoídicas dessas mesmas espécies vegetais e a fração aquosa (rica em taninos) e AcOEt (rica em flavonóides) de *B. crassa* apresentaram alta capacidade de reduzir o *burst*, especialmente, nas maiores concentrações testadas (Tabela 17, apresentada nos resultados). A presença de taninos em extratos MeOH, associada à flavonóides, pode contribuir com a potencial antioxidante dessas preparações.

O luminol pode ser oxidado por várias espécies reativas, incluindo o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , peroxinitrito, e, principalmente, pelo HOCl, o qual é gerado através do sistema MPO- H_2O_2 -Cl (ABE et al., 2000; COSTA et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2008). Assim, baseando-se no mecanismo de oxidação de luminol e no perfil da cinética de emissão de luz após a adição dos extratos e frações (APÊNDICE F), a redução no *burst* oxidativo de LPMNs, possivelmente, esteja relacionada a capacidade de compostos presentes nessas preparações em sequestrarem o HOCl ou outras EROs que oxidam o luminol. A baixa quimiluminescência, que é mantida após a adição da maioria dos extratos e frações, não descarta a possibilidade da inibição das enzimas NADPH oxidase e/ou MPO por compostos presentes nesses extratos e frações. Estudos têm demonstrado que flavonóides possuem a capacidade de inibir a atividade dessas enzimas (KROL et al., 1996; FRANCK et al., 2008; KOKO et al., 2008).

Os extratos de plantas frequentemente contêm mistura de compostos químicos com distintas atividades biológicas que, algumas vezes, podem atuar sinergicamente, como já relatado em diferentes trabalhos. Riemersma et al. (2001) demonstraram que polifenóis, mesmo em baixas concentrações, podem atuar inibindo a migração e a resposta inflamatória

mediada por neutrófilos. A seguir, Moreira et al. (2007), evidenciaram que alguns flavonóis são capazes de ativar e modular a resposta imunológica em fagócitos. Zheng e Wang (2001) destacaram a dificuldade de comparação da atividade antioxidante de extratos herbáceos, em consequência da diversidade e complexidade dessas misturas, principalmente, em decorrência da presença de compostos fenólicos. Em razão dessa complexidade química, possivelmente, a capacidade dos extratos MeOH de reduzir o *burst* oxidativo de LPMNs ativados por *H. pylori* seja consequência de diferenças qualitativas e quantitativas na composição das preparações.

Os ensaios de quimiluminescência realizados para os compostos fenólicos demonstram que a (+)-catequina, o galato de metila e a quercetina, nas maiores concentrações ensaiadas, reduziram em mais de 90% o *burst* de LPMNs quando ativados por *H. pylori* (Tabela 18, apresentada nos resultados). Entretanto, na menor concentração de 5 µg/mL, considerando o ensaio *ex-vivo*, a (+)-catequina apresentou menor potencial antioxidante que a quercetina e o galato de metila (Tabela 18). Como relatado, diferenças estruturais entre compostos fenólicos podem determinar a maior ou menor capacidade do composto sequestrar EROs (TALEB-CONTINI et al., 2006). Particularmente para quercetina, a habilidade de capturar EROs é decorrente do número de grupos hidroxil livres, da presença de hidroxila na posição C3 do anel C e da dupla ligação na posição C2-C3 (KROL et al., 1996; SELLOUM et al., 2004), conforme também descrita para reduzir o DPPH. A ausência da dupla ligação no anel heterocíclico da (+)-catequina talvez possa justificar a menor competência desse composto em reduzir/inibir o *burst* oxidativo quando comparada a quercetina.

O luminol é uma sonda quimiluminescente capaz de monitorar a produção e liberação de EROs no meio extra e intracelular (visto a sua capacidade de entrar na células), assim a permeabilidade da membrana dos LPMNs às diferentes substâncias deve ser considerada nesse tipo de ensaio. Em decorrência das características estruturais, a quercetina e o galato de metila foram, entre os compostos fenólicos, os que apresentam, possivelmente, maior

capacidade de capturarem as EROs no meio intracelular, justificando sua atividade antioxidante nos ensaios *ex vivo*.

É relatado que tanto a glicosilação de flavonóides como a ausência da 2,3-dupla ligação e do grupo 4-oxo no anel B dos flavanóis (catequinas), diminui a lipofilicidade desses compostos limitando suas concentrações intracelulares (WANG; JOSEPH, 1999; SPENCER et al, 2001; VUOTTO et al., 2003). Na concentração de 5 µg/mL, os ensaios quimiluminescentes demonstraram que a quercetina apresenta capacidade antioxidante superior aos flavonóides glicosídicos, amentoflavona e catequina (como mencionado), que pode ser justificada pela sua, relativa, maior hidrofobicidade. Nos ensaios *in vitro* de redução do DPPH, a quercetina e catequina demonstraram capacidade antioxidante equivalente em todas as concentrações avaliadas.

Tabela 19 - Substâncias descritas em extratos apolares de espécies vegetais do Cerrado brasileiro

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
N-alcanos													
triacontano				+									
dotriacontano				+									
Esteróides													
β-sitosterol	+	+							+	+		+	
Polisoprenóides													
Terpenos													
ácido ursólico	+	+	+	+	+		+			+	+	+	+
ácido oleanólico			+	+	+								
ácido betulínico			+	+	+							+	
ácido epi-betulínico													
α-amirina													+
β-amirina													+
α-amirinona													
betulina													
friedelina													
lupeol				+	+					+	+	+	+
lupenona										+	+	+	

¹Ag = *A. glandulosa* (CALVO, 2007); ²At = *A. triplinervia* (CALVO, 2007); ³Ah = *A. humile* (YASUNAKA et al., 2008); ⁴Bb = *B. basiloba* (LIRA et al., 2008); ⁵Bc = *B. crassa* (HIGUCHI et al., 2008; LEITE et al., 2008); ⁶Bi = *B. intermedia*; ⁷De = *D. elliptica* (MICHELIN et al., 2005; LOPES et al., 2007); ⁸Gn = *G. noxia*; ⁹Mp = *M. pusa* (ANDREO et al., 2006); ¹⁰Qg = *Q. grandiflora* (NASSER, 2007); ¹¹Qm = *Q. multiflora* (NASSER, 2007); ¹²Qp = *Q. parviflora* (NASSER, 2007); ¹³Sp = *S. pseudoquina* (da SILVA et al., 2005; SANTOS et al., 2006); (+) presença da substância no extrato; () substância não relatada no extrato

Tabela 20 – Substâncias descritas em extratos polares de espécies vegetais do Cerrado brasileiro

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bl ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
Ácidos fenólicos e derivados													
ácido gálico	+	+	+	+	+	+	+	+			+		
galato de metila	+	+	+	+	+	+	+						
galato de etila	+												
Ácido elágico e derivados													
Ácido 3,3'-di- <i>O</i> -metilélágico		+								+		+	
Ácido 3,3'-di- <i>O</i> -metilélágico-4- <i>O</i> -β-glicopiranosídeo										+	+		
Ácido 3- <i>O</i> -metilélágico-4'-ramnapirosídeo												+	
Ácido 3,3',4-tri- <i>O</i> -metilélágico-4'- <i>O</i> -β-D-glicopiranosídeo													
Alantoína								+					
Alcalóides													
N-1,N-2,N-3-triisopentenil guanidina	+	+											+
pteroginidina	+												
3-hidroxi-enolato (nor-dihidroflurocurarina)													+
diabolina													+
11-metoxidiabolina													+

continua na página seguinte

continuação

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
Catequinas													
(+)-catequina			+	+	+	+	+		+	+			
(-)-epicatequina				+	+	+	+		+				
galocatequina			+										
(-)-epigallocatequina galato					+								
Ciclitol								+					
3- <i>O</i> -metil- <i>chiro</i> -inositol (pinitol)								+					
Derivados do ácido galolil quínico		+											
Esqualeno										+			
Esteróides	+			+	+	+	+	+		+		+	
β-sitosterol	+									+			
β-sitosterol glicosídeo										+		+	
sitostenona										+			
estigmasterol	+												
Flavonóides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
quercetina	+	+		+	+	+	+		+				+
mirecetina							+		+				
kampferol									+				
isorhamnetina													+
metil derivado da isorhamnetina													+

continua na página seguinte

continuação

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
amentoflavona	+	+	+	+	+	+							
strychnobiflavona													+
5,6,4'-tri-hidroxi-7-metoxi flavona									+				
Flavonóides glicosídicos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
queretina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo	+	+		+	+	+	+						
queretina-4'-O- β -D-arabinopiranosídeo									+				
queretina-3-O- β -D-arabinopiranosídeo									+				
queretina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo									+				
queretina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	+	+	+	+	+	+	+		+				
queretina-3-O- β -D-xilopiranosídeo									+				
queretina-3-O- β -D-glucopiranosídeo	+	+							+				
queretina-7-O- β -D-glucopiranosídeo		+											
queretina-3-O- β -D-alopiranosídeo			+										
queretina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo	+						+		+				

continua na página seguinte

continuação

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
quercetina-3-O-(2''-O-galoi)-β-D-glucopiranosídeo				+									
quercetina-3-O-(2''-O-galoi)-β-D-galactopiranosídeo					+	+							
quercetina-3-O-(2''-O-galoi)-α-L-arabinopiranosídeo				+	+								
quercetina-3-O-α-L-rannopiranosil-(1→6)-β-D-galactopiranosídeo				+									
quercetina-3-O-α-L-rannopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (rutina)			+				+	+	+				+
quercetina-3-O-α-L-rannopiranosil-(1→3)-O-[α-L-rannopiranosil-(1→6)]-β-D-alopiranosídeo													
quercetina 3-O-(2'', 6''-O-α-L-dirannopiranosil)-β-D-glucopiranosídeo													
quercetina 3-O-(2'', 6''-O-α-L-dirannopiranosil)-β-D-galactopiranosídeo													

continua na página seguinte

continuação

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
quercetina 3-O-(2''-O-β-D-apiofuranosídeo-6''-O-α-L-ranopiranosil)-β-D-glucopiranosídeo								+					
quercetina 3-O-(2''-O-β-D-apiofuranosídeo-6''-O-α-L-ranopiranosil)-β-D-galactopiranosídeo								+					
quercetina-3-O-β-D-glicopiranosil-(6→1)-O-α-L-ranopiranosídeo								+					
3'-metoxiquercetina-3-O-β-D-galactopiranosil-(6→1)-O-α-L-ranopiranosídeo								+					
3'-metoxiquercetina-3-O-β-D-glicopiranosil-(6→1)-O-α-L-ranopiranosídeo								+					
miricetina-3-O-α-L-ranopiranosídeo	+						+		+				
miricetina-3-O-β-D-ranopiranosídeo									+				
miricetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo							+		+				
miricetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo							+		+				
kampferol-3-O-rutinosídeo	+												+

continua na página seguinte

continuação

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
kampferol-3-O- α -L-ramnosídeo													
kampferol-3-O- β -D-galactopiranosídeo									+				
kampferol-3-O- β -D-arabinopiranosídeo									+				
kampferol-3-O- β -D-xilopiranosídeo									+				
kampferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo									+				
kampferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(6 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranosídeo									+				
kampferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(6 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosídeo									+				
dihidroxikampferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo									+				
dihidroxikampferol-3-O- β -D-galactopiranosídeo									+				
kampferol 3-O- α -L-(4''-E-p-cumaroil)-ramnosídeo										+			
kampferol 3-O- α -L-(4''Z-p-cumaroil)-ramnosídeo										+			
isorhamnetina-3-O-rutinosídeo								+					

continua na página seguinte

continuação

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
isorhamnetina-3-O-(6''-β-D-galactopiranosil)-α-L-rhamnopyranosídeo								+					
Isocumarinas													
ácido carboxílico da brevifolina	+	+											
Saponinas													
Taninos													
corilagina	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	
isocorilagina		+											
β-D-glucogalina		+											
proantocianidina				+									
Terpenos													
ácido ursólico	+				+		+	+		+	+	+	
ácido oleanólico										+			
loliolida													
fitol	+												
lupeol										+			
α-amirina										+			
β-amirina										+			
bellericagenina B													+

continua na página seguinte

continuação

Substâncias	Ag ¹	At ²	Ah ³	Bb ⁴	Bc ⁵	Bi ⁶	De ⁷	Gn ⁸	Mp ⁹	Qg ¹⁰	Qm ¹¹	Qp ¹²	Sp ¹³
bellericasídeo B												+	
arjungalicosídeo												+	
28-nor-17,22-seco-2 α ,3 β ,19,22,23-pentaidroxi- Δ ¹² -oleanano												+	

¹Ag = *A. glandulosa* (CONEGERO et al., 2003; LOPES, 2004; URREA-BULLA, et al., 2004; LOPES et al., 2005; CALVO, 2007; CALVO et al., 2007); ²At = *A. triplinervia* (BRACA et al., 2002; CALVO et al., 2006; CALVO, 2007; LIMA et al., 2008); ³Ah = *A. humile* (SERRA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005; LUIZ-FERREIRA, 2005; LUIZ-FERREIRA et al., 2008); ⁴Bb = *B. basiflora* (SANNOMIYA et al., 2006; LIRA et al., 2008); ⁵Bc = *B. crassa* (SANNOMIYA et al., 2003; SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a; SANNOMIYA et al., 2005c; CARDOSO et al., 2006); ⁶Bi = *B. intermedia* (CARDOSO, 2006; SANNOMIYA et al., 2007); ⁷De = *D. elliptica* (CARLOS et al., 2005; MICHELIN et al., 2005; RINALDO et al., 2006); ⁸Gn = *G. noxia* (SEVERI et al., 2006a, b; SEVERI, 2007); ⁹Mp = *M. pusa* (ANDREO et al., 2006; SANTOS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008); ¹⁰Qg = *Q. grandiflora* (GASPI et al., 2006; HIRUMA-LIMA et al., 2006; NASSER, 2007; AYRES et al., 2008); ¹¹Qm = *Q. multiflora* (NASSER, 2007); ¹²Qp = *Q. parviflora* (NASSER et al., 2006; NASSER, 2007); ¹³Sp = *S. pseudoquina* (NICOLETTI et al., 1984; da SILVA et al., 2005; SANTOS et al., 2006);

(+) presença da substância no extrato; () substância não relatada no extrato

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Os extratos, frações e mistura de triterpenos avaliados, obtidos de plantas do Cerrado brasileiro, apresentaram baixa citotoxicidade basal e menor potencial tóxico que os compostos fenólicos quercetina e (+)-catequina;
- As espécies vegetais *B. crassa* e *D. elliptica* revelaram melhor atividade anti-*H. pylori*, entretanto, essa atividade não pode ser atribuída a uma única classe de compostos ou substância química presente nos extratos;
- Considerando todas as concentrações ensaiadas, a atividade antioxidante *in vitro*, avaliada através da capacidade redutora de radical DPPH, de extratos, frações e substâncias isoladas não representa necessariamente o efeito desempenhado em sistema *ex vivo* quanto à capacidade de sequestrar e/ou inibir o *burst* oxidativo de LPMNs ativados por *H. pylori*, conforme demonstrado em ensaios quimiluminescentes;
- Algumas das espécies vegetais, tais como *A. humile*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*, tradicionalmente utilizadas no tratamento de distúrbios gástricos, apesar de apresentarem baixa atividade anti-*H. pylori* demonstraram grande capacidade de reduzir o *burst* oxidativo de LPMNs, o qual parece mediar a patogênese de doenças associadas a essa bactéria, justificando o seu emprego na medicina popular;
- Dentre as espécies avaliadas, a *B. crassa* demonstrou maior potencial para o tratamento de doenças induzidas pelo *H. pylori*, por apresentar melhor atividade antibacteriana, baixa citotoxicidade e, especialmente, grande potencial antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- ABBIODISK, 2007. Disponível em: <<http://www.abbiodisk.com/pdf/cis/M0000355.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2009.
- ABE, T.; SHIMOYAMA, T.; FUKUDA, S.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K.; SAITO, Y. Effects of *Helicobacter pylori* in the stomach on neutrophil chemiluminescence in patients with gastric cancer. **Luminescence**, v 15, n. 5, p. 267-271, 2000.
- ABIFISA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DO SETOR FITOTERÁPICO, SUPLEMENTO ALIMENTAR E DE PROMOÇÃO DA SAÚDE. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br/introducao.asp>>. Acesso em: 15 dez. 2008.
- AGOSTINHO Jr, F. Soroprevalência e fatores de risco para infecção pelo *Helicobacter pylori*. **J. Pediatr.**, v. 79, n. 1, p. 3-4, 2003.
- AKIHISA, T.; KAMO, S.; UCHIYAMA, T.; AKAZAWA, H.; BANNO, N.; TAGUCHI, Y.; YASUKAWA, K. Cytotoxic activity of *Perilla frutescens* var. *japonica* leaf extract is due to high concentrations of oleanolic and ursolic acids. **J. Nat. Med.**, v. 60, n. 4, p. 331-333, 2006.
- ALLEN, L. A.; BEECHER, B. R.; LYNCH, J. T.; ROHNER, O. V.; WITTINE, L. M. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. **J. Immunol.**, v. 174, n. 6, p. 3658-3667, 2005.
- ALLEN, L. A. Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. **Cell. Microbiol.**, v. 9, n. 4, p. 817-828, 2007.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, E. C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa, 1998. 464p.
- ALMEIDA, A. V.; CÂMARA, C. A. G.; MARQUES, E. A. T. Plantas medicinais brasileiras usadas pelo Dr. João Ferreyra da Rosa na “Constituição Pestilencial de Pernambuco” no final do século XVII. **Biotemas**, v. 21, n. 4, p. 39-48, 2008.

Referências Bibliográficas

- ALVAREZ, M. A.; DEBATTISTI, N. B.; PAPPANO, N. B. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. **Folia Microbiol.** (Praha), v. 53, n. 1, p. 23-28, 2008.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, p. 1256-1264, 1983.
- AMES, B. N.; GOLD, L.S. Dietary carcinogens, environmental pollution, and cancer: some misconceptions. **Med. Oncol. Tumor Pharmacother.**, v. 7, n. 3-4, 69-85, 1990.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, n. 9, p. 1015-1025, 1999.
- ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M. D.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, n. 3, p. 431-441, 2006.
- ANISIMOV, M. M. Triterpene glycosides and the structural–functional properties of membranes. **Nauchnye Doki. Vyss. Shkoly Biol. Nauki.**, v. 10, p. 49-63, 1987.
- ANKLI, A.; HEINRICH, M.; BORK, P.; WOLFRAM, L.; BAUERFEIND, P.; BRUN, R.; SCHMID, C.; WEISS, C.; BRUGGISSER, R.; GERTSCH, J.; WASESCHA, M.; STICHER, O. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, n. 1, p. 43-52, 2002.
- ANNUK, H.; HIRMO, S.; TURI, E.; MIKELSAAR, M.; ARAK, E.; WADSTROM, T. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 172, n. 1, p. 41-45, 1999.
- AQIL, F.; KHAN, M. S.; OWAIS, M.; AHMAD, I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Basic Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 106-114, 2005.

Referências Bibliográficas

- AREND, A.; LOIME, L.; ROOSAAR, P.; SOOM, M.; LÕIVUKENE, K.; SEPP, E.; AUNAPUU, M.; ZILMER, K.; SELSTAM, G.; ZILMER, M. *Helicobacter pylori* substantially increases oxidative *stress* in indomethacin-exposed rat gastric mucosa. **Medicina** (Kaunas), v. 41, n. 4, p. 343-347, 2005.
- ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 5, p. 1009-1014, 2002.
- ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 5, p. 675-705, 1996.
- ATHERTON, J. C. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p. 63-96, 2006.
- AUGUSTO, A. C.; MIGUEL, F.; MENDONÇA, S.; PEDRAZZOLI Jr, J.; GURGUEIRA, S. A. Oxidative *stress* expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. **Clin. Biochem.**, v. 40, n. 9-10, p. 615-622, 2007.
- AYRES, M. C.; ESCÓRCIO, S. P.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; VIEIRA Jr., G. M.; CAVALHEIRO, A. J. Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: atribuição dos dados de RMN de dois flavonóides glicosilados acilados diastereoisoméricos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1481-1484, 2008.
- BABINCOVÁ, M., SCHRONEROVÁ, K., SOURIVONG, P. Antiulcer activity of water extract of *Scoparia dulcis*. **Fitoterapia**, v. 79, n.7-8, p. 587-588, 2008.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative *stress*. **Am. J. Med.**, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.
- BAE, E. A.; HAN, M. J.; KIM, D. H. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. **Planta Med.**, v. 65, n. 5, p. 442-443, 1999.

Referências Bibliográficas

- BAGCHI, D.; MCGINN, T. R.; YE, X.; BAGCHI, M.; KROHN, R. L., CHATTERJEE, A.; STOHS, S. J. *Helicobacter pylori*-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, n. 6, p. 1405-1412, 2002.
- BAGGETT, S.; PROTIVA, P.; MAZZOLA, E. P.; YANG, H.; RESSLER, E. T.; BASILE, M. J.; WEINSTEIN, B.; KENNELLY, E. J. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 3, p. 354-360, 2005.
- BARRE, J. T.; BOWDEN, B. F.; COLL, J. C.; JESUS, J.; FUENTE, V. E.; JANAIRO, G. C.; RAGASA, C. Y. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, 321-324, 1997.
- BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quím. Nova.**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K. F. Effects of flavonoids on parietal-cell acid-secretion, gastric-mucosal prostaglandin production and *Helicobacter-pylori* growth. **Arzneimittelforschung.**, v. 45, n. 6, p. 697-700, 1995.
- BERGT, C.; MARSCHKE, G.; PANZENBOECK, U.; HEINECKE, J. W.; MALLE, E.; SATTLER, W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system to oxidatively damage apolipoprotein A-I. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 12, p. 3523-3531, 2001.
- BEVER, B. O. Medicinal plants in tropical west Africa III. Anti-infection therapy with higher plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 9, n. 1, p. 1-83, 1983.
- BIOTA/FAPESP. Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores da Mata Atlântica e do Cerrado. 2003. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/projeto/index?search>>. Acesso em: 19 de mar. de 2008.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Letters**, v. 24, n. 2-3, p. 119-24, 1985.

- BORUTAITE, V.; BROWN, G. C. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. **FEBS Lett.**, v. 500, n. 3, p. 114-118, 2001.
- BOYANOVA, L. Comparative evaluation of two methods for testing metronidazole susceptibility of *Helicobacter pylori* in routine practice. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, n. 1, p. 33-36, 1999.
- BRACA, A.; MENDEZ, J.; MENICHINI, F.; MORELLI, I. Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). **Bioch. System. Ecol.**, v. 30, n. 11, p. 1109-1111, 2002.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sci.**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.
- CALAINHO, D. B. Jesuítas e medicina no Brasil colonial. **Tempo** (Rio de Janeiro), v. 10, n. 19, p. 61-75, 2005.
- CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Investigação da atividade antioxidante de *Davilla elliptica* (Dilaneaceae). In: **VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 2003, São Pedro, SP, Brasil.
- CALVO, T. R.; SEVERI, J. A.; RINALDO, D.; SOUZA-BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Constituintes químicos do extrato metanólico das folhas de *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). In: **XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2006, Rio Vermelho, BA, Brasil.
- CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S.; BALLESTEROS, K. V.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAMASHIRO, J.; BRITO, A. R.; TAKAHIRA, R. K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 3, p. 451-459, 2007.

CALVO, T. R. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira – prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae).** 217f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

CARDOSO, C. R. **Atividade muatgênica e ativadora da resposta immune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae).** 129f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

CARDOSO, C. R.; DE SYLLOS CÓLUS, I. M.; BERNARDI, C. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicol.**, v. 225, p. 55-63, 2006.

CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO Jr, C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 1, p. 44-50, 2005.

CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey. **Toxicol. In Vitro**, v. 19, n. 5, p. 695–705, 2005.

CASTILLO-JUÁREZ, I.; RIVERO-CRUZ, F.; CELIS, H.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, n. 1, p. 72–77, 2007.

CHAN, F. K. L.; LEUNG, W. K. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 360, p. 933-941, 2002.

CHANG, H.; MI, M. T.; GU, Y. Y.; YUAN, J. L.; LING, W. H.; LIN, H. Effects of flavonoids with different structures on proliferation of leukemia cell line HL-60. **Ai Zheng.**, v. 26, n. 12, p. 1309-1314, 2007.

Referências Bibliográficas

- CHANG, H.; MI, M.; LING, W.; ZHU, J.; ZHANG, Q.; WEI, N.; ZHOU, Y.; TANG, Y.; YUAN, J. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 9, p. 1137-1144, 2008.
- CHATSUWAN, T.; AMYES, S. G. B. Setting the standard for determining the *in vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to metronidazole. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, n. 2, p. 291-293, 1999.
- CHATTERJEE, A.; YASMIN, T.; BAGCHI, D.; STOHS, S. J. Inhibition of *Helicobacter pylori* in vitro by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 265, n. 1-2, p. 19-26, 2004.
- CHEN, H.; HSU, M.; CHIEN, C.; HUANG, H. Effect of alisol B acetate, a plant triterpene on apoptosis in vascular smooth muscle cells and lymphocytes. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 419, n. 2-3, p. 127-138, 2001.
- CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 20, p. 7429-7436, 2006.
- CHUNG, V. Q.; TATTERSALL, M.; CHEUNG, H. T. A. Interactions of a herbal combination that inhibits growth of prostate cancer cells. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 53, n. 5, p. 384-390, 2004.
- CLYNE, M.; DOLAN, B.; REEVES, E. P. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 268, n. 2, p. 135-143, 2007.
- COELHO, L. G. V.; ZATERKA, S. II Consenso brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. **Arq. Gastroenterol.**, v. 42, n. 2, p. 128-132, 2005
- CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Quím. Nova**, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

Referências Bibliográficas

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F.; DELLA LOGGIA, R. *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 116, n. 1, p. 144–151, 2008.

CORREA, P. The biological model of gastric carcinogenesis. **IARC Sci. Publ.**, v. 157, p. 301-310, 2004.

CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F.; GONÇALVES, M. C.; DE OLIVEIRA, V. L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C.; KANZAKI, L. I. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v. 12, n. 6, p. 369-380, 2008.

COSTA, D.; MOUTINHO, L.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 8, p. 1659-1670, 2006.

COTRAM, R. S. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6th. Philadelphia: Sanders Company, 1999. 1424p.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

Da SILVA, M. A.; RAFACHO, B. P. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* ST. HIL. Leaves extract on gastrointestinal activity in mice. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005.

Da SILVA, J. B. G. Efeitos colaterais da medicina natural. 2007. Disponível em: <<http://reviversaudeholistica.blogspot.com/2007/12/efeitos-colaterais-da-medicina-natural.html>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

Referências Bibliográficas

De FRANÇA, I. S. X.; DE SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; SOUSA BRITTO, V. R. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.** (Brasília), v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica** (Curitiba), v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

Di STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995. 230p.

Di STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, na isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Med.**, v. 70, n. 4, p. 315-320, 2004.

DING, S. Z.; MINOHARA, Y.; FAN, X. J.; WANG, J.; REYES, V. E.; PATEL, J.; DIRDEN-KRAMER, B.; BOLDOGH, I.; ERNST, P. B.; CROWE, S. E. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 8, p. 4030-4039, 2007.

DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, 720-741, 1997.

EBI, G. C. Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 69-72, 2001.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; PEZOA-GARCIA, N. H.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacauero de diferentes genótipos. **Braz. J. Food Technol.**, v. 9, n. 4, p. 229-236, 2006.

ÉPOCA. Entrevista com Heinz Schilcher, responsável pela forte disseminação dos fitoterápicos na Alemanha, ed. 301, 2004. Disponível em: <<http://revistaepoca.globo.com/Epoca/0,6993,EPT682254-1655,00.html>>. Acesso em: 19 nov. 2008.

Referências Bibliográficas

ERNST, P. B.; GOLD, B. D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 615-640, 2000.

ERVAS DO SÍTIO. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/3183675/Ervas-do-Sitio>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

FABRY, W.; OKEMO, P.; ANSORG, R. Activity of east African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 315-317, 1996.

FALCÃO, H. S.; MARIATH, I. R.; DINIZ, M. F.; BATISTA, L. M., BARBOSA-FILHO, J. M. Plants of the American continent with antiulcer activity. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1, 132-146, 2008.

FENGLIN, H; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 14-23, 2004.

FERNANDES, A. C.; CROMARTY, A. D.; ALBRECHT, C.; van RENSBURG, C. E. J. The antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, n. 1, p. 1-5, 2004.

FERNANDEZ, H. Gênero *Helicobacter*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2004. p. 353-358.

FERREIRA, A. L. **Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. 142f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

FETROW, C.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 744p.

Referências Bibliográficas

FONTANAY, S.; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R. E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, n. 2, p. 272-276, 2008.

FRANCK, T.; KOHNEN, S.; GRULKE, S.; NEVEN, P.; GOUTMAN, Y.; PETERS, F.; PIROTTE, B.; DEBY-DUPONT, G.; SERTEYN, D. Inhibitory effect of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine activated neutrophils and myeloperoxidase activity. **Physiol. Res.**, v. 57, n. 4, p. 577-587, 2008.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** 3^a ed. New York: Wiley-Liss Inc, 1994. 486p.

FUKAI, T.; MARUMO, A.; KAITOU, K.; KANDA, T.; TEREDA, S.; NOMURA, T. FUKAI, T.; MARUMO, A.; KAITOU, K.; KANDA, T.; TEREDA, S.; NOMURA, T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. **Life Sci.**, v. 71, n. 12, p. 1449-1463, 2002.

FUKUDA, T.; HIDEYUKI, I.; YOSHIDA, T. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). **Phytochemistry**, v. 63, n. 7, p. 795-801, 2003.

FUNATOGAWA, K.; HAYASHI, S.; SHIMOMURA, H.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H.; HIRAI, Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, n. 4, p. 251-261, 2004.

GADHI, C. A.; BENHARREF, A.; JANA, M.; LOZNIEWSKI, A. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 75, n. 2-3, p. 203-205, 2001.

GALICE, D. M.; BONACORSI, C.; SOARES, V. C. G.; RADDI, M. S. G.; DA FONSECA, L. M. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression. **Int. J Antimicrob. Agents**, v. 28, n. 2, p. 143-146, 2006.

Referências Bibliográficas

- GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; LIMA, L. A. R. S. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatoria* Mart.). **Quím. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1427-1430, 2008.
- GAO, Z.; HUANG, K.; YANG, X.; XU, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1472, p. 643-650, 1999.
- GARCÍA, D.; LEIRO, J.; DELGADO, R.; SANMARTÍN, M. L.; UBEIRA, F. M. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. **Phytother. Res.**, v. 17, n. 10, p. 1182-1187, 2003.
- GASPI, F. O. G.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, n. 1, p. 19-24, 2006.
- GERRITS, M. M.; GODOY, A. P.; KUIPERS, E. J.; RIBEIRO, M. L.; STOOFF, J.; MENDONÇA, S.; VAN VLIET, A. H.; PEDRAZZOLI Jr, J.; KUSTERS, J. G. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 11, n. 3, p. 181-187, 2006.
- GONZÁLEZ, C.; GARCÍA, A.; DAROCH, F.; KAWAGUCHI, F.; SOLAR, H.; RIVERA, N.; VEGA, E. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains: isolation of strains resistant to clarithromycin. **Rev. Med. Chil.**, v. 129, n. 6, p. 643-646, 2001.
- GULCIN, I.; KUFREVIOGLU, O. I.; OKTAY, M.; BUYUKOKUROGLU, M. E. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, n. 2, p. 205-215, 2004.
- GURBUZ, I.; USTUN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; AKYUREK, N. *In vivo* gastroprotective effects of live Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, n. 3, p. 241-244, 2002.

Referências Bibliográficas

- HAHM, K. B.; LEE, K. J., KIM, J. H., CHO, S. W., CHUNG, M. H. *Helicobacter pylori* infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. **Dig. Dis. Sci.**, v. 43, n. 9, p. 72S-77S, 1998a.
- HAHM, K. B.; LEE, K. J.; KIM, Y. S.; KIM, J. H.; CHO, S. W.; YIM, H.; JOO, H. J. Quantitative and qualitative usefulness of rebamipide in eradication regimen of *Helicobacter pylori*. **Dig. Dis. Sci.**, v. 43, n. 9, p. 192S-197S, 1998b.
- HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007-17, 1998.
- HANCOCK, R. E. W. Role of porins in outer membrane permeability. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 3, p. 929-933, 1987.
- HARAGUCHI, H.; KATAOKA, S.; OKAMOTO, S.; HANAFI, M.; SHIBATA, K. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. **Phytother. Res.**, v. 13, p. 151-156, 1999.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HEMAISWARYAA, S.; KRUTHIVENTIB, A. K.; DOBLEA, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.
- HIGUCHI, C. T.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; DE ANDRADE LEITE, S. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; SATO, D. N. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. **Quím. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1719-1721, 2008.

Referências Bibliográficas

HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Anal. Biochem.**, v. 247, n. 2, p. 237-241, 1997.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, n. 1-2, p. 207-214, 2006.

HOESSEL, R.; LECLERC, S.; ENDICOTT, J. A.; NOBEL, M. E. M.; LAWRIE, A.; TUNNAH, P.; LEOST, M.; DAMIENS, E.; MARIE, D.; MARKO, D.; NIEDERBERGER, E.; TANG, W.; EISENBRAND, G.; MEIJER, L. Indirubin, the active constituent of a chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, n. 1, p. 60-67, 1999.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HSIEH, T.; LIU, T.; CHIA, Y.; CHERN, C.; LUE, F.; CHUANG, M.; MAU, S.; CHEN, S.; SYU, Y.; CHEN, C. Protective effect of methyl gallate from *Toona sinensis* (Meliaceae) against hydrogen peroxide- induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, n. 5, p. 843-850, 2004.

HUANG, X.; KOJIMA-YUASA, A.; XU, S.; NORIKURA, T.; KENNEDY, D. O.; HASUMA, T.; MATSUI-YUASA, I. Green tea extract enhances the selective cytotoxic activity of *Zizyphus jujuba* extracts in HepG2 cells. **Am. J. Chin. Med.**, v. 36, n. 4, 729-744, 2008.

HYUN, S. K.; JUNG, H. A.; CHUNG, H. Y.; CHOI, J. S. *In vitro* peroxynitrite scavenging activity of 6-hydroxykynurenic acid and other flavonoids from *Gingko biloba* yellow leaves. **Arch. Pharm. Res.**, v. 29, n. 12, p. 1074-1079, 2006.

Referências Bibliográficas

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Biomas brasileiros. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/home.htm>>. Acesso em: 14 nov. 2008.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=16>. Acesso em: 19 marc. 2008.

IGNATTI, C.; MARIANO, A. F.; VITORINO, C. S. P. A enfermagem nas novas terapias alternativas no SUS. In: **Simpósio Internacional de Ciências Integradas da UNAERP**, Guarujá, SP, Brasil, p. 1-12, 2006.

KANAMARU, T.; NAKANO, Y.; TOYODA, Y.; MIYAGAWA, K.; TADA, M.; KAISHO, T.; NAKAO, M. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of TAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 9, p. 2455-2459, 2001.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes, **Phytother. Res.**, v. 81, n. 1, p. 61–65, 2004.

KANASHIRO, A.; SOUZA, J. G.; KABEYA, L. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. **Z. Naturforsch.**, v. 62, p. 357–361, 2007.

KEENAN, J.; PETERSON, R.; HAMPTON, M. NADPH oxidase involvement in the pathology of *Helicobacter pylori* infection. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, n. 9, p. 1188-1196, 2005.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 7, p. 2161-2168, 2002.

Referências Bibliográficas

- KIM, H. Oxidative stress in *Helicobacter pylori*-induced gastric cell injury. **Inflammopharmacology**, v. 13, n. 1-3, p. 63-74, 2005.
- KIM, D. S.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; KIM, D. H.; BAE, J. M.; SHIN, M. H.; AHN, Y. O. Effect modification by vitamin C on the relation between gastric cancer and *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 20, n. 1, p. 67-71, 2005.
- KIM, S. Y.; JOO, Y. M.; LEE, H. S.; CHUNG, I.; YOO, Y.; MERRELL, D. S.; CHA, J. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional *rdxA*. **J. Antibiot.**, v. 62, n. 1, p. 43-50, 2009.
- KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; KHALIL, N. M.; VILEGAS, W.; DA FONSECA, L. M. Effect of the isocoumarin Paepalantine on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 6, p. 905-908, 2003.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.
- KOBAYASHI, I.; MURAOKA, H.; SAIKA, T.; NISHIDA, M.; FUJIOKA, T.; NASU, M. Micro-broth dilution method with air-dried microplate for determining MICs of clarithromycin and amoxycillin for *Helicobacter pylori* isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 403-406, 2004.
- KOKO, W. S.; MESAİK, M. A.; YOUSAF, S.; GALAL, M.; CHOUDHARY, M. I. *In vitro* immunomodulating properties of selected Sudanese medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, n. 1, p. 26-34, 2008.
- KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p. 237-242, 2007.
- KROL, W.; SCHELLER, S.; CZUBA, Z.; MATSUNO, T.; ZYDOWICZ, G.; SHANI, J.; MOS, M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, n. 1, p. 19-25, 1996.

Referências Bibliográficas

- KURATA, J. H. Ulcer epidemiology: an overview and proposed research framework. **Gastroenterology**, v. 96, p. 569-580, 1989.
- KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H. M.; KUIPERS, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 449-490, 2006.
- LAI, C. H.; FANG, S. H.; RAO, Y. K.; GEETHANGILI, M.; TANG, C. H.; LIN, Y. J.; HUNG, C. H.; WANG, W. C.; TZENG, Y. M. Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells by *Phyllanthus urinaria* extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, n. 3, p. 522-526, 2008.
- LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **Gen. Pharmac.**, v. 27, n. 7, p. 1145-1147, 1996.
- LAPPONI, J. C. **Estatística: usando Excel 5 e 7**. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora, 1997. 402p.
- LEE, K.; KIM, D. H.; LEE, S. Y.; KIM, K. R.; CHOI, S. U.; HONG, J. K.; LEE, J. H.; PARK, Y. H.; LEE, K. R. Triterpenic acids of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* and their cytotoxic activities *in vitro*. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 12, p. 1578-1583, 2008.
- LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N.; HIGUCHI, C. T.; SANNOMIYA, M.; PAVAN, F. R.; VILEGAS, W. Antimycobacterial activity of *Byrsonima crassa* Nied leaf extracts. **Rev. Bras. Pl. Med.** (Botucatu), v.10, n.4, p.63-66, 2008.
- LIMA, A. R.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, C. M. C. P Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

Referências Bibliográficas

LIMA, Z. P.; DOS SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R.; CARDOSO, C. R.; VARANDA, E. A.; DE MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, n. 2, p. 149-160, 2008.

LIN, R.; CHIN, Y.; LEE, M. Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Phytother. Res.**, v. 19, n. 7, p. 612-617, 2005.

LIRA, W. M. **Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros *Byrsonima* e *Davilla***. 183f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LIRA, W. M.; DOS SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in Salmonella typhimurium assays. **J. Med. Food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S. H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutr. Res.**, v. 21, n. 1-2, p. 295-307, 2001.

LOPES, F. C. M. **Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea spp* quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos**. 122f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- α production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 9, p. 1726-1730, 2005.

Referências Bibliográficas

LOPES, F. C. M., POLESÍ PLACERES, M. C., JORDÃO Jr, C. M., HIGUCHI, C. T., RINALDO, D., VILEGAS, W., FUJIMURA LEITE, C. Q, CARLOS, I. Z. Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 69-72, 2007.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chem.**, v. 68, n. 1, p. 81-85, 2000.

LUIS, J. C.; VALDÉS, F.; MARTÍN, R.; CARMONA, A. J.; DÍAZ, J. G. DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus* sp. *Lusitanicum*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 469-471, 2006.

LUIZ-FERREIRA, A. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. 142f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

LUIZ-FERREIRA, A.; COLA-MIRANDA, M.; BARBASTEFANO, V.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agent? A scientific approach to the traditional knowledge. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 207-209, 2008.

MABE, K.; YAMADA, M.; OGUNI, I.; TAKAHASHI, T. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, n. 7, p. 1788-1791, 1999.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 4, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Anal. Chim. Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

Referências Bibliográficas

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 253, n. 1-2, p. 329-338, 2003.

MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 10, p. 1576-1579, 2004.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.**, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MARINHO, V. M. C. Biodiversidade e a geração de novas oportunidades para a indústria farmacêutica nacional. In: **XXVI Encontro Nacional de Engenharia de Produção (ENEGEP)**, 2006, Fortaleza, CE, Brasil. Disponível em: <http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2006_TR560372_7387.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2008.

MATLE, D.; EDDEB, F.; PICKERING, A. T. Comparison of relative antioxidant activities of british medicinal plant species in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, n. 1-2, p. 47-51, 2000.

MATTHEWS, G. M.; BUTLER, R. N. Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and oxidative pentose pathway. **Helicobacter**, v. 10, n. 4, p. 298-306, 2005.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA, M. C., REZENDE, A. R.; FILGUIERAS, T. S., NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA S. P. (Eds.), *Cerrado Ambiente e Flora*. Planaltina: Embrapa, 1998. p. 286–556.

MICHELIN, D. C.; IHA, S. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15 n. 3, p. 209-211, 2005.

Referências Bibliográficas

MIHARA, R.; BARRY, K. M.; MOHAMMED, C. L.; MITSUNAGA, T. Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acaccia mangium* and *A. auriculiformis* heartwood extracts. **J. Chem. Ecol.**, v. 31, n. 4, p. 789-804, 2005.

MIRANDA, I. S.; ALMEIDA, S. S.; DANTAS, P. J. Florística e estrutura de comunidades arbóreas em cerrados de Rondônia, Brasil. **Acta Amaz.**, v. 36, n. 4, p. 419-430, 2006.

MIZUKI, I.; SHIMOYAMA, T.; FUKUDA, S.; LIU, Q.; NAKAJI, S.; MUNAKATA, A. Association of gastric epithelial apoptosis with the ability of *Helicobacter pylori* to induce a neutrophil oxidative burst. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 521-524, 2000.

MOREIRA, M. R.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; CURTI, C.; OLIVEIRA, C. A.; AMARAL, A. T. D. O.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. **Life Sci.**, v. 81, p. 317-326, 2007.

NASSER, A. L. M.; MAZZOLIN, L. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Preparative droplet counter-current chromatography for the separation of the new nor-seco-triterpene and pentacyclic triterpenoids from *Qualea parviflora*. **Chromatographia**, v. 64, n. 11-12, p. 695-699, 2006.

NASSER, A. L. M. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Qualea* ssp (Vochysiaceae)**. 197f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 9th Informational Supplement (aerobic dilution). NCCLS document M100-S9. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, 6th ed. NCCLS document M7-A6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

Referências Bibliográficas

NDIP, R. N.; TARKANG, A. E.; MBULLAH, S. M.; LUMA, H. N.; MALONGUE, A.; NDIP, L. M.; NYONGBELA, K.; WIRMUM, C.; EFANGE, S. M. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, n. 3, p. 452-457, 2007.

NENADIS, N.; WANG, L. F.; TSIMIDOU, M. ZHANG, H. Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.4669-4674, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NICOLETTI, M.; GOULARD, M. O. F.; LIMA, R. A.; GOULARD, A. E.; MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 6, p. 953-957, 1984.

NIH. Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. **JAMA**, v. 272, n. 1, p. 65-69, 1994.

NIKAIDO, H.; ROSENBERG, E. Y.; FOULDS, J. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with β -lactams in intact cells. **J. Bacteriol.**, v. 153, n. 1, p. 232-240, 1983.

NISHIZAWA, M.; KOHNO, M.; NISHIMURA, M.; KITAGAWA, A.; NIWANO, Y. Non-reductive scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analyses of peroxyradical. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 6, p. 714-716, 2005.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOARES, L. A. S.; FURLONG, E. B. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alim. Nutr.** (Araraquara), v. 18, n. 3, p. 267-275, 2007.

OSADEBE, P. O.; OKOYE, F. B. C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, n. 1, p. 19-24, 2003.

Referências Bibliográficas

OSATO, M. S.; REDDY, R.; REDDY, S. G.; PENLAND, R. L.; GRAHAM, D. Y. Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 17, n. 1, p. 39-44, 2001.

OHSHIMA, H.; TATEMACHI, M.; SAWA, T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 417, n. 1, p. 3-11, 2003.

PARIJ, N.; NAGY, A. M.; FONDU, P.; NEVE, J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 352, n. 2-3, p. 299-305, 1998.

PASCOTTO, M. C. Avifauna dispersora de sementes de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae) em uma área de mata ciliar no estado de São Paulo. **Rev. Bras. Ornitol.**, v. 14, n. 3, p. 291-296, 2006.

PAULA, F. S.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; FIGUEIREDO, A. S.; AZZOLINI, A. E.; UYEMURA, S. A.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, n. 1, p. 163-170, 2009.

PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; GONZALEZ, M.; DE LORENZO, C. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 2, p. 360-365, 2007.

PHILIPPE, G.; ANGENOT, L.; TITS, M.; FRÉDÉRICH, M. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 405-416, 2004.

PICCOLOMINI, R.; DI BONAVENTURA, G.; CATAMO, G.; CARBONE, F.; NERI, M. Comparative evaluation of the E-test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 7, 1842-1846, 1997.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: Embrapa, 1994. 320p.

Referências Bibliográficas

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n. 11-12, p.1173-1181, 1999.

QUEENSLAND HEALTH. Micrografia eletrônica da bactéria *Helicobacter pylori*. Disponível em: <http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/images/138_helico.jpg>. Acesso em: 15 dez. 2008.

RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 27, p. 269-74, 1990.

RAMOS, M. F. S.; FREITAS, O.; HENRIQUES, M. G.; ROSAS, E. C. Pedida a patente para o óleo de copaíba. **Jornal da USP** (Ribeirão Preto), v. 856, p. 4-5, 15 maio 2006a.

RAMOS, M. F. S.; FREITAS, O.; HENRIQUES, M. G.; ROSAS, E. C. Os efeitos da copaíba confirmados. **Jornal da USP**, v. 771, p. 9, 31 jul. 2006b.

RASOANAIVO, P.; RATSIMAMANGA-URVERG, S.; FRAPPIER, F. Recent results on the pharmacodynamics of *Strychnos malgaches* alkaloids. **Sante**, v. 6, n. 4, p. 249-253, 1996.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RINALDO, D.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; CALVO, T. R.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C. VILEGAS, W.; KUSHIMA, H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by high-speed counter-current chromatography. **Quím. Nova**, v. 29, n. 5, p. 947-949, 2006.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; HIRUMA-LIMA, C. A. .SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Avaliação da composição química do extrato polar de *Anacardium humile* por HPLC-UV-PDA. In: **V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2005, Recife, PE, Brasil.

Referências Bibliográficas

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; DOS SANTOS, L.C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochem. Anal.**, v. 19, n. 1, p. 17-24, 2008.

RIEMERSMA, R. A.; RICE-EVANS, C. A.; TYRRELL, R. M.; CLIFFORD, M. N. Tea flavonoids and cardiovascular health. **Q. J. Med.**, v. 94, p. 277-282, 2001.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. Gastric and Duodenal Ulcers: Na Infectious Disease. In: SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis a molecular approach**, 2^a ed. Washington, D. C: ASM Press, 1994. p. 274-280.

SANNOMIYA, M.; BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Estudo químico preliminar do extrato polar de *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae). In: **XII Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina**, 2003, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p. 177.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHO, R. G.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMALIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **J. Chromatogr.**, v. 1035, n. 1, p. 47-51, 2004.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005a.

SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 19, n. 16, p. 2244-2250, 2005b.

Referências Bibliográficas

SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SALGADO, H. R. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. S. M.; VILEGAS, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n. 1, p. 71-75, 2005c.

SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; da SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; de ALMEIDA, L. F.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Preparative isolation of a novel flavonoid from *Byrsonima basiloba* A. Juss. of leaves infusion by high-speed counter-current chromatography. In: **XII Congresso Ítalo-latinoamericano Di Etnomedicina Ivano Morelli**, 2006, Perugia, Itália.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R.; FIGUEIREDO, M. E.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; DOS SANTOS, F. V.; SERPELONI, J. M.; CÓLUS, I. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p. 319-326, 2007.

SANTOS, J. S. Transcendendo os números. **Rev. Pharmacia Brasileira**, n. 25 (março/abril), p. 3, 2001.

SANTOS, F. V.; COLUS, I. M. S.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, n. 9, p. 1585-1589, 2006.

SANTOS, F. V.; TUBALDINI, F. R.; CÓLUS, I. M. S.; ANDRÉO, M. A.; BAUAB, T. M.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of *Mouriri pusa* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, n. 8, p. 2721-2727, 2008.

SATIN, B.; DEL GIUDICE, G.; DELLA BIANCA, V.; DUSI, S.; LAUDANNA, C.; TONELLO, F.; KELLEHER, D.; RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C.; ROSSI, F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 9, p. 1467-1476, 2000.

Referências Bibliográficas

SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N. S. L.; WILKINS, R. M.; PERRY, E. K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, n. 3, p. 661-668, 2003.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2003. Cap. 15, p. 371-402.

SCHWESINGER, W. H.; PAGE, C. P.; SIRINEK, K. R.; GASKILL, H.V.; MELNICK, G.; STRODEL, W. E. Operations for peptic ulcer disease: paradigm lost. **J. Gastroint. Surg.**, v. 5, n. 4, p. 438-443, 2001.

SELGRAD, M.; MALFERTHEINER, P. New strategies for *Helicobacter pylori* eradication. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 8, n. 5, p. 593-597, 2008.

SELLOUM, L.; DJELILI, H.; SEBIHI, L.; ARNHOLD, J. Scavenger effect of flavonols on HOCl-induced luminol chemiluminescence. **Luminescence**, v. 19, n. 4, p. 199-204, 2004.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A. B.; MONACHE, F. D.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; CECHINEL FILHO, V. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 4, p. 578-582, 2007.

SERRA, C. B.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C.; VILEGAS, W. Biflavonóide de *Anacardium humile* A. St. Hil. In: **VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 2003, São Pedro, SP, Brasil.

SEVERI, J. A.; CALVO, T. R.; DOS SANTOS, L. C.; BRITO, A. R. M. A.; VILEGAS, W. Flavonóides isolados de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae). In: **9ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006a, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

SEVERI, J. A.; BAUAB, T. M.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae). In: **XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2006b, Salvador, CE, Brasil

SEVERI, J. A. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira prospecção químico-farmacológica de plantas superiores: *Guapira noxia* (Nyctaginaceae)**. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SHIH, Y.; WU, D.; LIU, C.; YANG, Y.; CHEN, I.; LO, Y. San-Huang-Xie-Xin-Tang inhibits *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 3, p. 537-544, 2007.

SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; MAKAROV, V. G.; KVETNAYA, A. S. Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori*. **Phytother. Res.**, v. 22, n. 2, p. 252-253, 2008.

SHIMOYAMA, T.; FUKUDA, S.; LIU, Q.; NAKAJI, S.; FUKUDA, Y.; SUGAWARA, K. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophil for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. **J. Clin. Pathol.**, v. 56, n. 5, p. 348-351, 2003.

SHIN, J. E.; KIM, J. M.; BAE, E. A.; HYUN, Y. J.; KIM, D. H. *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. **Planta Med.**, v. 71, n. 3, p. 197-201, 2005.

SHIRATAKI, Y.; TANI, S.; SAKAGAMI, H.; SATOH, K.; NAKASHIMA, H.; GOTOH, K.; MOTOHASHI, N. Relationship between cytotoxic activity and radical intensity of isoflavones from *Sophora* species. **Anticancer Res.**, v. 21, n. 4A, p. 2643-2648, 2001.

SHRESTHA, S., LAU, D. Gastric Ulcers. **eMedicine Specialties**, 2007. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/175765-overview>>. Acesso em: 14 dez. 2008.

SIDDHURAJU, P.; MOHAN, P. S.; BECKER, K. Studies on the antioxidant activity of Indian laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. **Food Chem.**, v. 79, n. 1, p. 61-67, 2002.

Referências Bibliográficas

- SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.). **Food Chem.**, v. 105, n. 3, p. 950-958, 2007.
- SILVA, E. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LÓLIS, S. F. Etnobotânica no município de Porto Nacional. In: **Symposium of Brazilian Medicinal Plants**, 2000, Cuiabá, MT, Brasil, p.106.
- SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA Jr., M. C.; MEDEIROS, M. B. (Eds.). **Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília: Prática Gráfica e Editora Ltda., 2001. 132p.
- SILVA, M. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 256-267, 2005.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2003. 1102p.
- SMOOT, D. T.; ELLIOTT, T. B.; VERSPAGET, H. W.; JONES, D.; ALLEN, C. R.; VERNON, K. G.; BREMNER, T.; KIDD, L. C.; KIM, K. S.; GROUPMAN, J. D.; ASHKTORAB, H. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 11, p. 2091-2095, 2000.
- SOARES, M. A. Resistência antibiótica. **Rev. Pharm. Bras.**, p. 59-62, Jan/Fev 2001.
- SONNEMBERG, A.; EVERHART, J. E. The prevalence of self-reported peptic ulcer in the United States. **Am. J. Public. Health**, v. 86, n. 2, p. 200-205, 1996.
- SOUSA, C. M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA Jr., G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

Referências Bibliográficas

SOUZA, E. J. R.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; SILVA, F. C. L.; CHAVES, M. M.; COSTA, D. C. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos de sangue periférico de pacientes com fibromialgia primária. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 43, n. 6, p. 337-342, 2003.

SOUZA-BRITO, A. R. M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **J. Ethnopharmacol.**, v. 54, n. 2, p. 131-138, 1996.

SPENCER, J. P.; SCHROETER, H.; CROSTHWAITHE, A. J.; KUHNLE, G.; WILLIAMS, R. J.; RICE-EVANS, C. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, n. 9, p. 1139-1146, 2001.

STEGE, P. W.; DAVICINO, R. C.; VEJA, A. E.; CASALI, Y. A.; CORREA, S.; MICALIZZI, B. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9-10, 724–727, 2006.

STERMITZ, F. R.; LORENZ, P.; TAWARA, J. N.; ZENEWICZ, L. A.; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **PNAS**, v. 97, n. 4, p. 1433–1437, 2000.

SUERBAUM, S.; JOSENHANS, C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 5, p. 441-452, 2007.

TABAK, M.; ARMON, R.; NEEMAN, I. Cinnamon extracts' inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67, n. 3, p. 269–277, 1999.

TALEB-CONTINI, S. H.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; OLIVEIRA, D. C. Immunomodulatory effects of methoxylated flavonoids from two *Chromolaena* species: structure-activity relationships. **Phytother. Res.**, v. 20, n. 7, p. 573-575, 2006.

Referências Bibliográficas

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian Propolis samples. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 31, p. 1-9, 2008.

THE *Helicobacter* FOUNDATION. Disponível em: <http://www.helico.com/h_epidemiology.html>. Acesso em: 20 fev. 2009.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da UNIVAP**, 2007, São José dos Campos, SP, Brasil.

TREVISAN, M. T.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

TURINA, A. V.; PERILLO, M. A. Monoterpenes affect chlorodiazepoxide–micelle interaction through micellar dipole potential modifications. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1616, n. 2, p. 112-120, 2003.

UMAMAHESWARI, M.; ASOKKUMAR, K.; RATHIDEVI, R.; SIVASHANMUGAM, A. T.; SUBHADRADEVI, V.; RAVI, T. K. Antiulcer and in vitro antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, n. 3, p. 464-470, 2007.

URREA-BULLA, A.; SUÁREZ, M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 392-394, 2004.

USTUN, O.; OZÇELIK, B.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 108, n. 3, p. 457-461, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀“. **Rev. Eletr. Farm.**, v. 3, n. 2, 93-98, 2006.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VASCONCELOS, P. C.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R. K.; PELLIZZON, C. H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, n. 2, p. 293-301, 2008.

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

VELURI, R.; WEIR, T. L., BAIS, H. P.; STERMITZ, F. R.; VIVANCO, J. M. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 5, p. 1077-1082, 2004.

VERSCHAEVE, L.; KESTENS, V.; TAYLOR, J. L. S.; ELGORASHI, E. E.; MAES, A.; PUVVELDE, L. V.; KEMPE, N. D.; STADEN, J. V. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. **Toxicol. In Vitro**, v. 18, n. 1, p. 29-35, 2004.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais e a química moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, I. F. R.; LEAL, A. S.; KRAMBROCK, K.; TAMBOURG, E. B. Identificação de plantas medicinais irradiadas através da ressonância paramagnética eletrônica. **Braz. J. Food Technol.**, v. 10, n. 1, p. 63-69, 2007.

VIEIRA, M. S.; VALADARES, M. Emprego da citotoxicidade basal *in vitro* na redução do número de animais em ensaios de avaliação de toxicidade oral aguda: resultados preliminares. In: **V Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2008, Goiânia, GO, Brasil.

Referências Bibliográficas

VIZOSO, A. P.; LÓPEZ, A. G.; RUIZ, A. R.; PILOTO, J. Estudio toxicogenético de un extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. (*albahaca blanca*). **Rev. Cub. Plant. Med.**, v. 5, n. 3, p. 78-83, 2000.

VUOTTO, M. L.; MIRANDA, R.; RITIENI, A.; BASILE, A.; RICCIARDI, L.; DI PRISCO, R.; NICOLOSI, G.; MASCOLO, N. Improvement of (+)-catechin inhibitory activity on human PMN respiratory burst by (+)-3-O-propionyl and (-)-3-O-valeryl substitution. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 55, n. 3, p. 399-405, 2003.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB Journal**, v. 10, n. 7, p. 731-740, 1996.

WANG, G.; HONG, Y.; JOHNSON, M. K., MAIER, R. J. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*: Protective roles of peroxiredoxins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, n. 11, p. 1596–1603, 2006.

WANG, C.; LIU, Y.; DU, S.; LIN, C.; FU, H. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating promotes myeloperoxidase release from human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 377, n. 1, p. 52-56, 2008.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n. 5-6, p. 683-694, 1999.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. World Health Organization (Geneva), 2000a. 80p. Disponível em: <<http://www.who.int/medicinedocs/pdf/whozip42e/whozip42e.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Situación regulamentaria de los medicamentos: una resena mundial. Traducción del inglés: Organización Panamericana de La Salud. Washington: OPAS, 2000b. 62p.

Referências Bibliográficas

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Medicina tradicional - necesidades crecientes y potencial. WHO Policy Perspectives on Medicines (Geneva), n. 2, 2002a. 6p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/who_edm_2002.4_spa.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005. World Health Organization (Geneva), 2002b. 74p. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2008.

YANG, J. C.; CHIEN, C. T. A new approach for the prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection via upregulation of autophagy and downregulation of apoptosis. **Autophagy**, v. 5, n. 3, p. 413-414, 2009.

YASUNAKA, D. S.; BONFIM, N. M.; COELHO, R. M.; MACEDO, C. S.; SCHLEDER, J. D.; ROEL, A. R.; CARDOSO, C. A.; JELLER, A. H. Triterpenos ácidos isolados das folhas de *Anacardium humile* e atividade antimicrobiana. In: **XVI Encontro de Química da Região Sul**, 2008, Blumenau, SC, Brasil.

YESILADA, E.; GURBUZ, I.; SHIBATA, H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 3, p. 289-293, 1999.

YILDIZ, G.; DEMIRYÜREK, T. Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 39, n.3, p. 179-184, 1998.

YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. Chemistry and function of vegetable polyphenols with high molecular weights. **Biofactors**, v. 13, n. 1-4, p. 121-125, 2000.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.

Referências Bibliográficas

YUEN, B.; ZBINDEN, R.; FRIED, M.; BAUERFEIND, P.; BERNARDI, M. Cultural recovery and determination of antimicrobial susceptibility in *Helicobacter pylori* by using commercial transport and isolation media. **Infection**, v. 33, n. 2, p. 77-81, 2005.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª ed. Santa Catarina: Argos editora, 2001. 524p.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 56, suppl. 1, p. 210-231, 2005.

ZHANG, Z. W.; FARTHING, M. J. The roles of vitamin C in *Helicobacter pylori* associated gastric carcinogenesis. **Chin. J. Dig. Dis.**, v. 6, n. 2, p. 53-58, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

ZHU, Y. P.; WOERDENBAG, H. J. Traditional Chinese herbal medicine. **Pharm. World Sci.**, v. 17, n. 4, p. 103-111, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Procedência de reagentes, preparo de meios e soluções**A.1. Procedência de meios e reagentes**

Acumedia: caldo BHI, ágar Columbia;

Cultilab: soro fetal bovino;

Difco: caldo Mueller Hinton ágar, ágar Mueller Hinton;

Genix: amoxicilina (lote F406087);

Hipolabor: heparina sódica;

Instituto Adolfo Lutz: meio Eagle;

Merck: cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio (NaCl), fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), fosfato dibásico de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), fosfato monobásico de sódio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH);

Natural Pharma: metronidazol (lote W215279);

Qhemis: ácido acético, álcool metílico PA, álcool etílico PA;

Reagen: fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4);

Sigma-Aldrich: DMSO, DPPH, Histopaque[®] 1077, luminol sódico, quercetina, trolox, vermelho neutro, zymosan A;

Zodiac: Tecnoptatin[®] (cisplatina).

A.2. Preparo de meios, soluções e reagentes**A.2.1. Caldo BHI**

Hidratar 3,0 g do meio em 100 mL de água destilada ou deionizada, aquecer, distribuir em tubos e autoclavar por 15 minutos a 121°C. Posteriormente, manter o meio sob refrigeração (4-8°C).

A.2.2. Ágar Columbia

Hidratar 4,3 g de meio em 100 mL de água destilada ou deionizada, aquecer e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Para preparação do ágar sangue, resfriar meio estéril (45-50°C) e asepticamente adicionar 10% de sangue de carneiro desfibrinado.

A.2.3. Caldo Mueller Hinton

Hidratar 2,1 g do meio em 100 mL de água destilada ou deionizada, aquecer, distribuir em tubos e autoclavar por 15 minutos a 121°C. Posteriormente, manter o meio sob refrigeração (4-8°C).

A.2.4. Ágar Mueller Hinton

Hidratar 3,8 g de meio em 100 mL de água destilada ou deionizada, aquecer e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Para preparação do ágar sangue, resfriar meio estéril (45-50°C) e asepticamente adicionar 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

A.2.5. Solução salina tamponada (PBS) 25 vezes concentrada

Solução A

Na₂HPO₄ x 2 H₂O.....27,400 g

água deionizada.....q.s.p.....386 mL

Solução B

NaH₂PO₄ x H₂O.....7,875 g

água deionizada.....q.s.p.....114 mL

Preparar, inicialmente, as soluções A e B. Após completa dissolução dos sais, misturar as duas soluções e adicionar pouco menos de 500 mL de água deionizada. Ajustar o pH para 7,2 utilizando solução de NaOH 4N, completar o volume para 1000 mL e autoclavar (121°C,

15 min). Para preparação da solução tamponada de uso (PBS 0,01 M) utilizar 40 mL de tampão estoque, 8,5 g de NaCl e completar o volume para 1000 mL utilizando água deionizada. Ajustar o pH, se necessário, e autoclavar (121°C, 15 min). Armazenar sob refrigeração (4-8°C).

A.2.6. Tampão PBS Dulbecco's (PBSD)

NaCl.....	8,00 g
KCl.....	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O.....	0,10 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O.....	0,10 g
Água deionizada.....	q.s.p.....1000 mL

Inicialmente, dissolver os quatro primeiros sais em aproximadamente 700 mL de água deionizada. Em outro recipiente dissolver o cloreto de cálcio e cloreto de magnésio em aproximadamente 200 mL de água. Adicionar, vagarosamente, essa solução ao conteúdo da primeira solução. Acertar o pH para 7,4, ajustar o volume para 1000 mL e esterilizar por filtração utilizando membrana de 0,22 µm. Manter o tampão sempre sob refrigeração (4 a 8°C). Para preparação do PBSD sem cálcio não acrescentar CaCl₂ à preparação.

A.2.7. Solução de vermelho neutro

Preparar solução estoque de vermelho neutro a 5 mg/mL em PBS (pH = 7,2) e estocar no escuro a 4°C, pelo prazo máximo de quinze dias.

A.2.8. Glicogênio de ostra a 5 mg/mL

Suspender 0,05 g de glicogênio de ostra 10 mL de solução salina 0,85% estéril no momento da inoculação.

A.2.9. Suspensão de zymosan (35 mg/mL)

Suspender 0,035 g de zymosan em 5 mL de água deionizada estéril e ferver em banho-maria até formação de uma pasta. Centrifugar por 1 minuto a 2000 rpm, desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 1 mL de tampão PBS. Aliquotar e manter à -20°C. Preparar suspensão de uso no momento da realização do ensaio quimiluminescente.

A.2.10. Solução 10^{-2} M de luminol sódico

Dissolver 0,002 g de luminol sódico em 1 mL de tampão PBS. Aliquotar a solução, mantendo a mesma à -20°C e ao abrigo da luz. Preparar solução de uso no momento da realização do ensaio quimiluminescente.

APÊNDICE B - Padronização de técnica de microdiluição em caldo para determinação da CMI para *H. pylori*

B.1. Avaliação do crescimento de *H. pylori* em diferentes caldos

B.1.2. Metodologia

Cavidades de microplaca (96 cavidades) foram preenchidas com 100 µL de caldo Mueller Hinton ou caldo BHI, suplementado com diferentes concentrações de soro fetal bovino, sobre os quais foi adicionado o mesmo volume da suspensão bacteriana (10^6 UFC/mL de BHI). Imediatamente, leitura espectrofotométrica, em 620 nm, foi realizada e a microplaca incubada a 36°-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂. Após 48 e 72 horas novas leituras de absorvância foram realizadas. A absorvância das suspensões bacterianas obtidas no dia da incubação e após 48 e 72 horas foram descontadas da absorvância do meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes.

B.1.2. Resultados

O crescimento de *H. pylori*, avaliado através de leitura espectrofotométrica, em caldo Mueller Hinton e caldo BHI suplementados ou não com diferentes concentrações de soro fetal bovino (5%, 7,5% e 10%) é apresentado nas Figuras B1 e B2, respectivamente. Os resultados demonstraram melhor crescimento do microrganismo em BHI acrescido de 10% de soro fetal bovino. Com base nesses resultados, caldo BHI suplementado com essa concentração de soro fetal bovino foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos isolados pela técnica de microdiluição em caldo.

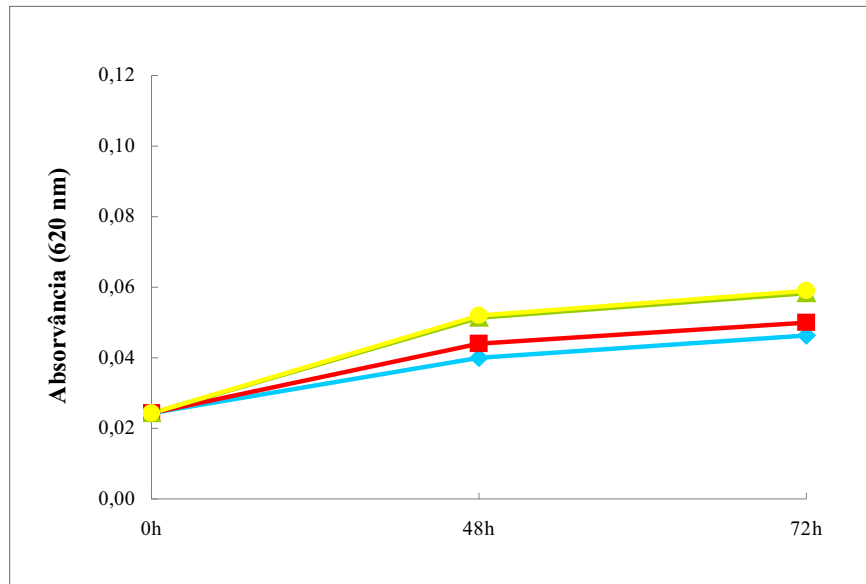


Figura B1 - Crescimento de *H. pylori* em caldo Mueller Hinton (◆) e Mueller Hinton suplementado com 5% (■), 7,5% (▲) e 10% (●) de soro fetal bovino

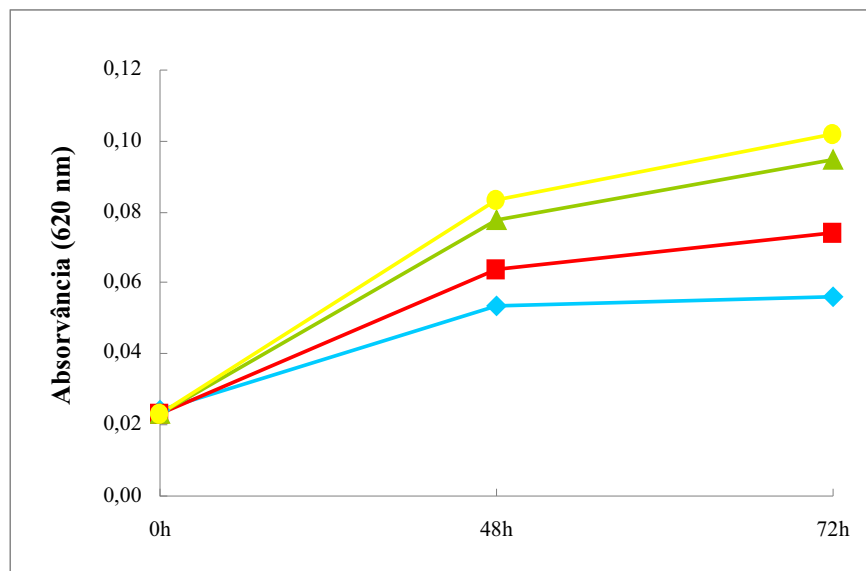


Figura B2 - Crescimento de *H. pylori* em caldo BHI (◆) e BHI suplementado com 5% (■), 7,5% (▲) e 10% (●) de soro fetal bovino

B.2. Determinação da CMI de amoxicilina e metronidazol para *H. pylori* pelo método de microdiluição em caldo e método de diluição em ágar

B.2.1. Microdiluição em caldo

B.2.1.1. Metodologia

Cavidades de microplaca foram preenchidas com 100 µL de caldo BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo diferentes concentrações (0,06 a 256 µg/mL) dos antimicrobianos amoxicilina e metronidazol, sobre os quais foi adicionado o mesmo volume da suspensão de *H. pylori* (10^6 UFC/mL de caldo BHI). Leitura espectrofotométrica em 620 nm foi realizada e a microplaca incubada a 36°-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por 72 horas. Após incubação, a placa foi homogeneizada e nova leitura espectrofotométrica foi realizada em mesmo comprimento de onda. A primeira leitura teve por objetivo eliminar a absorvância inicial a ser descontada do valor obtido após incubação, com a finalidade de computar somente o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata, acompanhados de crescimento controle (na ausência dos antibacterianos) e repetidos, no mínimo, três vezes.

B.2.1.2. Resultados

O efeito da amoxicilina e metronidazol sobre o crescimento de *H. pylori*, determinado através de técnica de microdiluição em caldo, é apresentado na Figura B3. A CMI foi definida como a menor concentração do antibacteriano que inibiu o crescimento visível, sendo de 0,25 µg/mL e 128 µg/mL para amoxicilina e metronidazol, respectivamente.

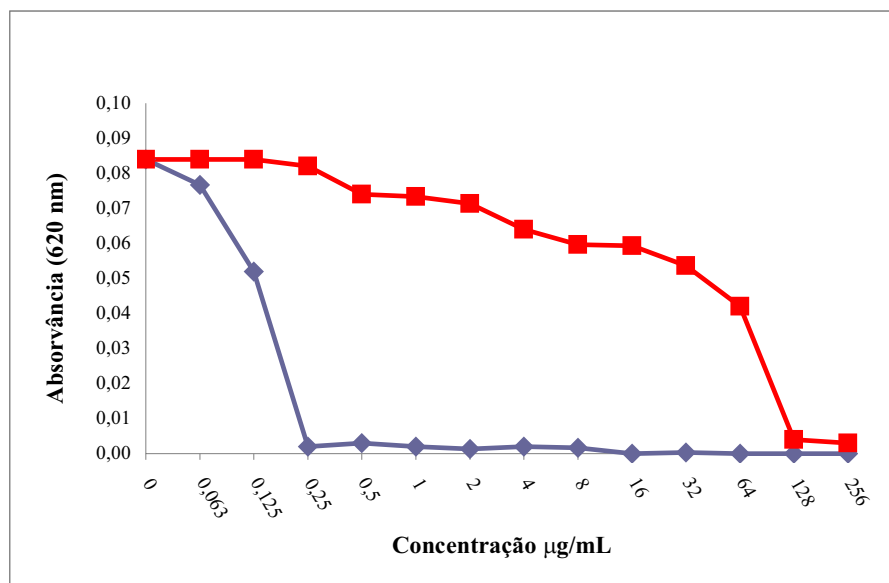


Figura B3 - Efeito de diferentes concentrações de amoxicilina (◆) e metronidazol (■) no crescimento de *H. pylori*

B.2.2. Microdiluição em ágar

B.2.2.1. Metodologia

Para validar a técnica de microdiluição como descrita anteriormente, as CMIs da amoxicilina e metronidazol foram determinadas segundo método de diluição em ágar recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (NCCLS, 1999; OSATO et al., 2001; NCCLS, 2003). Cerca de 3 µL de uma suspensão bacteriana (*H. pylori* ATCC 43504), ajustada a uma densidade ótica de 0,38-0,40 a 620 nm (cerca de 10^8 UFC/mL), foram distribuídos na superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro e contendo diferentes concentrações de amoxicilina e metronidazol. As placas foram incubadas a 36°-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por 72 horas. A menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano em

meio sólido foi considerada a CMI. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes.

B.2.2.2. Resultados

Crescimento bacteriano não foi observado em placas contendo ágar Mueller Hinton adicionado de amoxicilina e metronidazol na concentração de 0,125 µg/mL (MIC) e 128 µg/mL (MIC), respectivamente. O valor da CMI obtido para amoxicilina através do método da diluição em ágar foi de uma diluição abaixo da obtida através da técnica espectrofotométrica, para o metronidazol a CMI foi igual em ambas as técnicas.

B.3. Comentários

O valor da CMI para metronidazol através do método de microdiluição padronizado foi igual ao da técnica de diluição em ágar. Para amoxicilina, a CMI obtida pela técnica de diluição em ágar foi menor, em uma diluição, que a em caldo. Estudos revelam diferença em uma ou duas diluições para CMI obtida por diferentes técnicas, como diluição em ágar, caldo e E-test (PICCOLOMINI et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2004).

A CMI é a concentração mínima do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano visível (NCCLS, 2003; KOBAYASHI et al., 2004). O teste de microdiluição padronizado apresentou confiabilidade como teste de triagem quanto à capacidade de demonstrar a inibição do crescimento de *H. pylori*. Nos ensaios realizados com extratos, frações, mistura de triterpenos e substâncias isoladas, diferenças nas absorvâncias do crescimento bacteriano na presença da amostra em relação ao crescimento controle foram utilizadas para calcular a porcentagem de inibição do crescimento de *H. pylori*. Os resultados foram considerados quantitativamente como CMI quando a diferença foi superior a 90%, visto que antagonistas presentes no meio podem permitir um ligeiro crescimento do microrganismo, conforme já descrito para trimetoprim e sulfonamida (NCCLS, 2003; ABBIODISK, 2007).

APÊNDICE C - Análise de regressão linear para determinação do IC₅₀

Nos ensaios de citotoxicidade realizados com os extratos, frações, mistura de triterpenóides e compostos fenólicos, quando foi possível estabelecer uma reta de regressão linear, determinou-se o IC₅₀. Coeficiente de correlação próximo a -1 demonstra a força de relação (inversa) entre duas variáveis (concentração e absorvância). A decisão de aceitar ou não a regressão foi realizada comparando-se o valor do F de significação com o nível de significação adotado (0,05). Para F de significação menor 0,05 a hipótese nula foi recusada, aceitando-se o processo de regressão linear. Nas Figuras C1 e C2 mostramos a análise de regressão obtida para um dos extratos e um dos compostos fenólicos estudados.

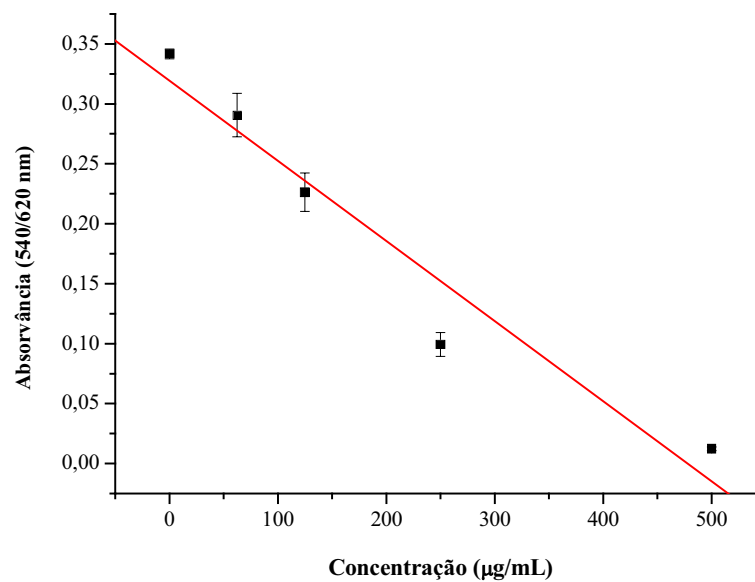


Figura C1 - Efeito dose-resposta de diferentes concentrações do extrato MeOH de *G. noxia* sobre células McCoy

Análise de regressão linear - Guapira noxia (Extrato MeOH)

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	t-Value	Prob> t
A	0,31944	0,02468	12,94547	9,95097E-4
B	-6,68667E-4	9,57567E-5	-6,98298	0,00603

R	R-Square(COD)	Adj. R-Square	Root-MSE(SD)	N
-0,97059	0,94204	0,92272	0,03785	5

Prob>F

0,00603

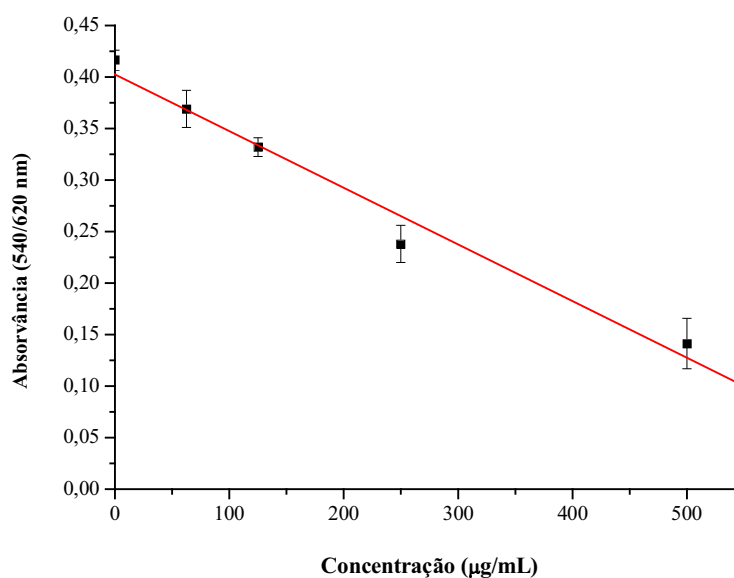


Figura C2 - Efeito dose-resposta de diferentes concentrações da amentoflavona sobre células

McCoy

Análise de regressão linear - Amentoflavona

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	t-Value	Prob> t
A	0,40241	0,01257	32,0105	<0.0001
B	-5,49733E-4	4,87832E-5	-11,26891	0,0015

R	R-Square(COD)	Adj. R-Square	Root-MSE(SD)	N
-0,98839	0,97692	0,96923	0,01928	5

Prob>F

0,0015

APÊNDICE D - Efeito de diferentes concentrações de extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos sobre o crescimento de *H. pylori*

As figuras D1 a D13 demonstram o efeito de diferentes concentrações dos extratos (polares e apolares), frações, mistura de triperpenos e compostos fenólicos sobre crescimento bacteriano (expresso através da absorvância em 620 nm) após período de incubação de 72 horas.

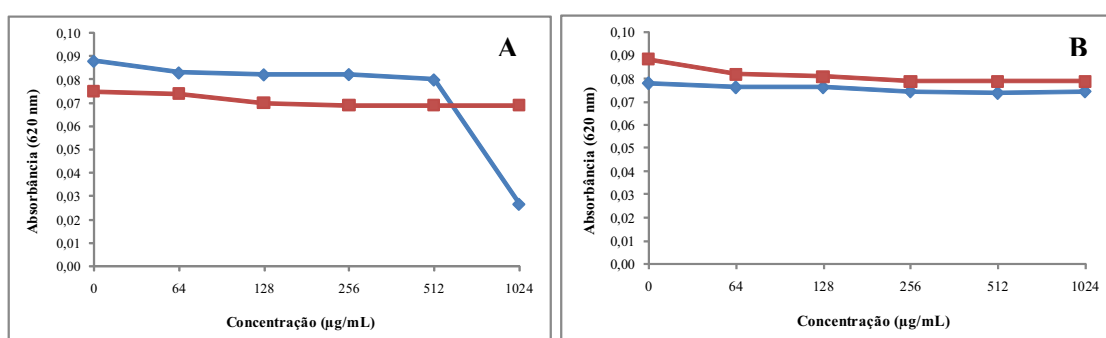


Figura D1 - Efeito de diferentes concentrações de extrato CHCl₃ (♦) e MeOH (■) de (A) *A. gladulosa* e (B) *A. triplinervia* no crescimento de *H. pylori*

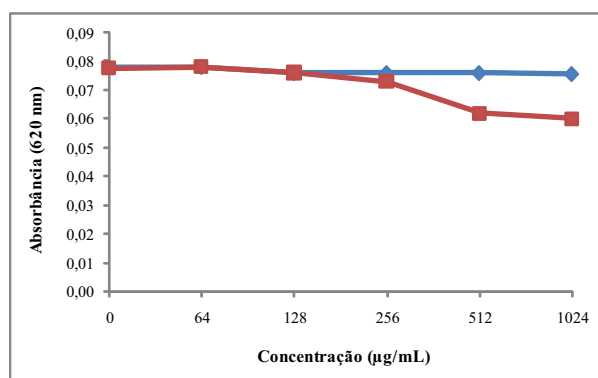


Figura D2 - Efeito de diferentes concentrações de extrato DCM (♦) e MeOH (■) de *A. humile* no crescimento de *H. pylori*

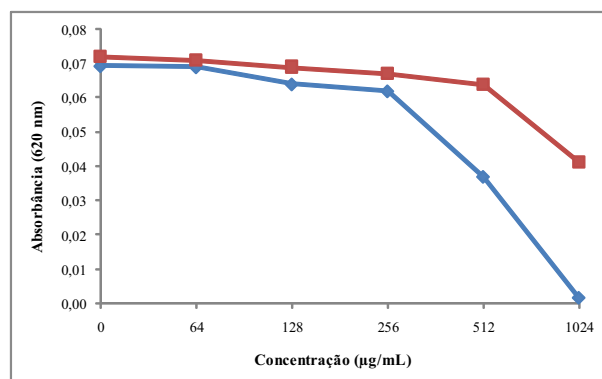


Figura D3 - Efeito de diferentes concentrações de extrato CHCl₃ (♦) e MeOH (■) de *D. elliptica* no crescimento de *H. pylori*

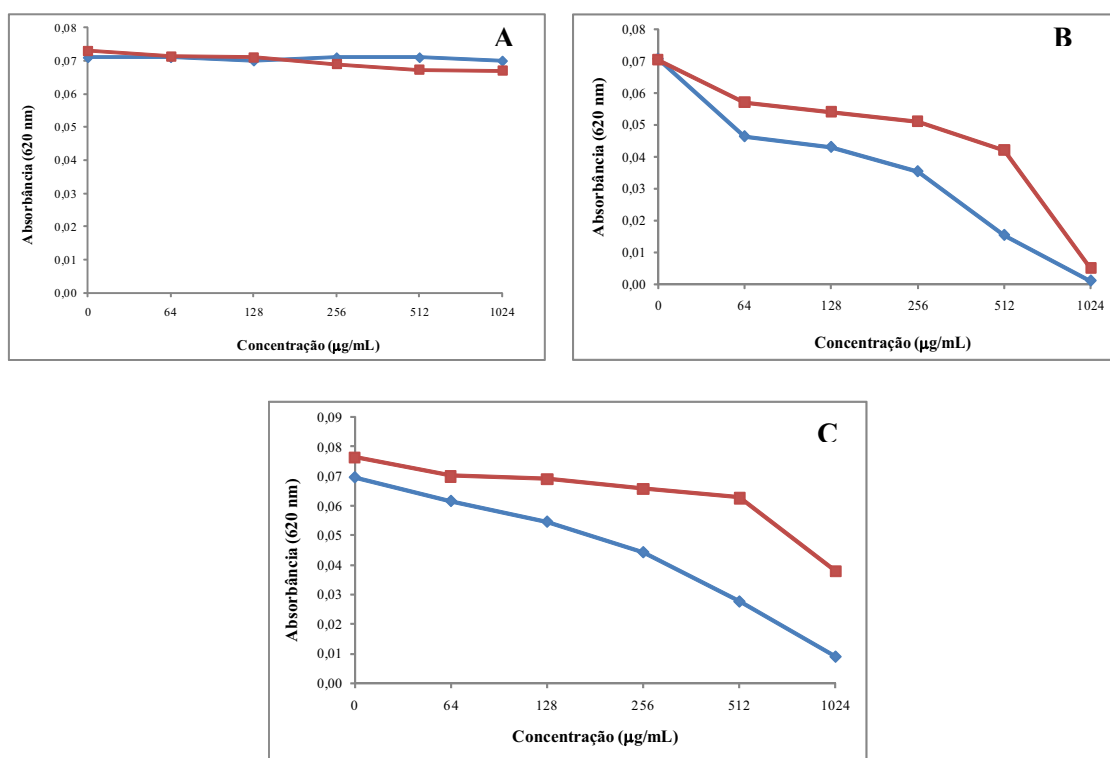


Figura D4 - Efeito de diferentes concentrações de extrato CHCl₃ (♦) e MeOH (■) de (A) *B. basiloba*, (B) *B. crassa* e (C) *B. intermedia* no crescimento de *H. pylori*

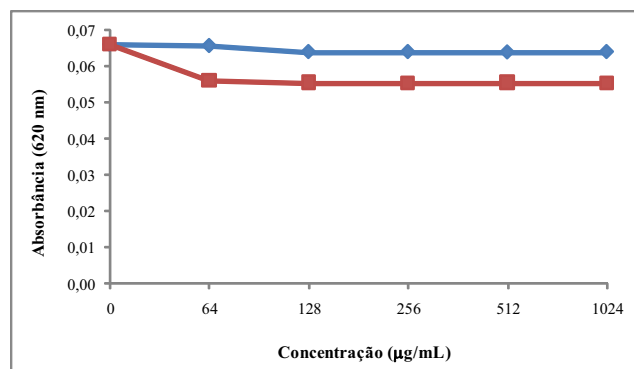


Figura D5 - Efeito de diferentes concentrações de extrato CHCl₃ (♦) e MeOH (■) de *G. noxia* no crescimento de *H. pylori*

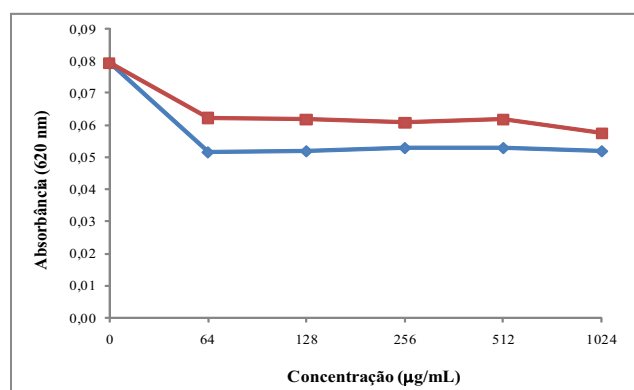


Figura D6 - Efeito de diferentes concentrações de extrato DCM (♦) e MeOH (■) de *M. pusa* no crescimento de *H. pylori*

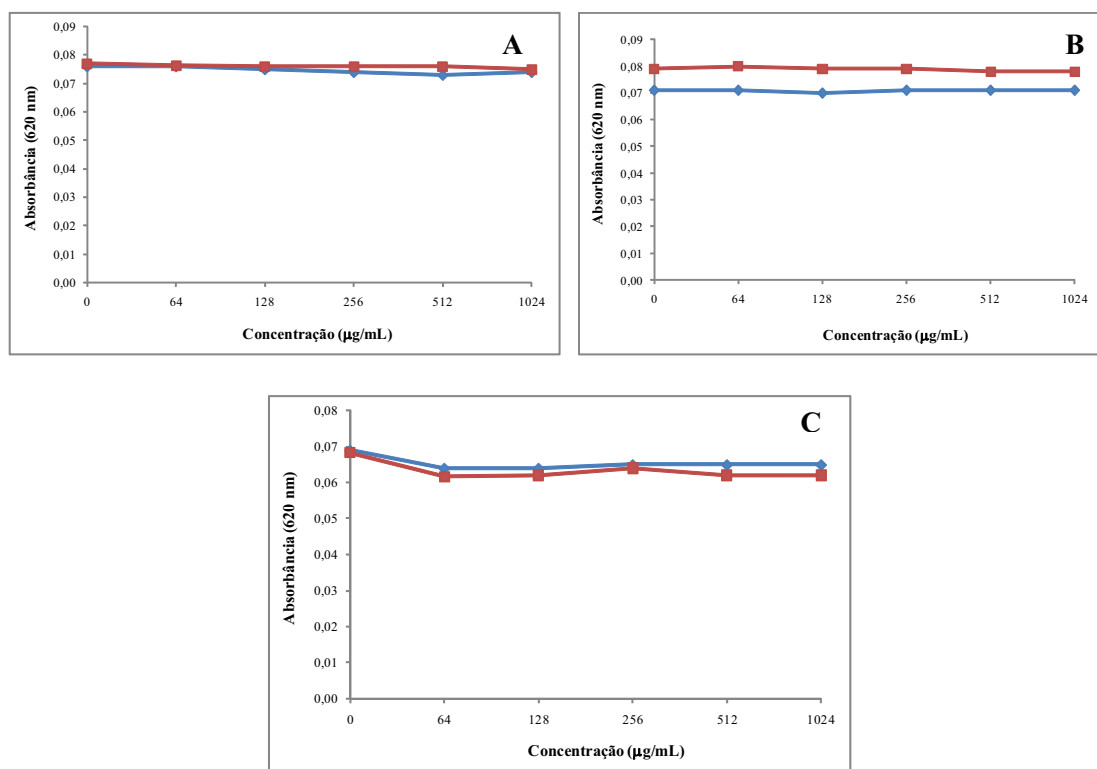


Figura D7 - Efeito de diferentes concentrações de extrato CHCl_3 (\blacklozenge) e MeOH (\blacksquare) de (A) *Q. grandiflora*, (B) *Q. multiflora* e (C) *Q. parviflora* no crescimento de *H. pylori*

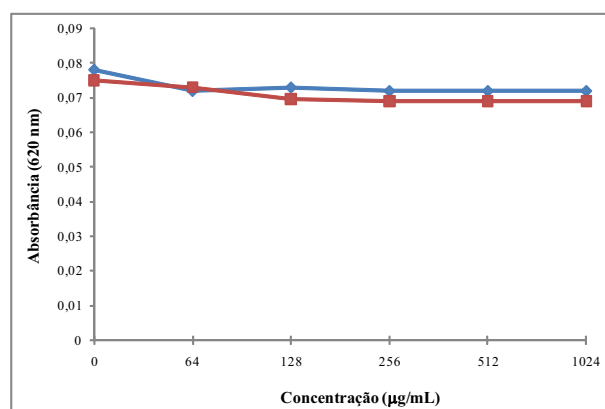


Figura D8 - Efeito de diferentes concentrações de extrato DCM (\blacklozenge) e MeOH (\blacksquare) de *S. pseudoquina* no crescimento de *H. pylori*

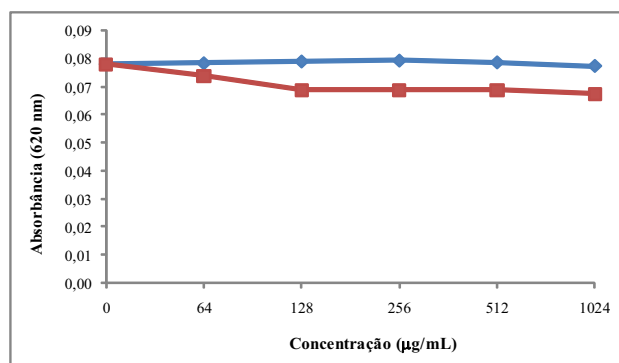


Figura D9 - Efeito de diferentes concentrações da fração aquosa (♦) e fração AcOEt (■) de *B. crassa* no crescimento de *H. pylori*

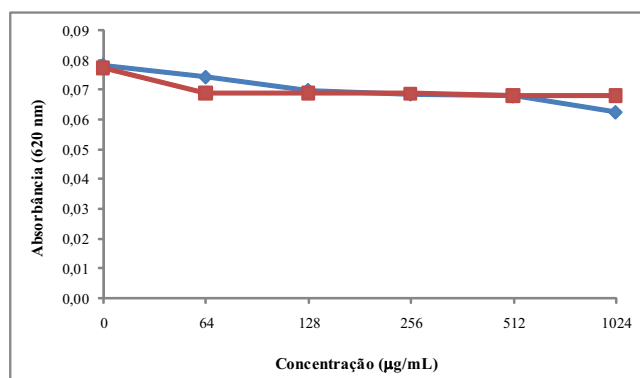


Figura D10 - Efeito de diferentes concentrações da fração flavonoídica (♦) e fração saponinas (■) de *G. noxia* no crescimento de *H. pylori*

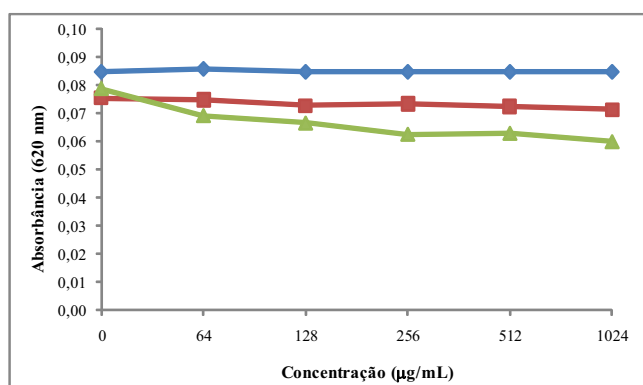


Figura D11 - Efeito de diferentes concentrações da fração alcaloídica (♦), fração intermediária (■) e fração flavonoídica (▲) de *S. pseudoquina* no crescimento de *H. pylori*

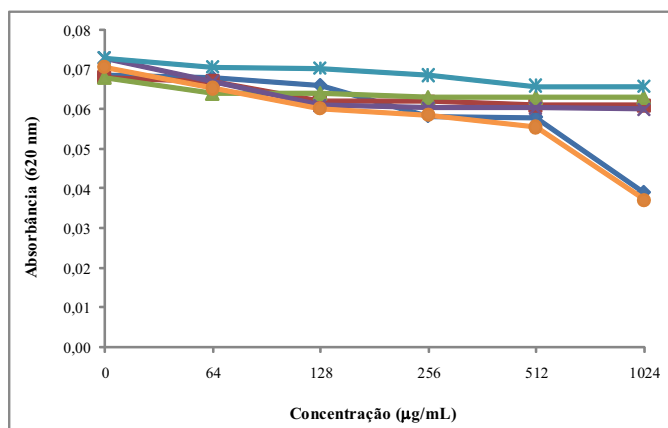


Figura D12 - Efeito de diferentes concentrações de amentoflavona (◆), catequina (■), galato de metila (▲), quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (×), quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (*) e quercetina (●) no crescimento de *H. pylori*

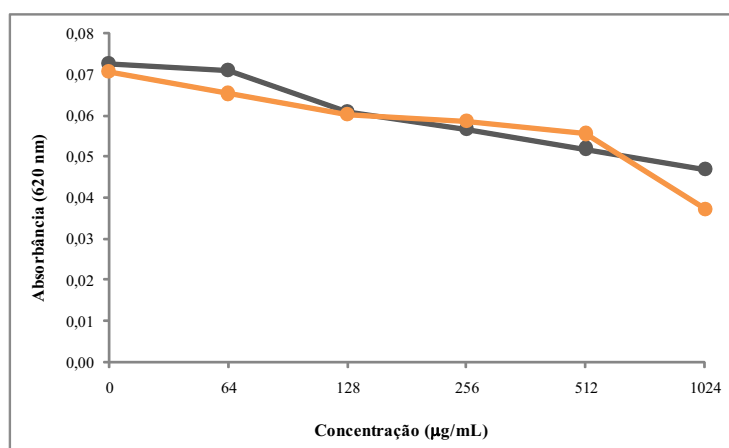


Figura D13 - Efeito de diferentes concentrações da mistura de triterpenos (α-amirina e β-amirina) (●) e quercetina (●) no crescimento de *H. pylori*

APÊNDICE E - Análise de regressão linear para determinação da CE₅₀

Nos ensaios de redução do radical DPPH pelos extratos, frações, mistura de triterpenos e compostos fenólicos, quando foi possível estabelecer uma reta de regressão linear, determinou-se a CE₅₀. A Figura E1 apresenta um gráfico onde foi possível a determinação da CE₅₀ e a Figura E2 um gráfico onde não foi possível realizar análise de regressão linear para determinação da CE₅₀.

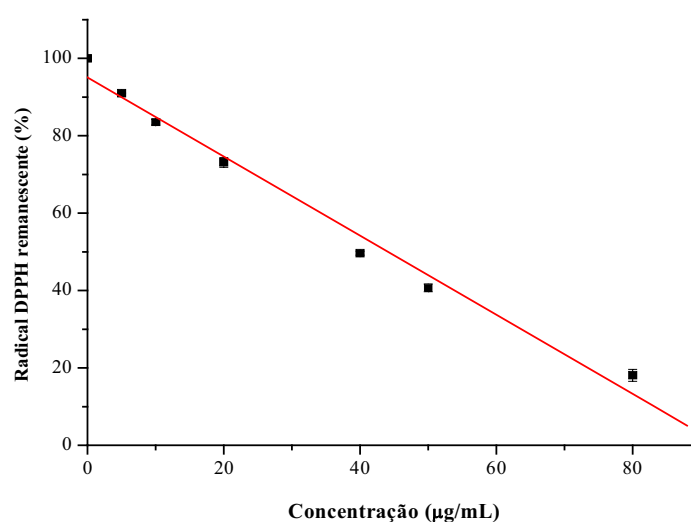


Figura E1 - Efeito dose-resposta de diferentes concentrações do extrato MeOH de *G. noxia* sobre o radical DPPH

Análise de regressão linear - *Guapira noxia* (extrato MeOH)

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	t-Value	Prob> t
A	95,1136	2,29333	41,47401	<0,0001
B	-1,02291	0,05779	-17,70149	<0,0001

R	R-Square(COD)	Adj. R-Square	Root-MSE(SD)	N
-0,99212	0,98429	0,98115	4,09487	7

Prob>F

<0,0001

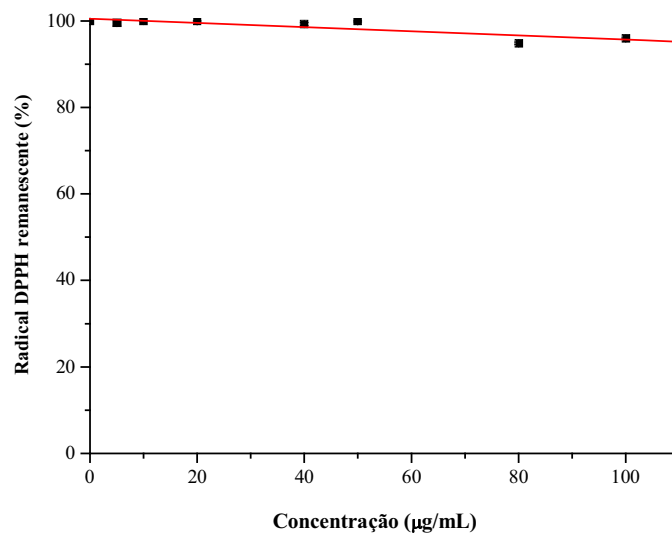


Figura E2 - Efeito dose-resposta de diferentes concentrações do extrato CHCl_3 de *Davilla elliptica* sobre o radical DPPH

Análise de regressão linear – *D. elliptica noxia* (extrato CHCl_3)

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	t-Value	Prob> t
A	0,29875	0,00401	74,48431	<0.0001
B	-0,00206	7,94279E-4	-2,58795	0,04133

R	R-Square(COD)	Adj. R-Square	Root-MSE(SD)	N
-0,62627	0,52747	0,4487	0,00515	8

Prob>F

0,06133

APÊNDICE F - Redução do radical DPPH por extratos apolares, polares, mistura de triterpenos e compostos fenólicos

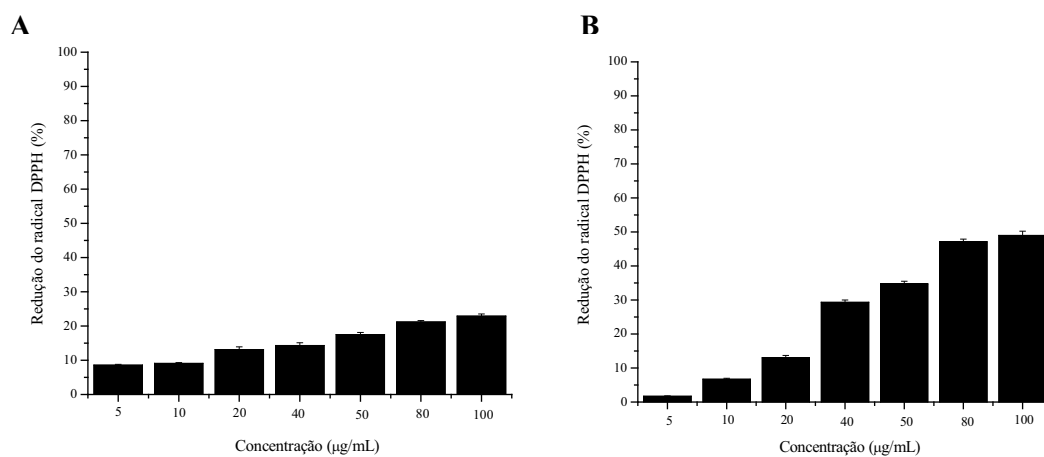


Figura F1 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de (A)

A. gladulosa e (B) *A. triplinervia*

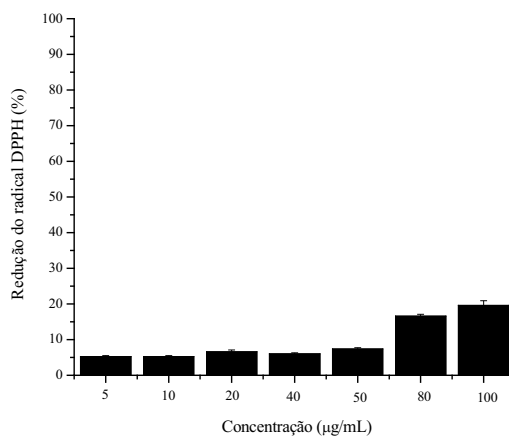


Figura F2 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de

A. humile

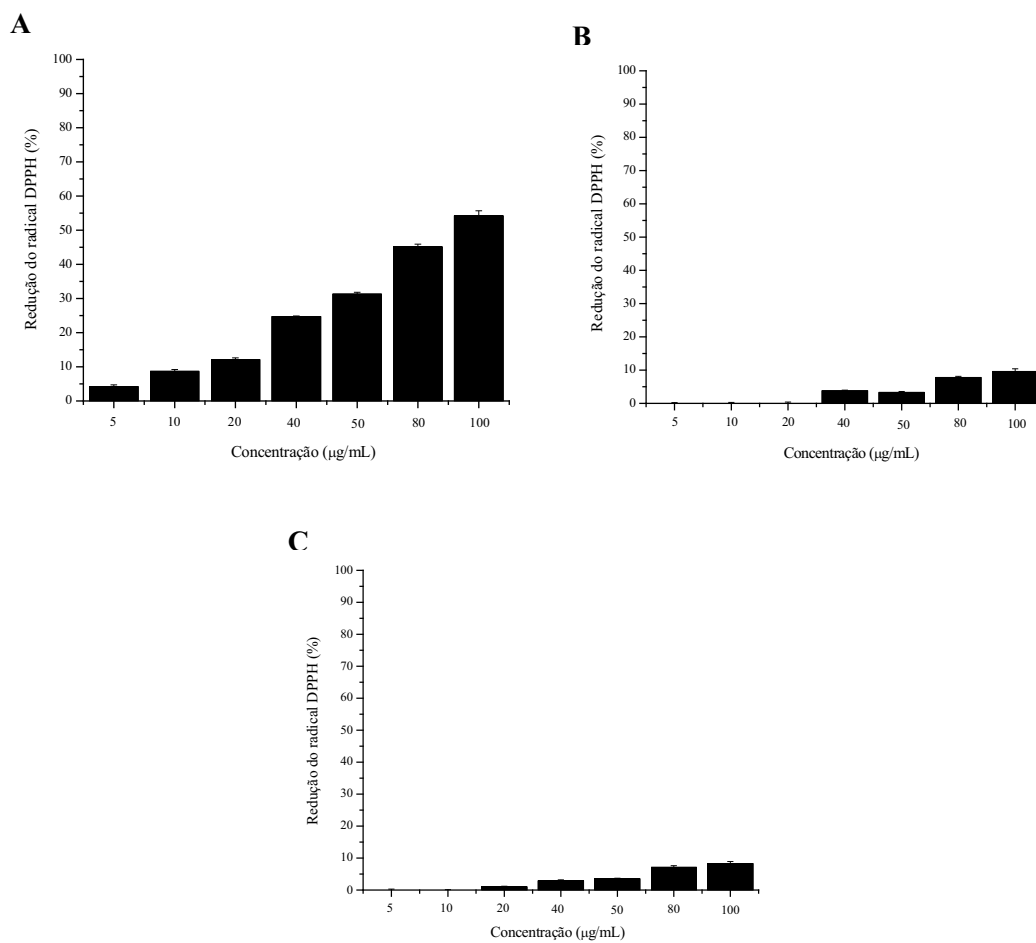


Figura F3 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de (A) *B. basiloba*, (B) *B. crassa* e (C) *B. intermedia*

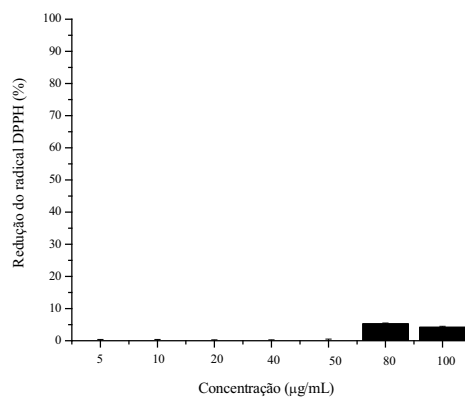


Figura F4 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de *D. elliptica*

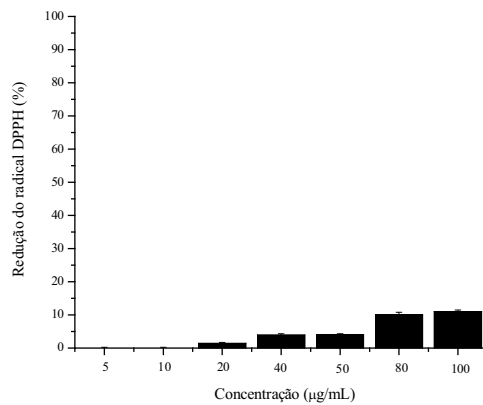


Figura F5 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de *G. noxia*

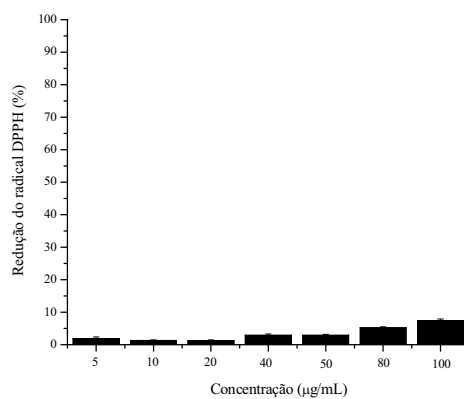


Figura F6 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de *M. pusa*

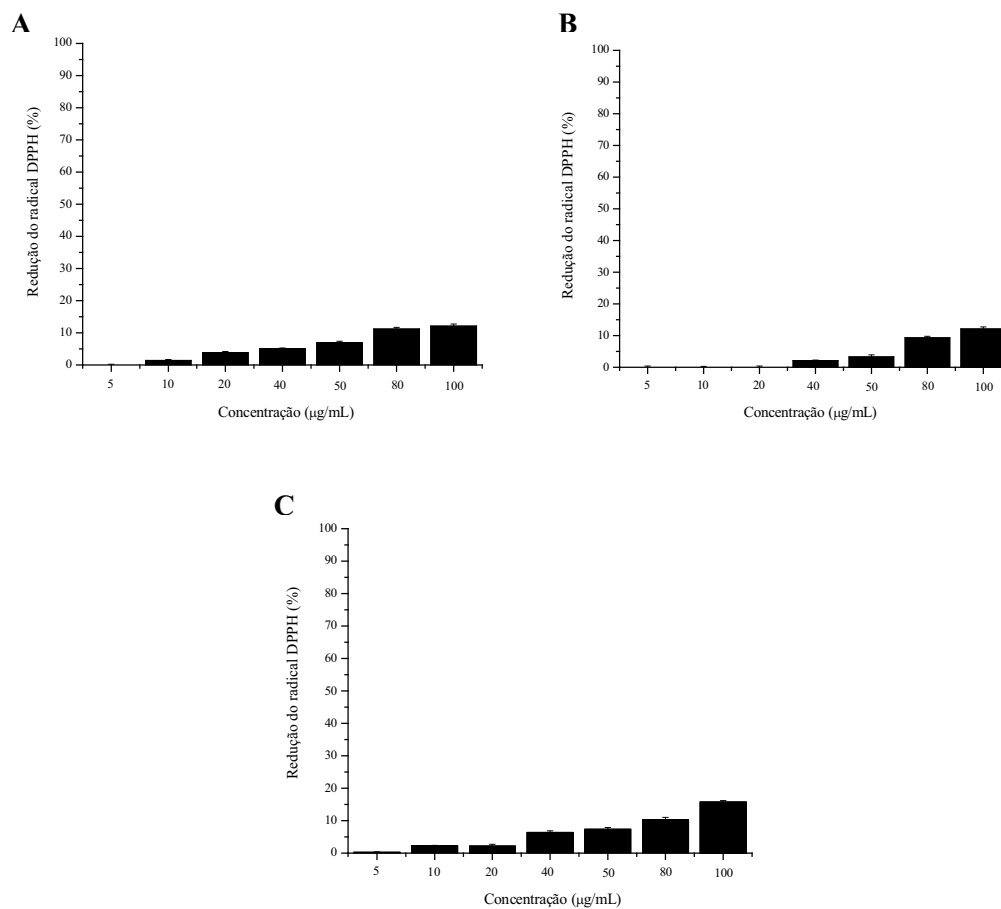


Figura F7 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de (A)

Q. grandiflora, (B) *Q. multiflora* e (C) *Q. parviflora*

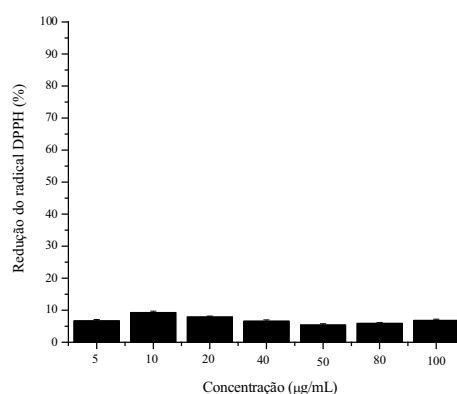


Figura F8 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato CHCl₃ de

S. pseudoquina

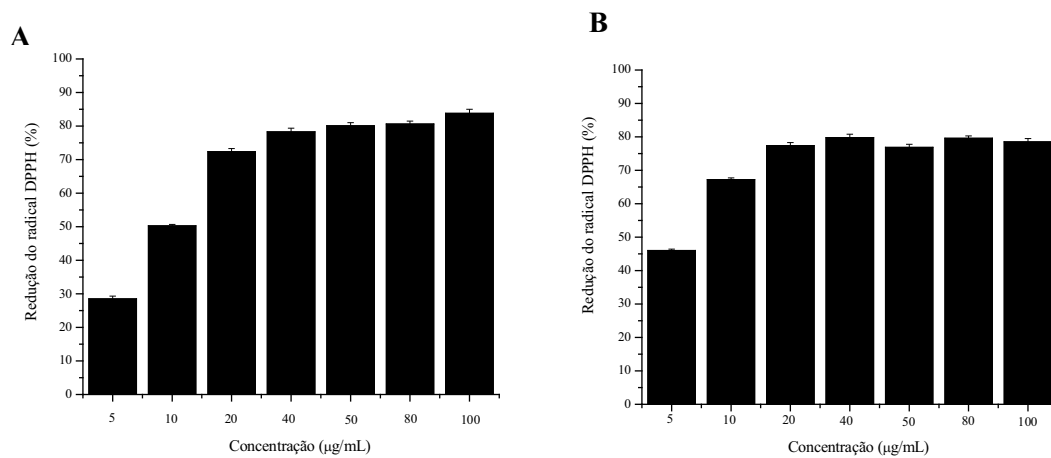


Figura F9 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de (A) *A. gladulosa* e (B) *A. triplinervia*

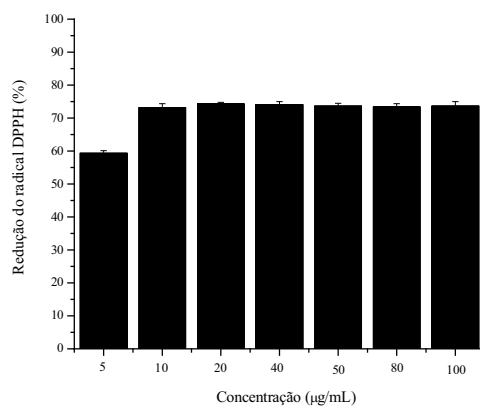


Figura F10 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de *A. humile*

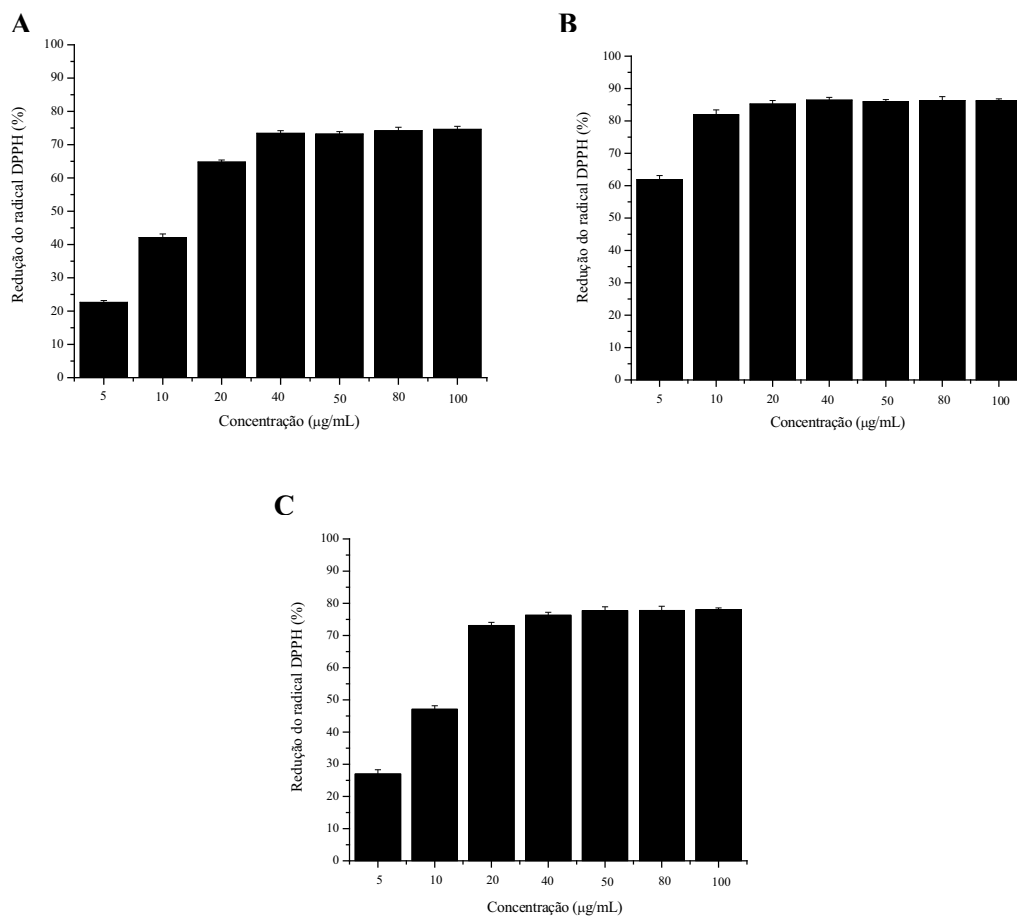


Figura F11 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de (A) *B. basiloba*, (B) *B. crassa* e (C) *B. intermedia*

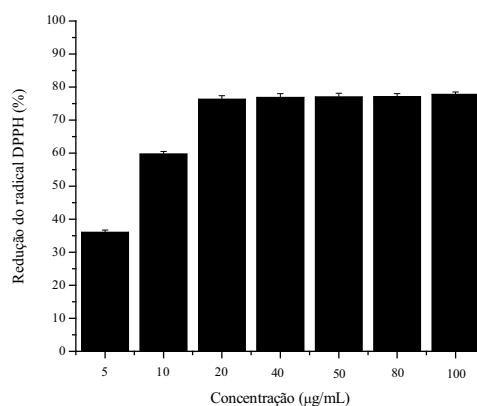


Figura 12 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de *D. elliptica*

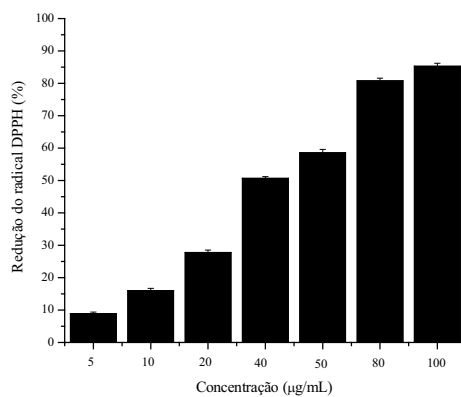


Figura F13 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de *G. noxia*

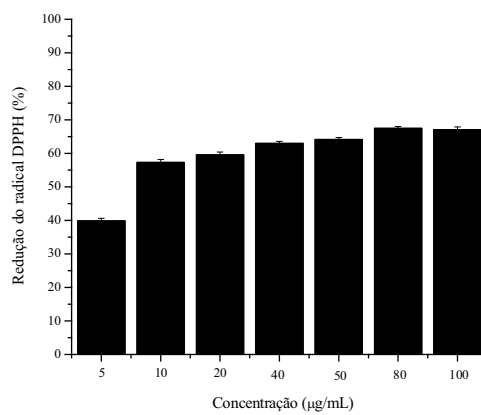


Figura F14 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de *M. pusa*

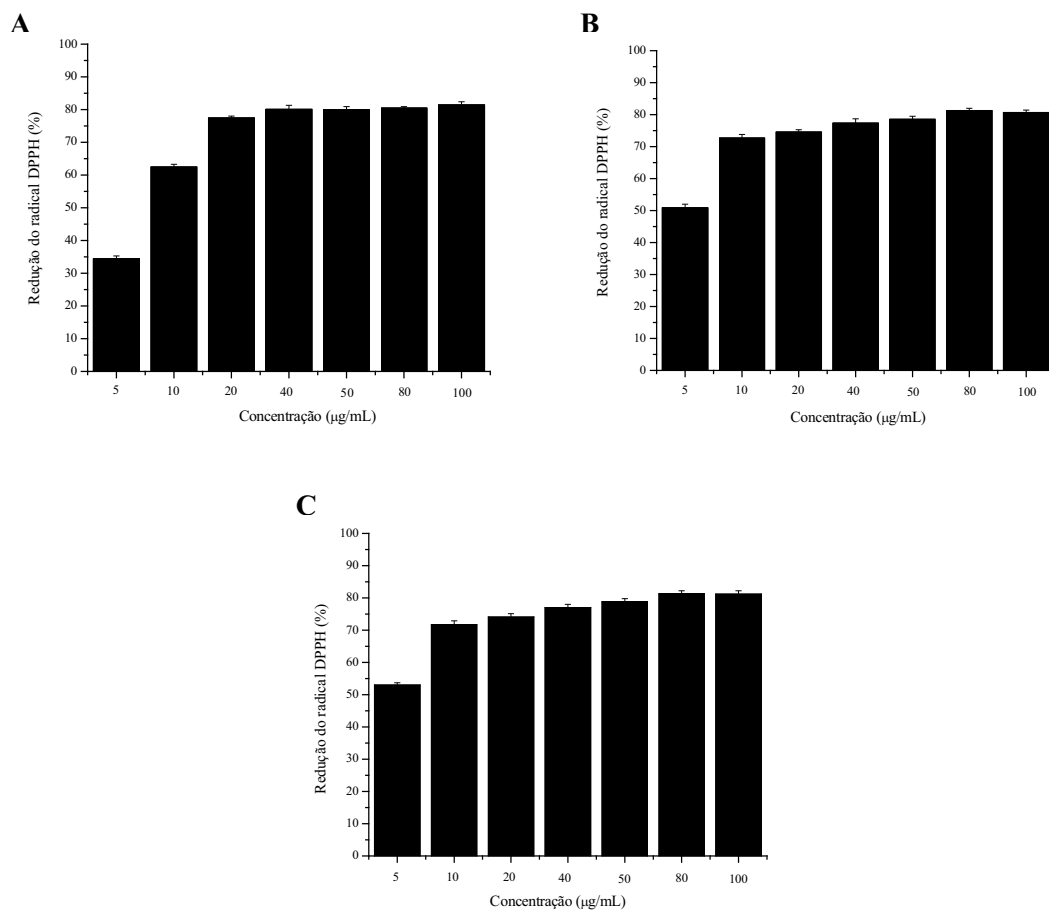


Figura 15 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de (A)

Q. grandiflora, (B) *Q. multiflora* e (C) *Q. parviflora*

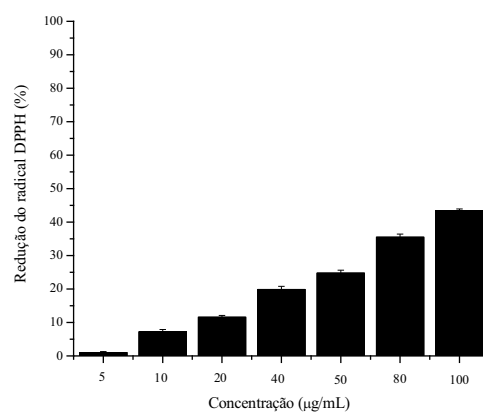


Figura F16 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de extrato MeOH de

S. pseudoquina

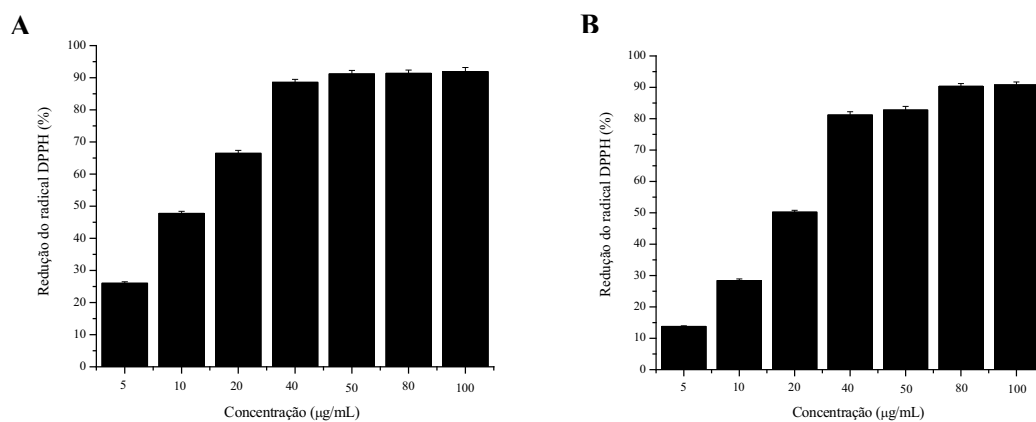


Figura F17 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações da fração (A) aquosa e (B) AcOEt de *B. crassa*

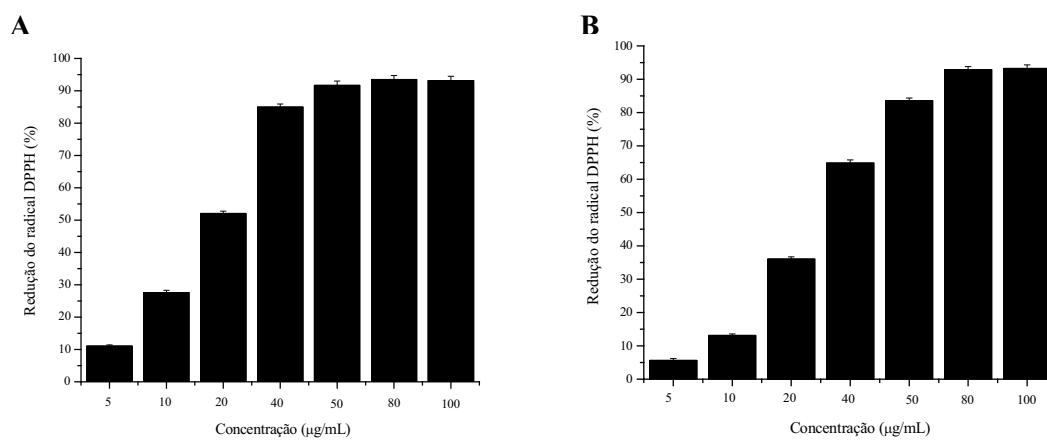


Figura F18 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações da fração (A) flavonoídica e (B) saponinas de *G. noxia*

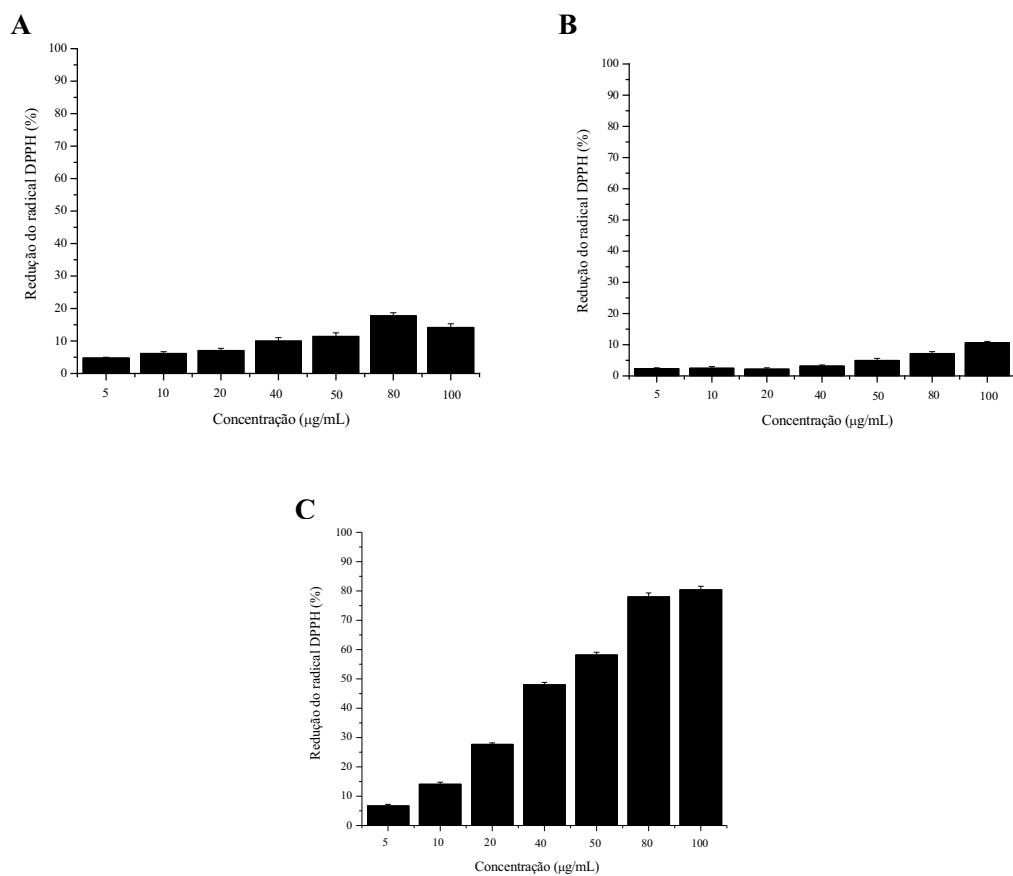


Figura F19 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações da fração (A) alcaloídica, (B) intermediária e (C) flavonoídica de *S. pseudoquina*

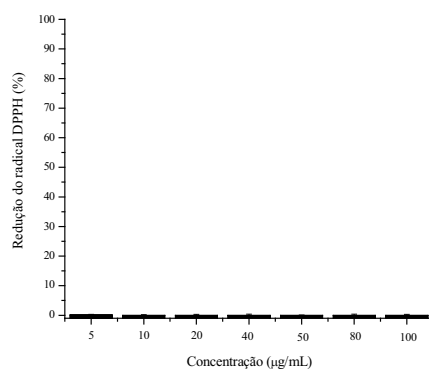


Figura F20 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações da mistura de triterpenóides

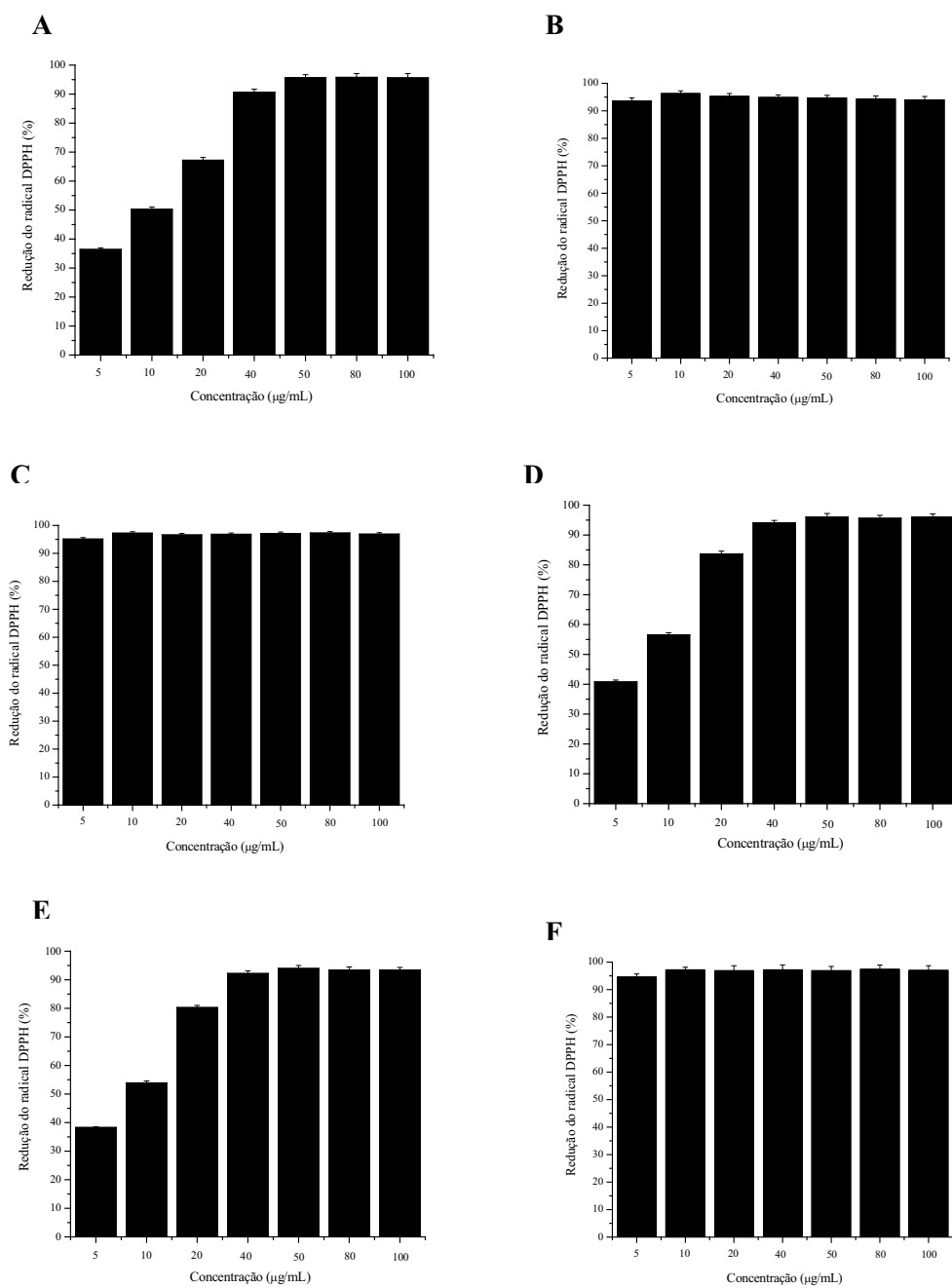
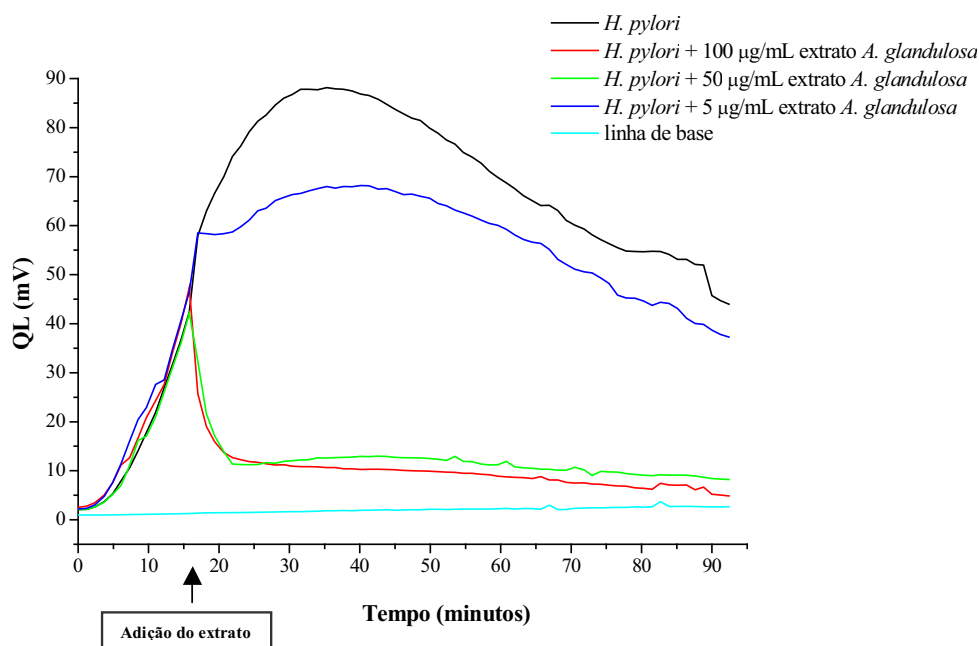


Figura F21 - Redução do radical DPPH por diferentes concentrações de (A) amentoflavona, (B) (+)-catequina, (C) galato de metila, (D) quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo, (E) quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo e (F) quercetina

APÊNDICE G - Cinética dos ensaios quimiluminescentes dependente de luminol em LPMNs estimulados com *H. pylori*

As cinéticas de emissão de luz (F1 a F26) obtidas para os extartos MeOH, frações e compostos fenólicos são representativas de, no mínimo, três experimentos independentes.

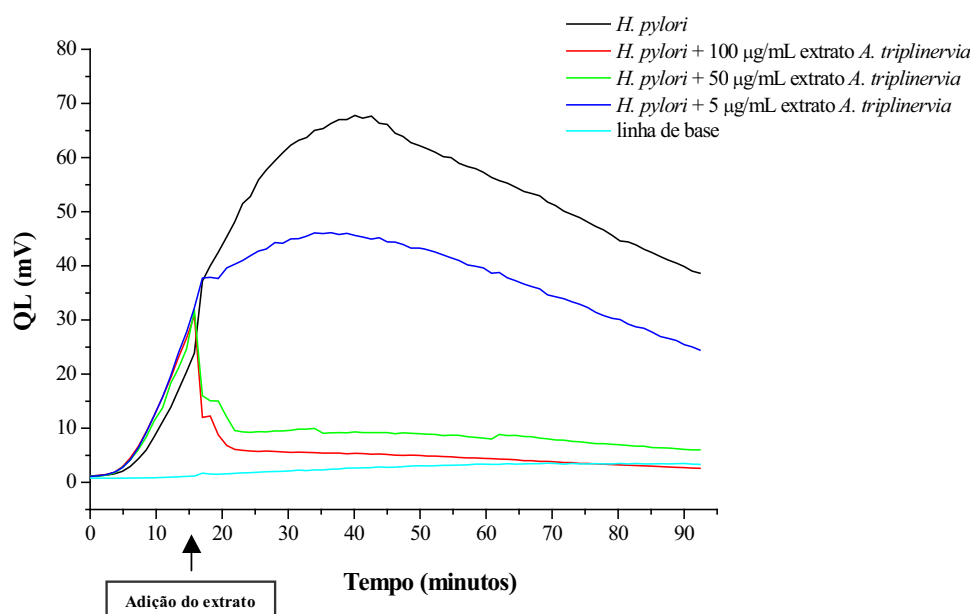
Cinética G1 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *A. glandulosa*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	43,7	$0,52 \times 10^5 \pm 2197$	82,4	< 0,05*
50	38,5	$0,54 \times 10^5 \pm 2279$	81,6	< 0,05*
5	64,5	$2,32 \times 10^5 \pm 9838$	21,6	< 0,05*
controle	84,4	$2,96 \times 10^5 \pm 12542$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

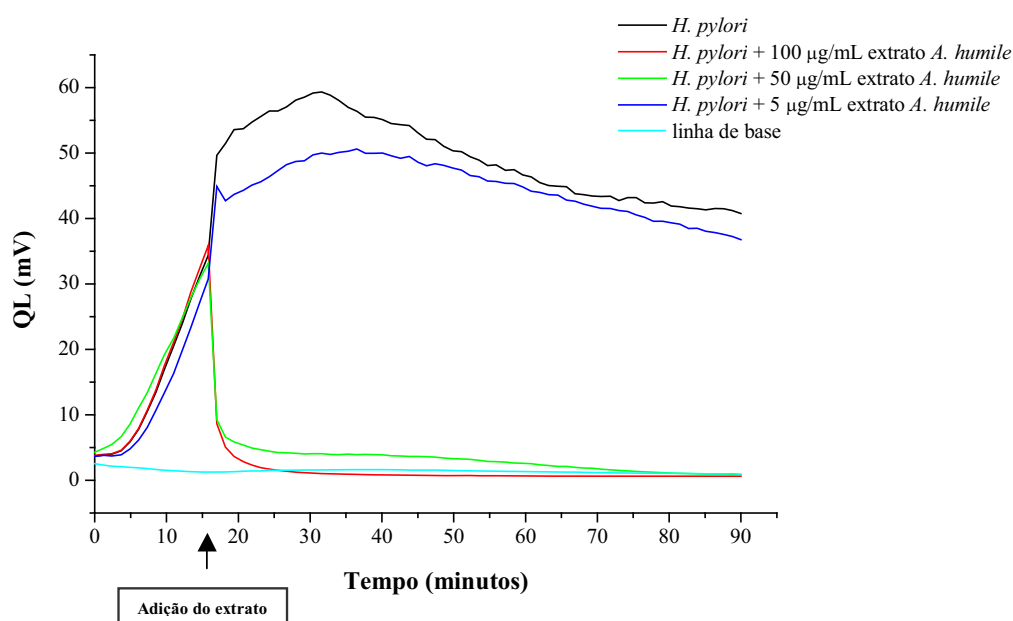
Cinética G2 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *A. triplinervia*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	27,3	$0,23 \times 10^5 \pm 1144$	90,2	< 0,05*
50	28,3	$0,26 \times 10^5 \pm 1301$	88,9	< 0,05*
5	42,6	$1,67 \times 10^5 \pm 8245$	28,6	< 0,05*
controle	64,3	$2,34 \times 10^5 \pm 11565$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

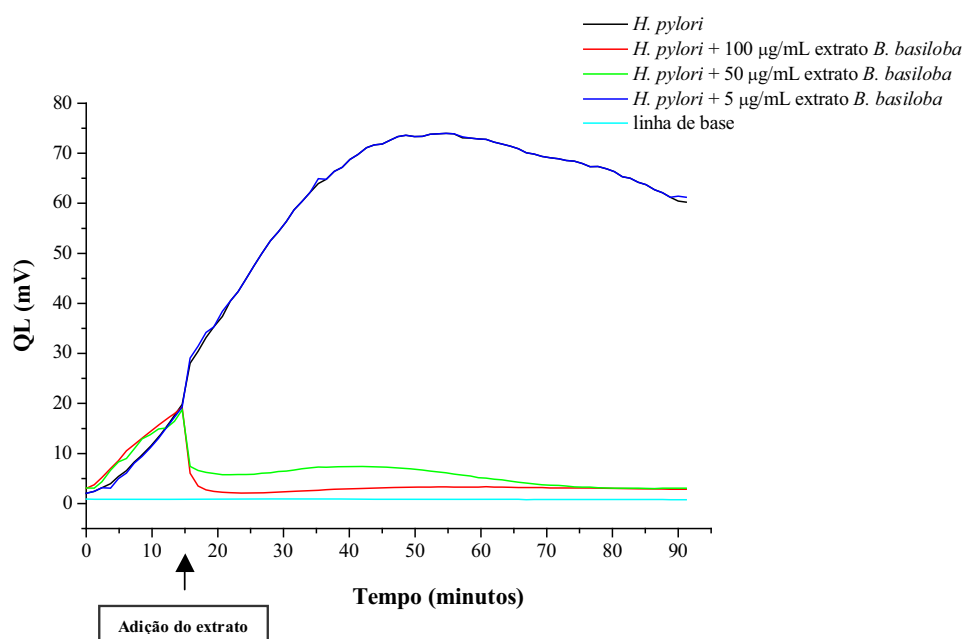
Cinética G3 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *A. humile*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	33,4	$0,11 \times 10^5 \pm 1113$	95,0	< 0,05*
50	30,7	$0,21 \times 10^5 \pm 2047$	90,5	< 0,05*
5	48,1	$2,00 \times 10^5 \pm 8077$	9,1	> 0,05
controle	57,0	$2,20 \times 10^5 \pm 13718$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

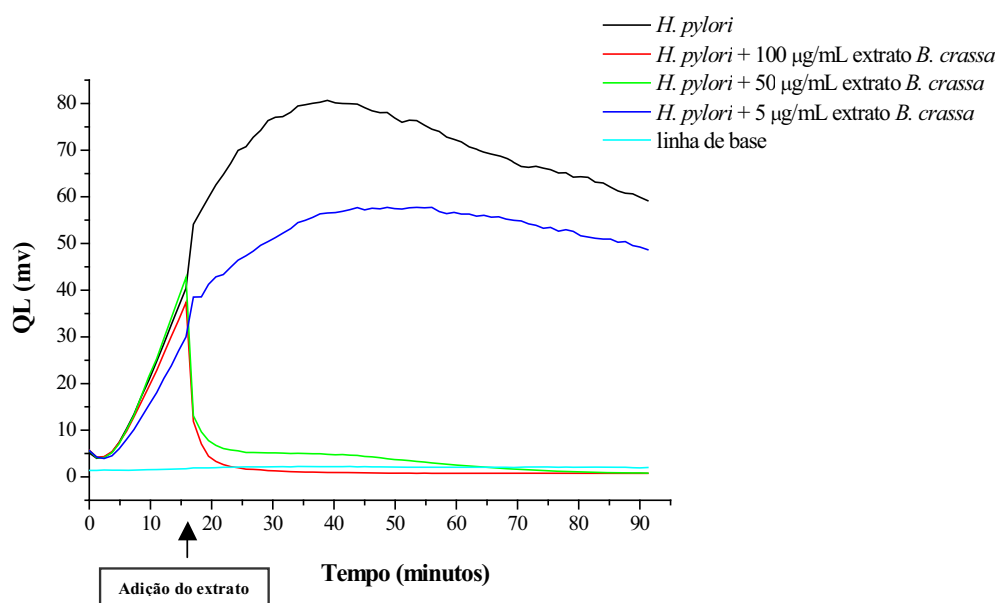
Cinética G4 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *B. basiloba*



Extrato (µg/mL)	Δ QL para IME ¹ (mV)	Δ QL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	19,3	$0,19 \times 10^5 \pm 464$	93,4	< 0,05*
50	19,0	$0,30 \times 10^5 \pm 2376$	89,7	< 0,05*
5	74,1	$2,92 \times 10^5 \pm 8077$	0	> 0,05
controle	74,1	$2,90 \times 10^5 \pm 3502$	-	-

Variação da quimiluminescência (Δ QL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

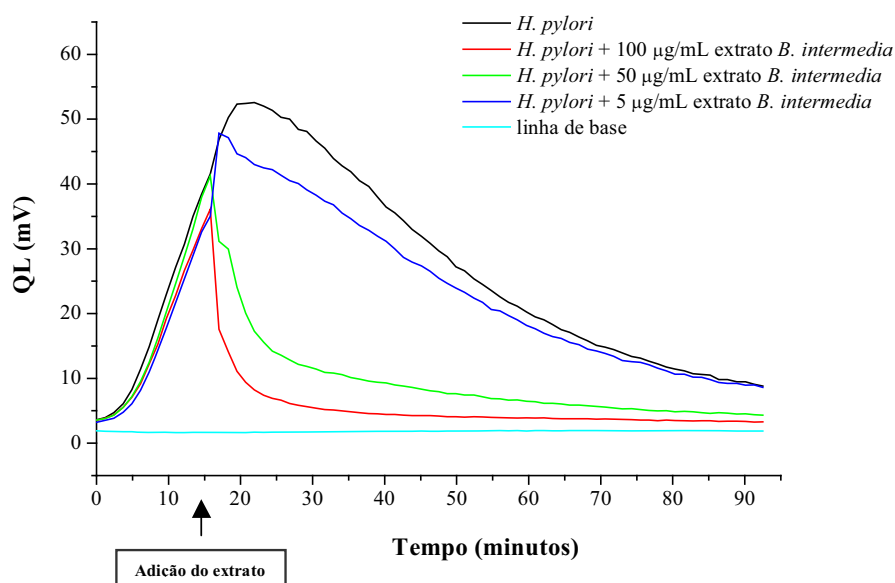
Cinética G5 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *B. crassa*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	35,1	$0,10 \times 10^5 \pm 956$	96,8	< 0,05*
50	40,5	$0,22 \times 10^5 \pm 1982$	93,0	< 0,05*
5	55,5	$2,19 \times 10^5 \pm 20163$	30,5	< 0,05*
controle	78,3	$3,15 \times 10^5 \pm 22334$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

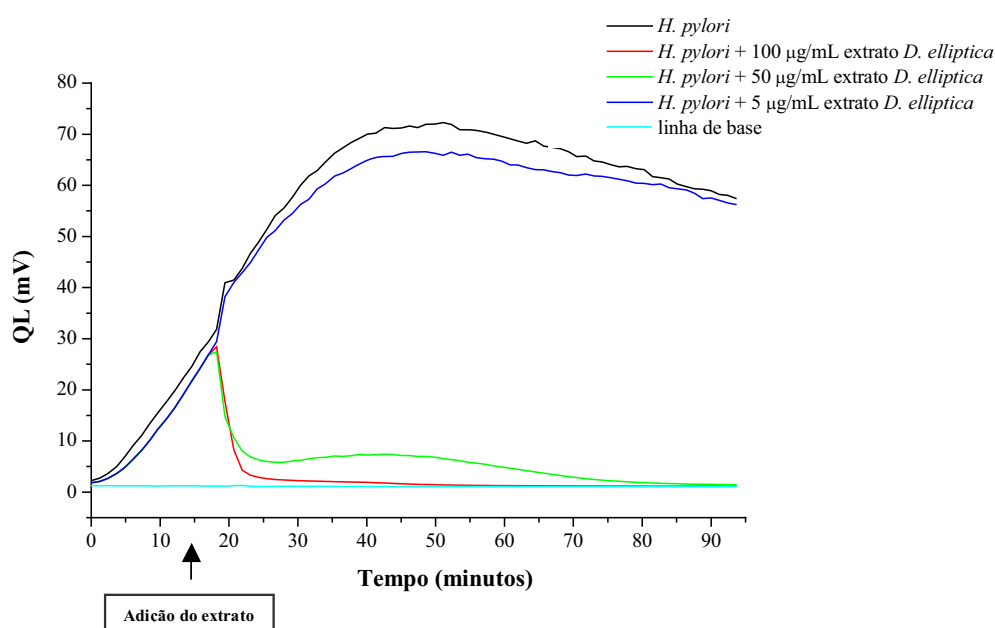
Cinética G6 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *B. intermedia*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	34,2	$0,37 \times 10^5 \pm 2373$	74,1	< 0,05*
50	39,3	$0,57 \times 10^5 \pm 3648$	60,1	< 0,05*
5	46,0	$1,22 \times 10^5 \pm 7767$	14,6	> 0,05
controle	51,0	$1,43 \times 10^5 \pm 9123$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

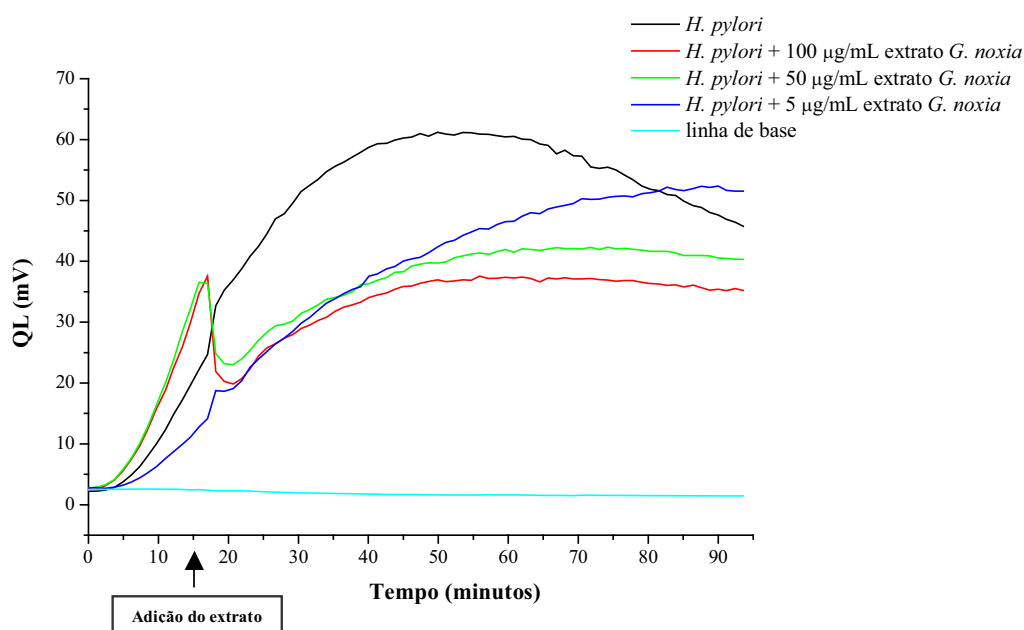
Cinética G7 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *D. elliptica*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	27,1	$0,16 \times 10^5 \pm 891$	94,6	< 0,05*
50	26,1	$0,29 \times 10^5 \pm 1651$	90,3	< 0,05*
5	65,3	$2,80 \times 10^5 \pm 15811$	6,0	> 0,05
controle	71,0	$2,98 \times 10^5 \pm 16869$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

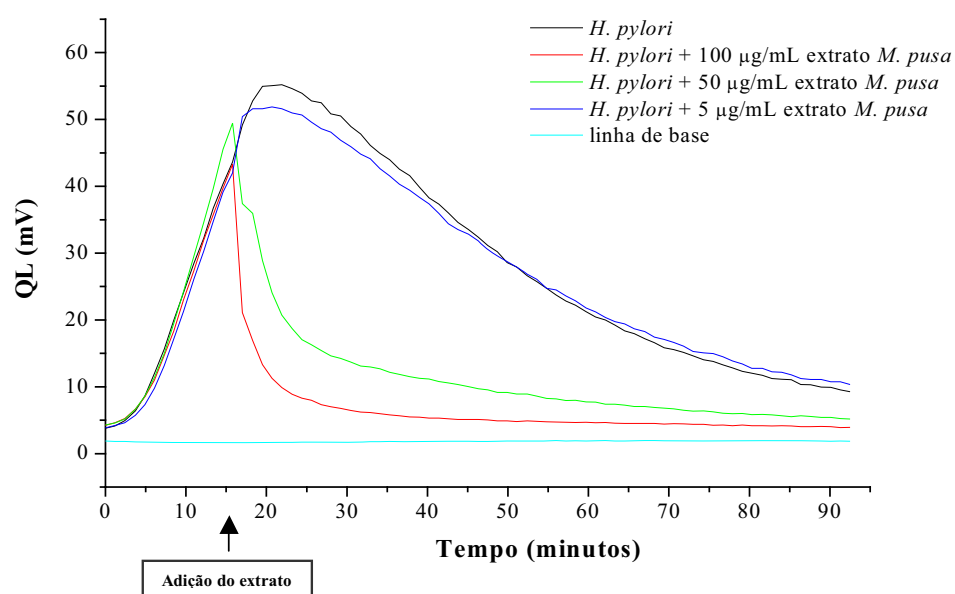
Cinética G8 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *G. noxia*



Extrato (µg/mL)	Δ QL para IME ¹ (mV)	Δ QL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	35,0	$1,55 \times 10^5 \pm 4391$	35,4	< 0,05*
50	39,7	$1,71 \times 10^5 \pm 4842$	28,8	< 0,05*
5	49,8	$1,89 \times 10^5 \pm 5340$	21,3	< 0,05*
controle	58,6	$2,40 \times 10^5 \pm 6787$	-	-

Varição da quimiluminescência (Δ QL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

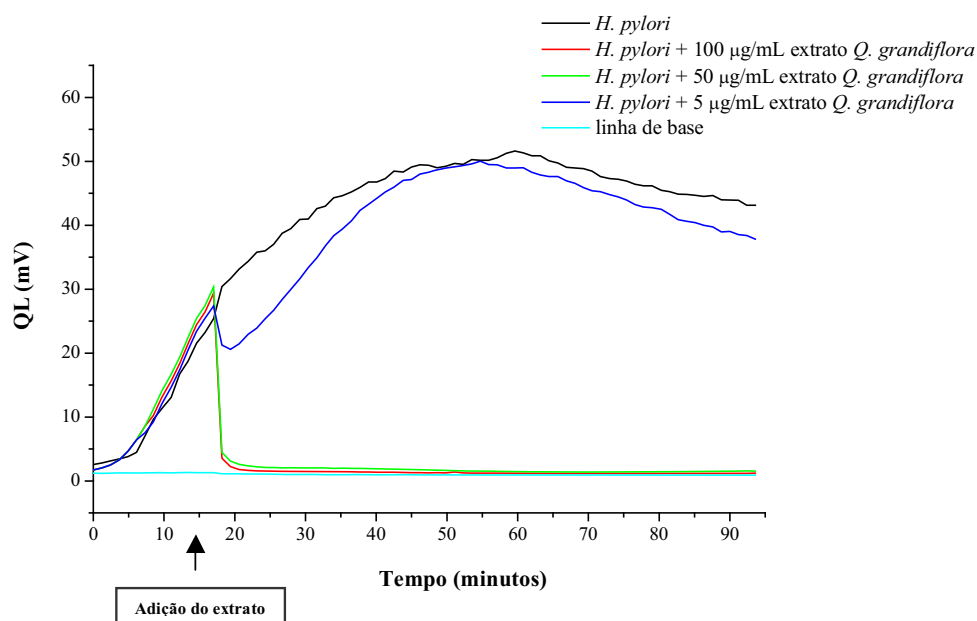
Cinética G9 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *M. pusa*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	41,4	$0,16 \times 10^5 \pm 459$	93,0	< 0,05*
50	47,6	$0,18 \times 10^5 \pm 520$	92,2	< 0,05*
5	50,0	$2,30 \times 10^5 \pm 4127$	0	> 0,05
controle	53,3	$2,30 \times 10^5 \pm 4038$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

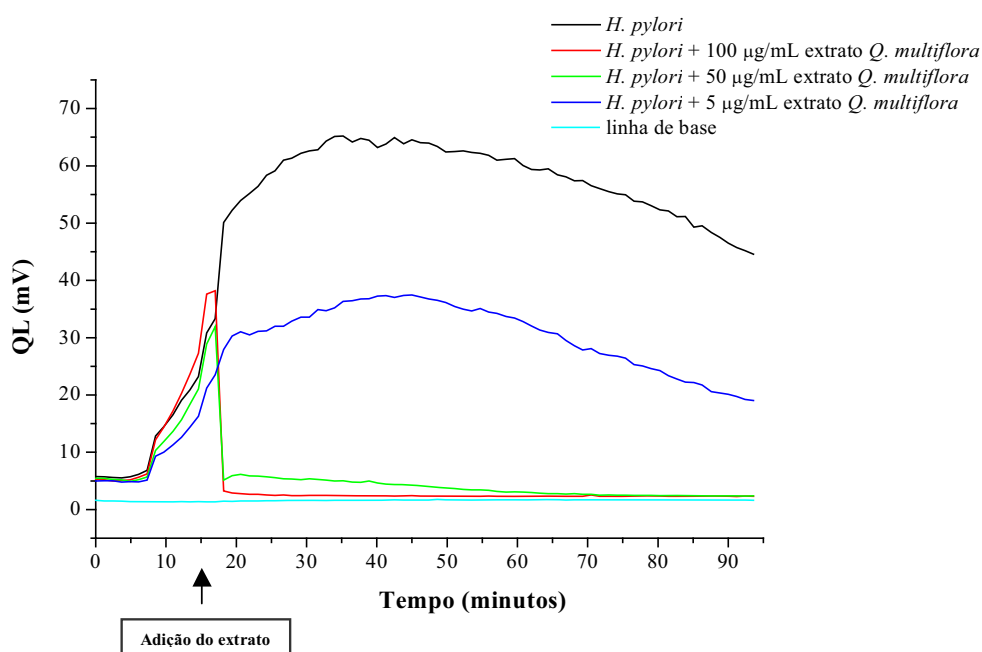
Cinética G10 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *Q. grandiflora*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	28,1	$0,14 \times 10^5 \pm 765$	93,6	< 0,05*
50	29,1	$0,15 \times 10^5 \pm 867$	93,1	< 0,05*
5	48,7	$1,95 \times 10^5 \pm 6878$	10,5	> 0,05
controle	50,3	$2,18 \times 10^5 \pm 7691$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

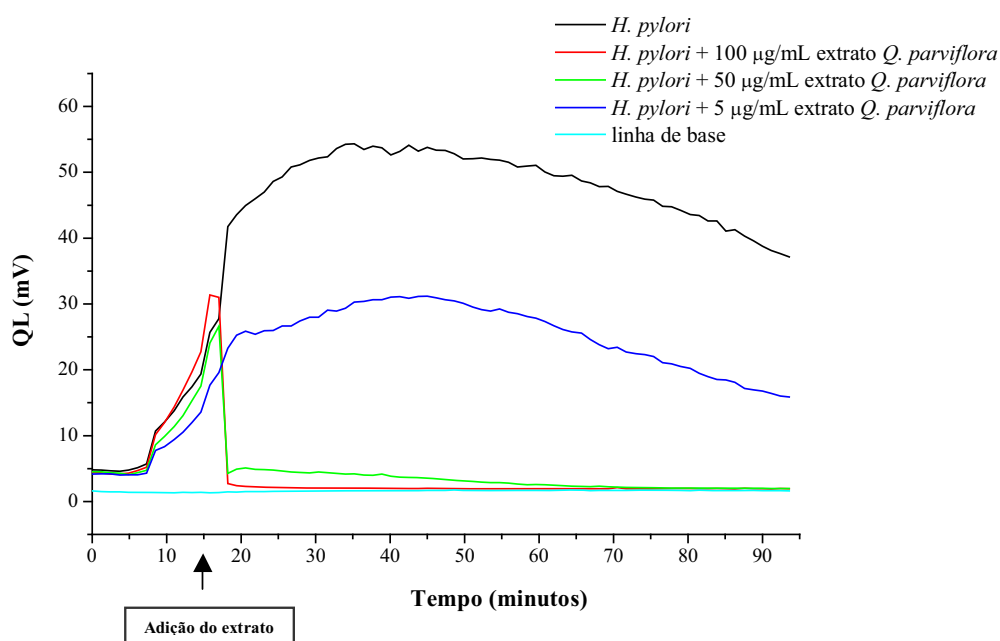
Cinética G11 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *Q. multiflora*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	36,5	$0,13 \times 10^5 \pm 1117$	95,0	< 0,05*
50	30,3	$0,17 \times 10^5 \pm 1432$	93,5	< 0,05*
5	35,7	$1,37 \times 10^5 \pm 11586$	47,3	< 0,05*
controle	63,5	$2,60 \times 10^5 \pm 22417$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

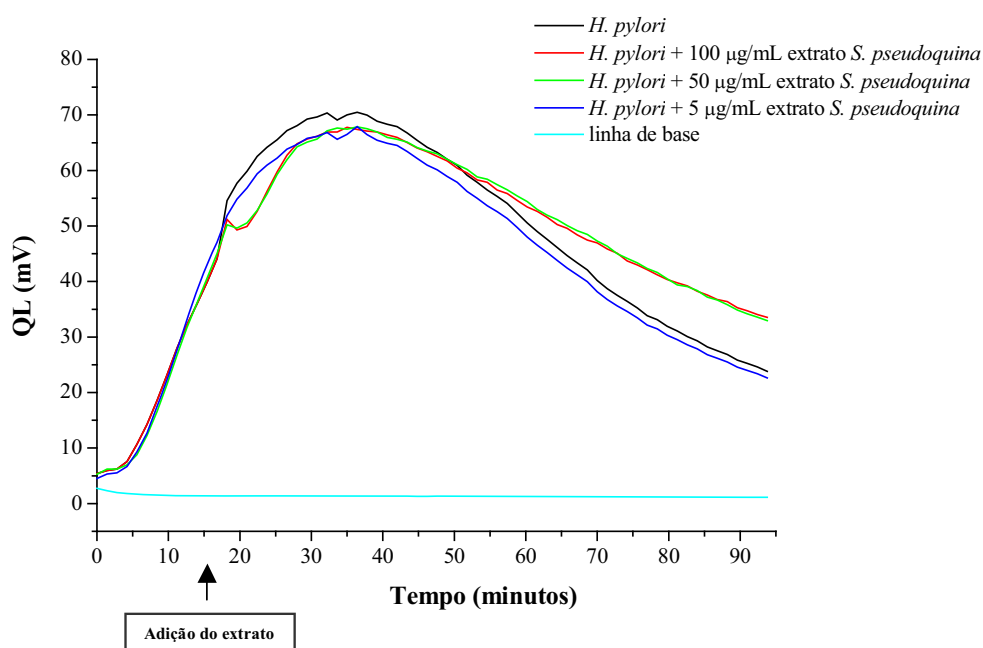
Cinética G12 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *Q. parviflora*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	31,3	$0,11 \times 10^5 \pm 931$	95,0	< 0,05*
50	27,0	$0,14 \times 10^5 \pm 1194$	93,6	< 0,05*
5	31,2	$1,14 \times 10^5 \pm 9655$	48,0	< 0,05*
controle	54,3	$2,20 \times 10^5 \pm 18681$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

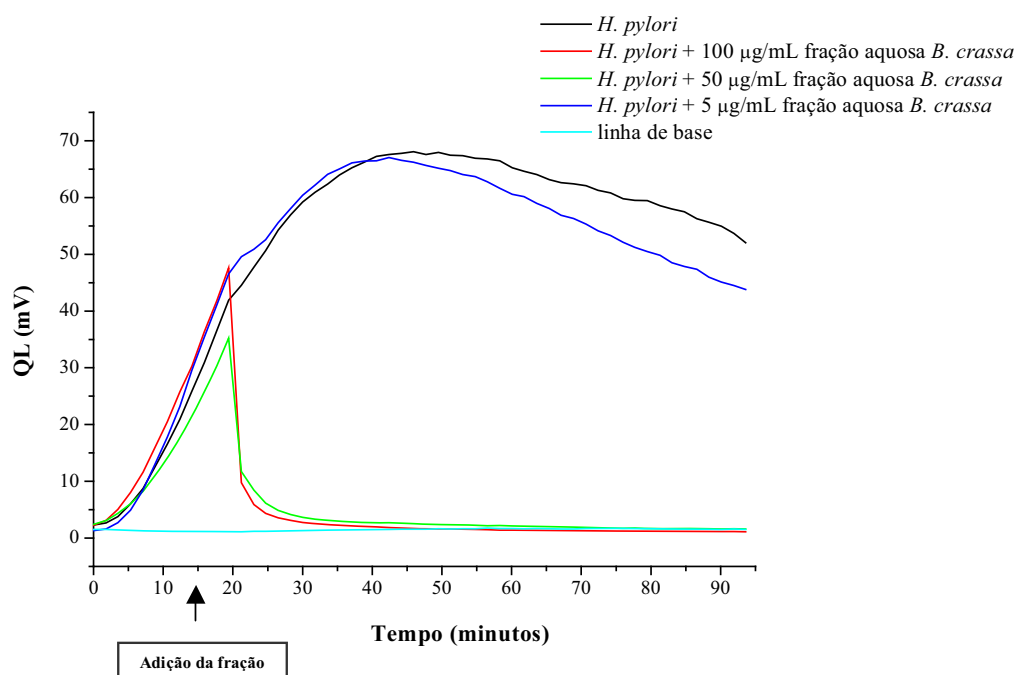
Cinética G13 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de extrato MeOH de *S. pseudoquina*



Extrato (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	65,1	$2,50 \times 10^5 \pm 21491$	0	> 0,05
50	65,2	$2,50 \times 10^5 \pm 17907$	0	> 0,05
5	65,2	$2,33 \times 10^5 \pm 16466$	4	> 0,05
controle	67,8	$2,43 \times 10^5 \pm 17202$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

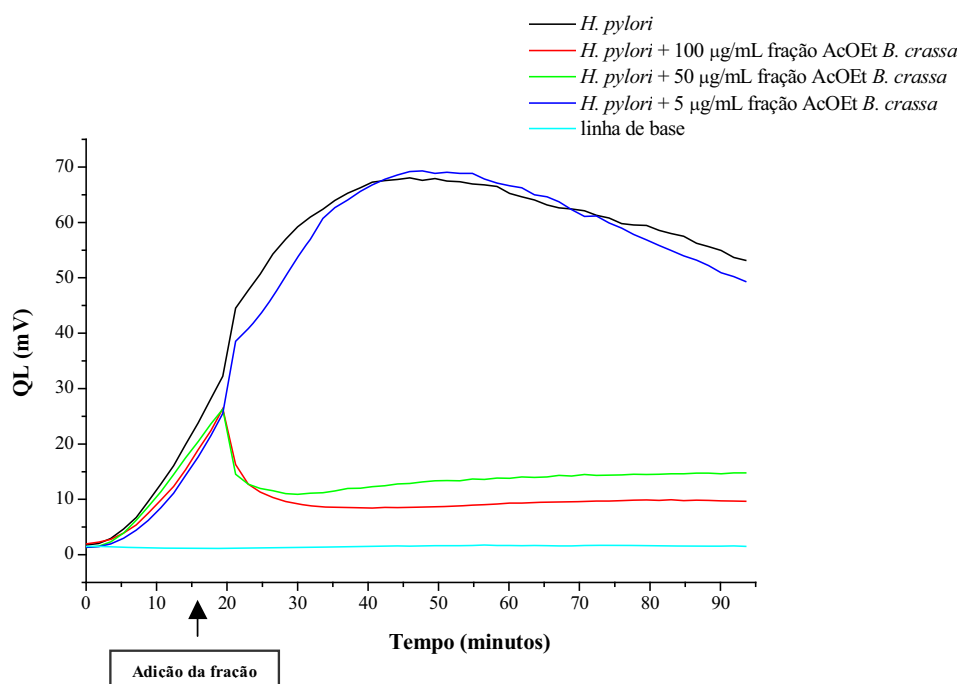
Cinética G14 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de fração aquosa de *B. crassa*



Fração (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	45,9	$0,24 \times 10^5 \pm 1674$	91,7	< 0,05*
50	33,6	$0,21 \times 10^5 \pm 1451$	92,7	< 0,05*
5	65,3	$2,69 \times 10^5 \pm 19010$	6,6	> 0,05
controle	66,4	$2,88 \times 10^5 \pm 20382$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

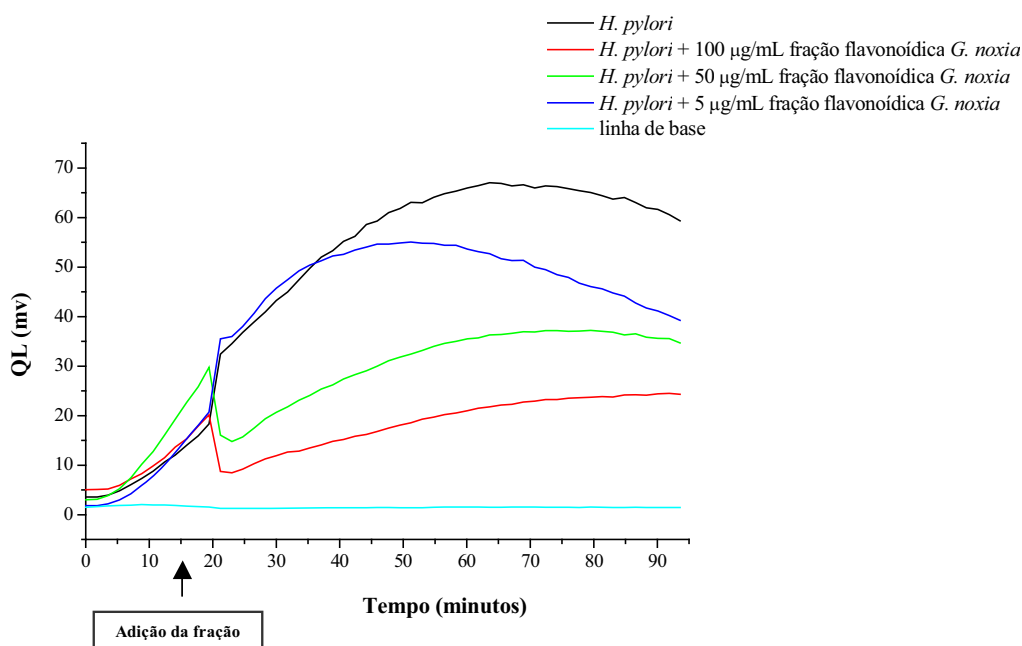
Cinética G15 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de fração AcOEt de *B. crassa*



Fração (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	24,7	$0,47 \times 10^5 \pm 2985$	83,5	< 0,05*
50	24,6	$0,66 \times 10^5 \pm 4195$	76,8	< 0,05*
5	67,6	$2,72 \times 10^5 \pm 17338$	4,2	> 0,05
controle	66,4	$2,84 \times 10^5 \pm 18054$	-	-

Variação da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

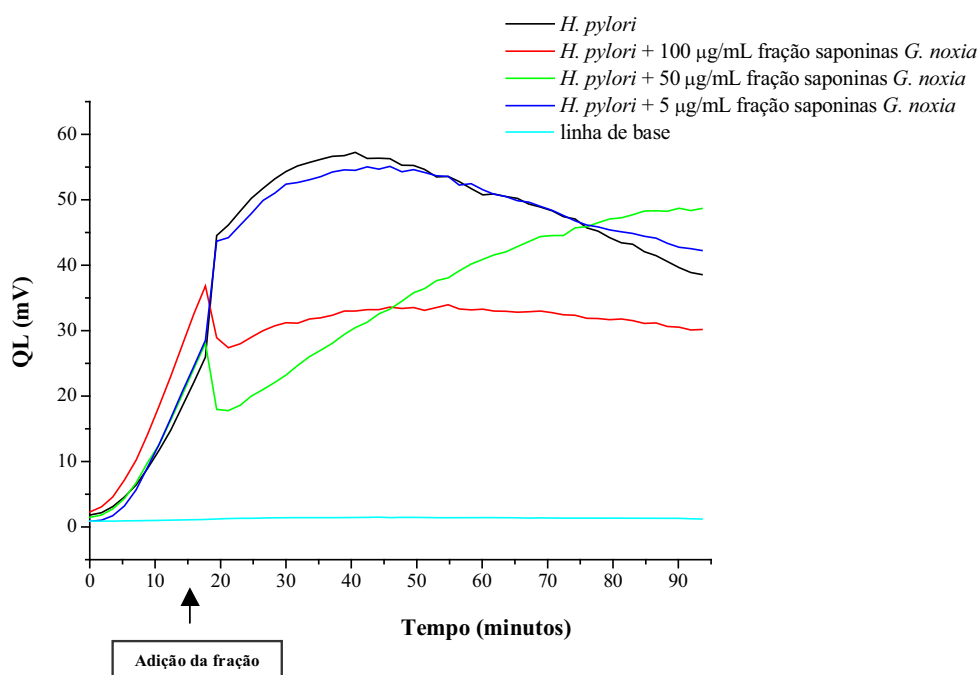
Cinética G16 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de fração flavonoídica de *G. noxia*



Fração (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	22,6	$0,90 \times 10^5 \pm 2559$	65,1	< 0,05*
50	35,2	$1,48 \times 10^5 \pm 4199$	42,6	< 0,05*
5	53,0	$2,20 \times 10^5 \pm 6225$	14,7	< 0,05*
controle	65,0	$2,58 \times 10^5 \pm 7289$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

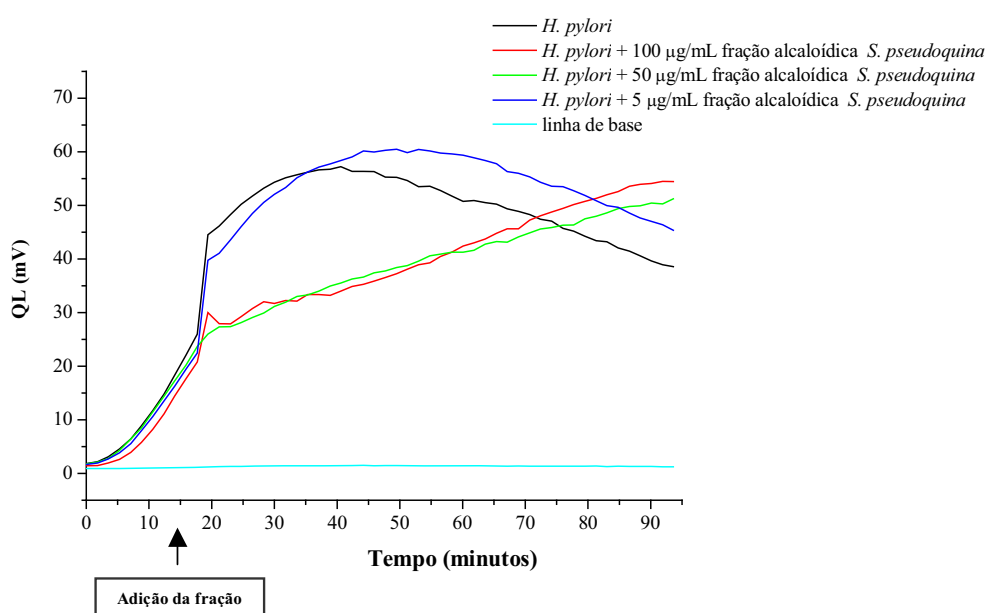
Cinética G17 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de fração saponinas de *G. noxia*



Fração (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	35,4	$1,57 \times 10^5 \pm 5550$	34,9	< 0,05*
50	47,3	$1,86 \times 10^5 \pm 6562$	22,8	< 0,05*
5	53,7	$2,38 \times 10^5 \pm 8401$	1,2	> 0,05
controle	55,8	$2,41 \times 10^5 \pm 8528$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

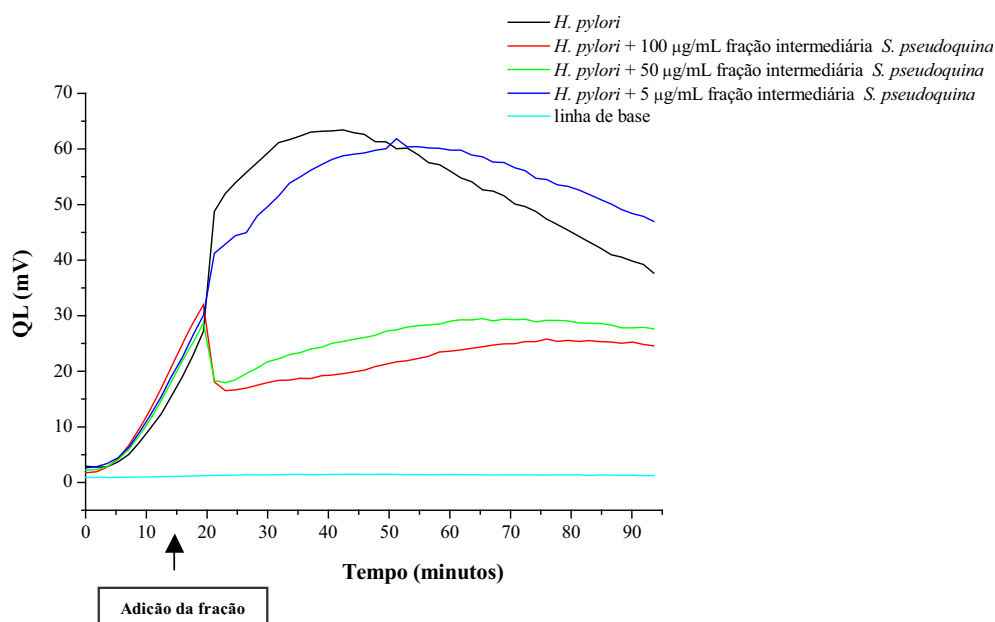
Cinética G18 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de fração alcaloídica de *S. pseudoquina*



Fração (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	52,6	$1,82 \times 10^5 \pm 9028$	18,7	> 0,05 (0,054)
50	49,9	$1,86 \times 10^5 \pm 9197$	16,9	> 0,05 (0,06)
5	59,0	$2,32 \times 10^5 \pm 13159$	0	> 0,05
controle	55,8	$2,24 \times 10^5 \pm 11082$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

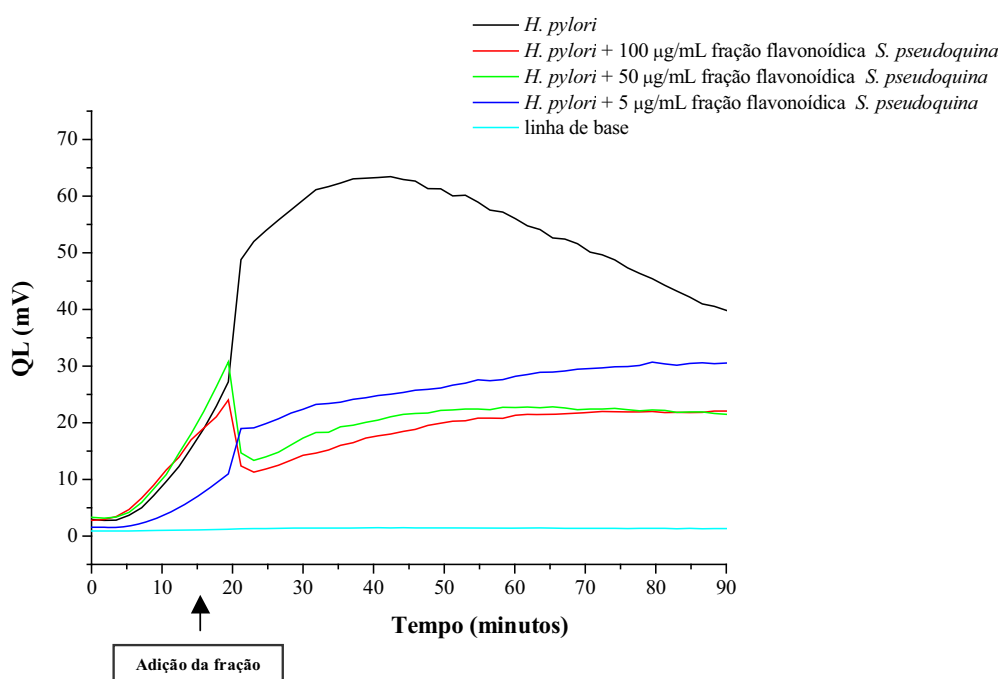
Cinética G19 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de fração intermediária de *S. pseudoquina*



Fração (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	30,5	$1,10 \times 10^5 \pm 3087$	55,1	< 0,05*
50	28,1	$1,26 \times 10^5 \pm 3576$	48,6	< 0,05*
5	60,4	$2,45 \times 10^5 \pm 6936$	0	> 0,05
controle	62,1	$2,45 \times 10^5 \pm 6928$	-	-

Variação da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

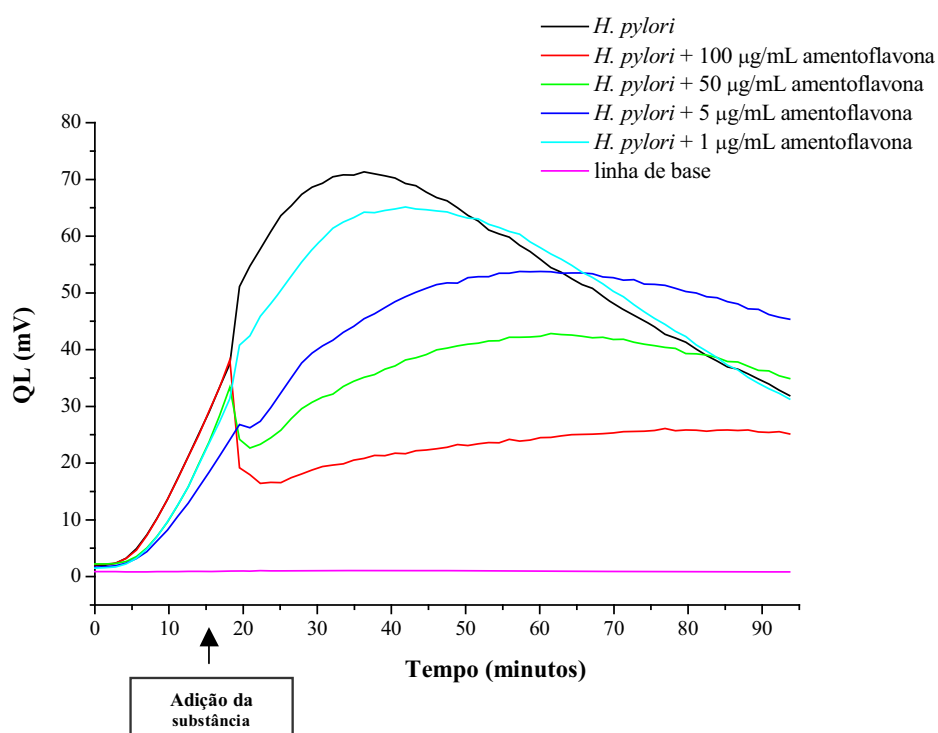
Cinética G20 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de fração flavonoídica de *S. pseudoquina*



Fração (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	22,6	$0,94 \times 10^5 \pm 2659$	61,6	< 0,05*
50	29,3	$1,02 \times 10^5 \pm 2879$	58,4	< 0,05*
5	29,3	$1,18 \times 10^5 \pm 3332$	51,8	< 0,05*
controle	62,0	$2,45 \times 10^5 \pm 6929$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

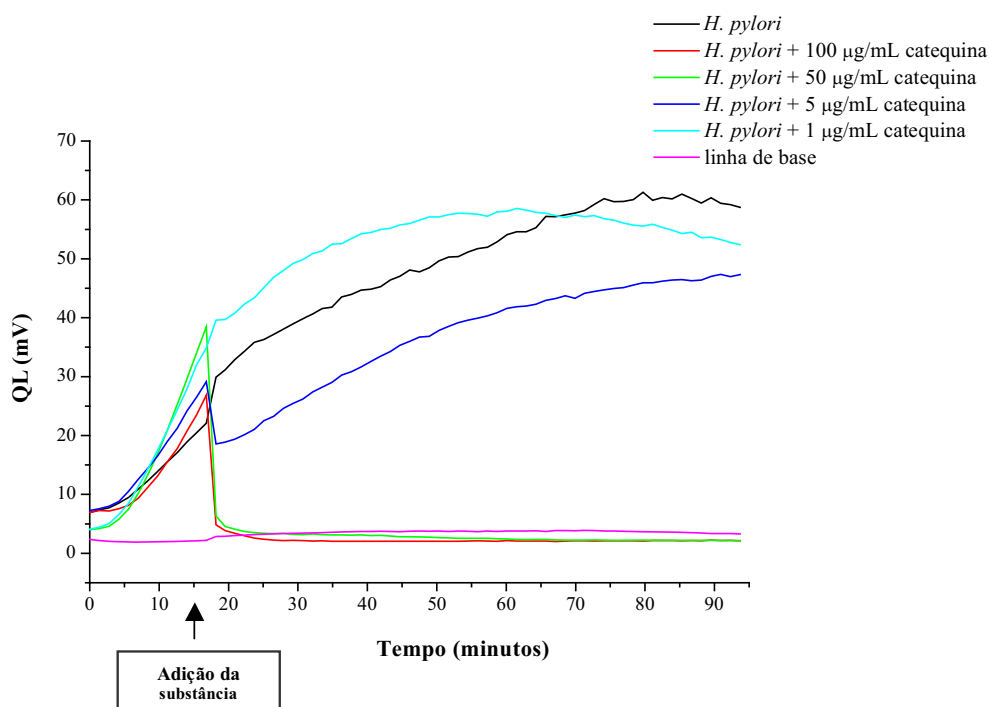
Cinética G21 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de amentoflavona



Substância (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	37,2	$1,13 \times 10^5 \pm 2407$	56,2	< 0,05*
50	41,8	$1,76 \times 10^5 \pm 3760$	31,8	< 0,05*
5	52,7	$2,15 \times 10^5 \pm 4355$	16,7	< 0,05*
1	64,1	$2,44 \times 10^5 \pm 5173$	5,4	> 0,05
controle	70,3	$2,58 \times 10^5 \pm 5482$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

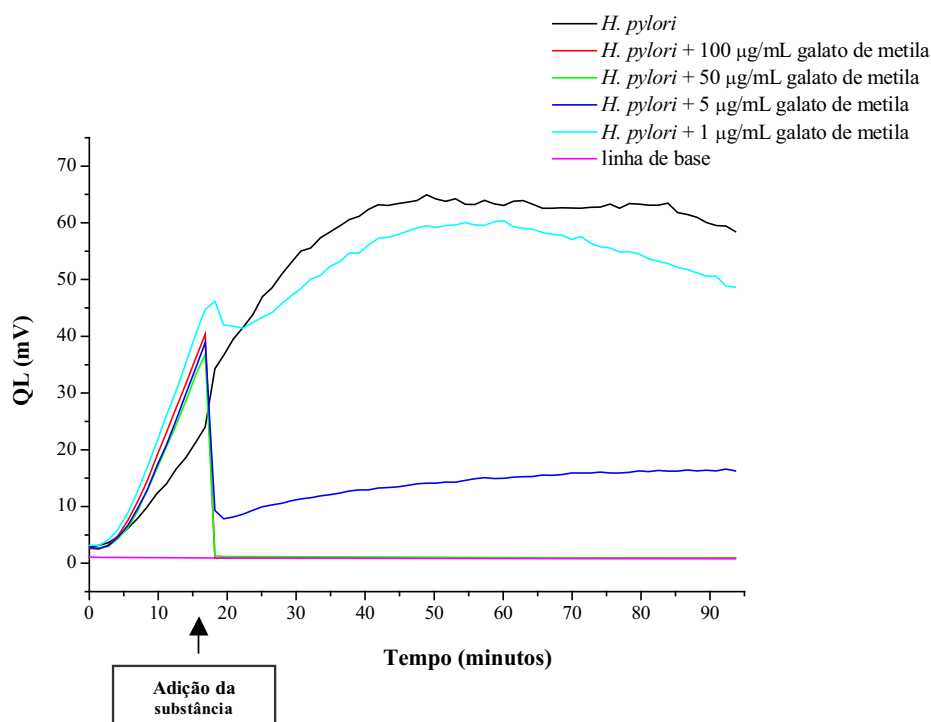
Cinética G22 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de catequina



Substância (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	23,8	$0,05 \times 10^5 \pm 70$	97,8	< 0,05*
50	35,4	$0,10 \times 10^5 \pm 146$	95,5	< 0,05*
5	44,3	$1,6 \times 10^5 \pm 2297$	28,3	< 0,05*
1	53,5	$2,37 \times 10^5 \pm 5173$	0	> 0,05
controle	58,3	$2,23 \times 10^5 \pm 3363$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

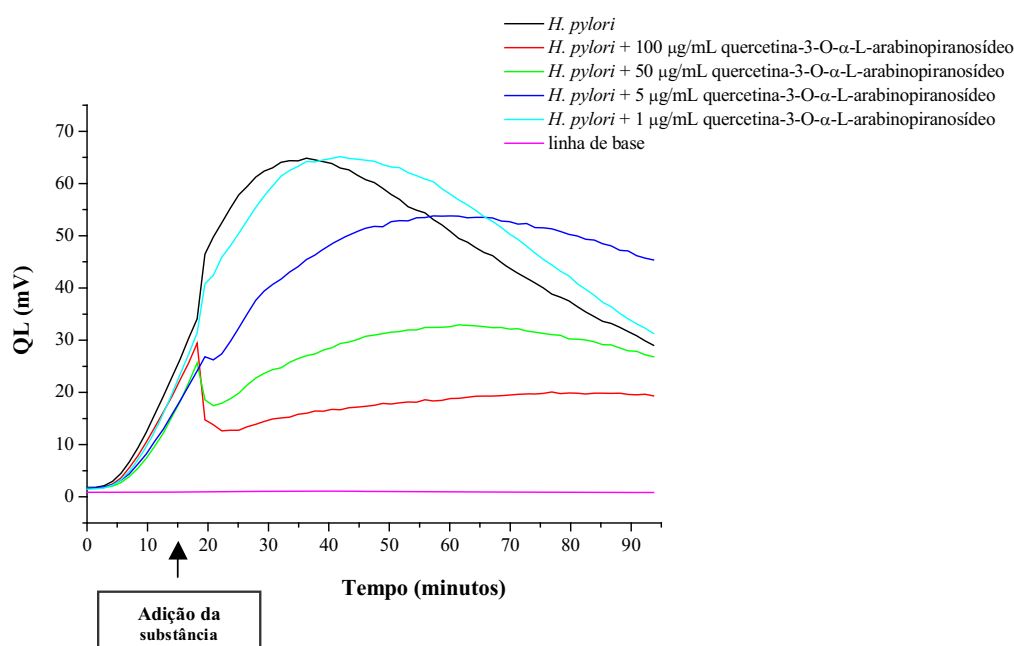
Cinética G23 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de galato de metila



Substância (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ¹ (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	39,3	$0,16 \times 10^5 \pm 455$	94,2	< 0,05*
50	35,8	$0,15 \times 10^5 \pm 423$	94,5	< 0,05*
5	37,9	$0,74 \times 10^5 \pm 2094$	73,1	< 0,05*
1	59,3	$2,62 \times 10^5 \pm 7404$	4,7	> 0,05
controle	63,9	$2,75 \times 10^5 \pm 7764$	-	-

Variação da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

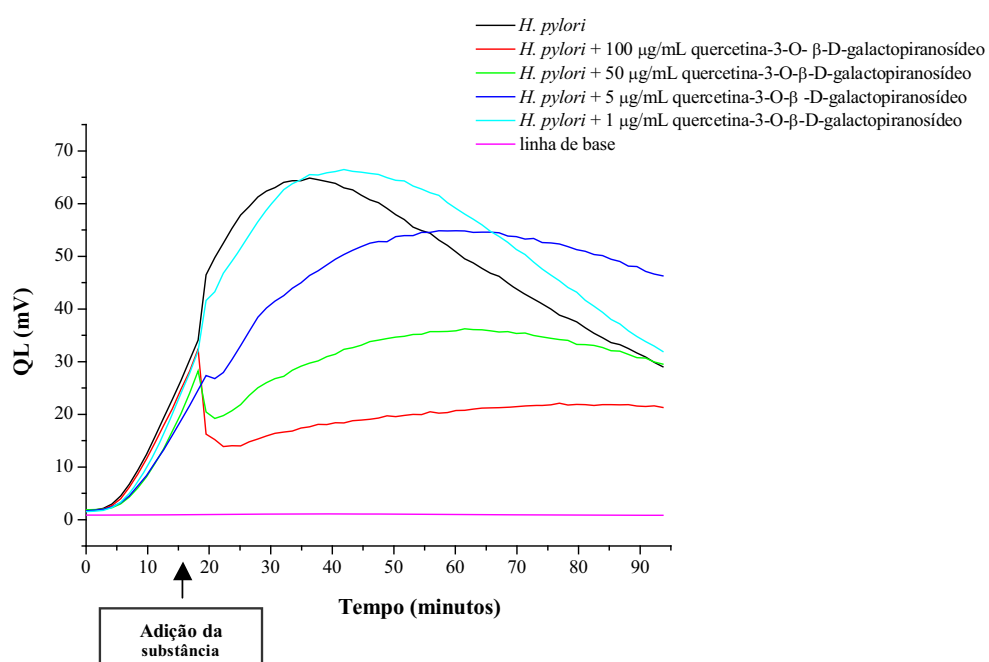
Cinética G24 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosíó



Substância (µg/mL)	Δ QL para IME ¹ (mV)	Δ QL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	28,4	$0,87 \times 10^5 \pm 1852$	63,0	< 0,05*
50	31,9	$1,36 \times 10^5 \pm 2893$	42,1	< 0,05*
5	52,7	$2,14 \times 10^5 \pm 4355$	8,9	< 0,05*
1	64,1	$2,43 \times 10^5 \pm 5173$	0	> 0,05
controle	63,9	$2,35 \times 10^5 \pm 4984$	-	-

Varição da quimiluminescência (Δ QL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

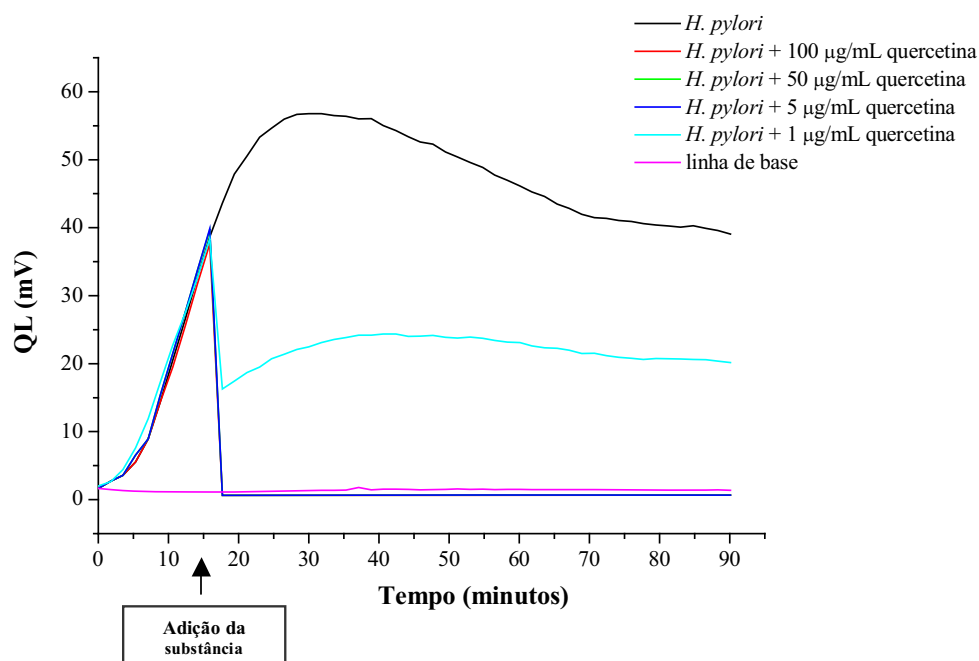
Cinética G25 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo



Substância (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	31,3	$0,95 \times 10^5 \pm 1852$	59,6	< 0,05*
50	35,2	$1,50 \times 10^5 \pm 2893$	36,2	< 0,05*
5	53,8	$2,18 \times 10^5 \pm 4355$	7,2	> 0,05
1	65,4	$2,47 \times 10^5 \pm 5173$	0	> 0,05
controle	63,9	$2,35 \times 10^5 \pm 4984$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)

Cinética G26 - Quimiluminescência dos sistemas LPMNs/luminol/*H. pylori* e LPMNs/luminol/*H. pylori* com diferentes concentrações de quercetina



Substância (µg/mL)	ΔQL para IME ¹ (mV)	ΔQL para ICE ² (valor da integral)	Redução na integral (%)	valor-P
100	36,1	$0,13 \times 10^5 \pm 499$	94,8	< 0,05*
50	38,1	$0,15 \times 10^5 \pm 578$	94,0	< 0,05*
5	38,3	$0,18 \times 10^5 \pm 1101$	92,7	< 0,05*
1	36,9	$1,11 \times 10^5 \pm 3211$	55,2	< 0,05*
controle	55,2	$2,48 \times 10^5 \pm 5987$	-	-

Varição da quimiluminescência (ΔQL) para ¹intensidade máxima de emissão (IME) e ²integral da cinética de emissão (ICE); *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

ANEXO

ANEXO - Parecer Comitê de Ética para os experimentos com animais

A utilização de ratos para a obtenção de neutrófilos é um procedimento amplamente aceito e descrito na literatura científica, pois tais células são facilmente obtidas destes animais, após a inoculação de glicogênio de ostra, possibilitando o estudo das funções imunológicas dessas células. Para isso, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e, após a morte, o peritônio dos mesmos foi exposto através da retirada da pele com auxílio de pinças e tesoura. Em seguida foi colhido o exsudato peritoneal utilizando como veículo 20 mL de PBS estéril. As células obtidas foram utilizadas nos testes quimiluminescentes propostos no projeto. Após a coleta do exsudato peritoneal os animais mortos foram encaminhados para incineração. O parecer (05/2008) do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara aprovando os experimentos com animais encontra-se anexado a seguir, sendo o relatório das atividades já encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa.



Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 01/2008

Interessado: CIBELE BONACORSI

Orientador: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

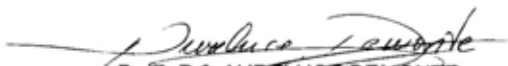
Projeto: Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de espécies vegetais do cerrado do Estado de São Paulo

Parecer nº 05/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, em sessão de 4 de março de 2008, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de espécies vegetais do cerrado do Estado de São Paulo", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em junho de 2008.

Araraquara, 5 de março de 2008.


Prof^a. Dr^a. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

CAPÍTULO II

Research article

Open Access

Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae)

Cibele Bonacorsi¹, Maria Stella G Raddi*¹, Iracilda Z Carlos¹,
Miriam Sannomiya² and Wagner Vilegas²

Address: ¹Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Espedicionários do Brasil 1621, CEP 14801-960, Araraquara, SP, Brazil and ²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Francisco Degni s/n, CEP 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

Email: Cibele Bonacorsi - bonac@terra.com.br; Maria Stella G Raddi* - raddi@fci.unesp.br; Iracilda Z Carlos - carlos@fci.unesp.br; Miriam Sannomiya - miriamsa@posgrad.iq.unesp.br; Wagner Vilegas - vilegasw@iq.unesp.br

* Corresponding author

Published: 16 January 2009

Received: 29 September 2008

BMC Complementary and Alternative Medicine 2009, 9:2 doi:10.1186/1472-6882-9-2

Accepted: 16 January 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/9/2>

© 2009 Bonacorsi et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Several *in vitro* studies have looked at the effect of medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Regardless of the popular use of *Byrsonima crassa* (*B. crassa*) as antiemetic, diuretic, febrifuge, to treat diarrhea, gastritis and ulcers, there is no data on its effects against *H. pylori*. In this study, we evaluated the anti-*H. pylori* of *B. crassa* leaves extracts and its effects on reactive oxygen/nitrogen intermediates induction by murine peritoneal macrophages.

Methods: The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution method and the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitric oxide (NO) by the horseradish peroxidase-dependent oxidation of phenol red and Griess reaction, respectively.

Results: The methanolic (MeOH) and chloroformic (CHCl₃) extracts inhibit, *in vitro*, the growth of *H. pylori* with MIC value of 1024 µg/ml. The MeOH extract induced the production H₂O₂ and NO, but CHCl₃ extract only NO.

Conclusion: Based in our results, *B. crassa* can be considered a source of compounds with anti-*H. pylori* activity, but its use should be done with caution in treatment of the gastritis and peptic ulcers, since the reactive oxygen/nitrogen intermediates are involved in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by ulcerogenic agents and *H. pylori* infections.

Background

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a spiral-shaped bacterium that colonizes the stomach of the half of all people worldwide [1]. Once a person is infected, the organism can live in the stomach indefinitely and may not cause clinical illness. It is still not clear how *H. pylori* are transmitted or why some people infected with its bacteria become sick and others do not [2]. Studies have also shown an associ-

ation between long-term infection with *H. pylori* and the development of gastric adenocarcinoma [3,4].

Therapy for *H. pylori* infection consists of 1-2 weeks of one or two effective antibiotics, such as amoxicillin, tetracycline, metronidazole, or clarithromycin, plus either ranitidine bismuth citrate, bismuth subsalicylate, or a proton pump inhibitor [5]. Many clinical treatment trials involv-

ing patients with *H. pylori* infection and gastric or duodenal ulcers show that curing the infection is associated with a marked reduction in ulcer recurrence rates [6]. However, eradication by the triple therapy is not always successful and the acquisition by *H. pylori* resistant to antibiotics could represent a serious problem that may reduce treatment efficacy [7]. Considering that eradication therapies can be ineffective and undesirable side effects may occur, the search for new drugs for the development of alternative therapies is very important [1]. Plant extracts are among the attractive sources of new drugs and have been shown to produce promising results in the treatment of gastric ulcers [8-11].

The genus *Byrsonima*, which is composed of approximately 150 species, belongs to the Malpighiaceae family and is widely distributed throughout tropical America [12,13]. This family is constituted by approximately 800 species distributed in 60 genera and about 50% of these species are concentrated in Brazil [14]. In traditional Brazilian medicine, *Byrsonima crassa* (*B. crassa*) is used as antiemetic, diuretic, febrifuge, to treat diarrhea, gastritis and ulcer [15].

The potential antiulcerogenic of *B. crassa* leaves extracts were demonstrated by Sannomiya *et al.* [16]. The results of this research showed that methanolic (MeOH) extract provided better gastroprotective activity than chloroformic (CHCl₃) extract. The presence of amentoflavone, quercetin derivatives and catechins in the MeOH extract were suggested to contribute for the gastroprotective activity since these compounds were reported to inhibit lipid peroxidation as well as possess a very potent antioxidant activity [16,17].

Several *in vitro* studies have looked at the effect of medicinal plant extracts against *H. pylori* [18-21]. This bacteria induces inflammation, infiltration and activation of immune cells, accumulation of reactive oxygen species, and oxidative DNA damage in the gastric mucosa [22-24]. The antimicrobial compounds from plants may inhibit bacterial growth by different mechanisms than those presently used antimicrobials, and could therefore be of clinical value in the treatment of resistant microbial strains, including *H. pylori* [25].

Despite of the popular use of *B. crassa* as a medicinal plant, there is no data on its antimicrobial activity and immunostimulatory effects. In this study, we evaluated, *in vitro*, the anti-*H. pylori* of *B. crassa* leaves extracts (MeOH and CHCl₃) and its immunostimulatory effects in murine immune system by determination of oxygen (H₂O₂) and nitrogen (NO) intermediates reactive.

Methods

Plant material

B. crassa Nied. (Malpighiaceae) leaves were collected at Porto Nacional, Tocantins State, Brazil and authenticated by Prof. Eduardo Ribeiro dos Santos. A voucher specimen (Nr. 3377) was deposited at the Herbarium of the Tocantins University.

Extraction and preparation of extract solutions

The aerial parts (2.0 kg of leaves) obtained were dried (at 40°C for 4 days) and powdered. The dry powdered material was macerated three times with 2 liters of chloroform and methanol successively at room temperature and left for 48 h in the respective solvent. The solvents were filtered and evaporated at 60°C under reduced pressure providing CHCl₃ (53.8 g) and MeOH (158.3 g) extracts. The yields (w/w) for the CHCl₃ and MeOH extracts from the air-dried and powdered leaves of *B. crassa* leaves were 2.7 and 7.9%, respectively [16]. Stock solutions of plant extracts (50 mg/ml) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C. Dilutions of the stock solutions were made in Brain Heart Infusion (BHI) plus 10% fetal bovine serum (FBS) for antimicrobial activity and in potassium phosphate buffer or RPMI-1640 medium for measurement of H₂O₂ and NO production by peritoneal macrophages. Fresh solutions were prepared for each experiment.

Bacterial strain

H. pylori ATCC 43504, metronidazole resistant (MtzR) and amoxicillin susceptible (AmxS), was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The bacterium was cultured in Columbia agar containing 5% sheep blood at 36-37°C for 3 days, in 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ atmosphere.

Antimicrobial activity

The wells of a 96-well microplate were filled with 100 µl of various concentrations of the extracts. Same volume of *H. pylori* suspension (about 10⁴ cfu/ml) was added to each well. The absorbance was determined using an automatic ELISA microplate reader (Spectra & Rainbow Readers, Tecan) adjusted at 620 nm. The microplate was incubated at 36-37°C for 3 days, under microaerophilic atmosphere, agitated and the absorbance was read again in the reader at the same wavelength. The absorbencies were compared to the values obtained before incubation to detect an increase in bacterial growth. The lowest concentration of the test extract resulting in inhibition of bacterial growth, at least, more than 90%, was taken as the minimal inhibitory concentration (MIC). Amoxicillin and metronidazole were used as reference antimicrobial.

Animals

Experiments involving Swiss mice (6–8 weeks old, 18 to 25 g) were performed in accordance with the regulations of Research Ethics Committee (01/2005), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Unesp, São Paulo, Brazil.

Peritoneal macrophages

Resident and thioglycollate-elicited peritoneal exudate cells were obtained from mice following intraperitoneal injection of 3 ml thioglycollate medium (3.0 g/100 ml) and lavage of the peritoneal cavity with 5 ml of 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, 3–4 days later. The proportion of macrophages in the peritoneal exudate was determined by cell staining with May-Gruenwald-Giemsa. Cell preparations contained more than 95% macrophages. The cells were washed twice with PBS and resuspended in appropriate medium for each test.

Macrophages viability

For the determination of the concentrations of extracts that do not cause cell death, the cytotoxic assay was performed as described. Macrophages (10^6 cells/ml) were suspended in RPMI-1640 containing 5% heat-inactivated FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 mM 2-mercaptoethanol. The suspension (100 µl) was added to each well of a 96-well microplate and the cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 1 h, the wells were washed and adhering cells exposed to different concentrations of methanolic or chloroformic extract for 1 and 24 h. The test was accompanied by a viability positive control (RPMI plus cells) and negative control (RPMI plus extract). Finally, neutral red (NR) assay [26] was performed and the absorbance at 540 nm (reference filter 620 nm) determined using an automatic microplate reader.

Measurement of H₂O₂

Production H₂O₂ was measured by the horseradish peroxidase (HRP)-dependent oxidation of phenol red [27]. Macrophages (2×10^6 cells/ml) were suspended in 10 mM potassium phosphate buffer containing 140 mM NaCl, 5.5 mM dextrose, 0.56 mM phenol red and 0.01 mg/ml HRP, pH 7.4. Briefly, 100 µl of this suspension was added to each of a 96-well culture tissue plate and exposed to methanolic and chloroformic extracts (concentrations of extracts that do not cause cell death), for 1 h (time for the H₂O₂ assay) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The reaction was stopped by the addition of 10 µl of 1 N NaOH and the absorbances were read at 620 nm using a microplate reader. The results are reported as nmol/2 × 10⁵ cells. The experiment was accompanied by a positive control (buffer plus macrophages and 200 nM phorbol myristate acetate, PMA) and negative control (buffer plus macrophages).

Measurement of NO

NO synthesis was determined by measuring the accumulation of nitrite, a stable metabolite of NO, using the Griess reaction [28]. Macrophages (100 µl) in at 5×10^6 cells/ml in RPMI containing 5% heat-inactivated FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 50 mM 2-mercaptoethanol, were added to each well of a 96-well cell culture plate and exposed to methanolic and chloroformic extracts (concentrations that do not cause cell death), for 24 h (time for the NO assay) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After incubation, 50 µl aliquots of culture supernatant were mixed with an equal volume of Griess reagent and incubated at room temperature for 10 min. Absorbance at 540 nm was measured using a microplate reader. The results are reported as µmol/5 × 10⁵ cells. Each experiment was accompanied by a positive control (RPMI plus macrophages and 10 µg/ml lipopolysaccharide, LPS) and a negative control (RPMI and macrophages).

Statistical Analysis

The results are expressed as means ± SD (Standard Deviation). All tests were performed in triplicate and repeated at least three times. Statistical difference between groups was determined by one-way analysis of variance (ANOVA). A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The antibacterial activities of the extracts (MeOH and CHCl₃) from *B. crassa* against *H. pylori*, using spectrophotometer microdilution assay, are shown in Figure 1. The results demonstrated that both MeOH and CHCl₃ extract exhibited anti-*H. pylori* activity with MIC value of 1024 µg/ml. The data presented in Figure 2 summarize the release of H₂O₂ and NO by murine peritoneal macrophages. The MeOH extract at concentrations of 280 µg/ml (maximum concentration that did not cause cell death) was able to induce the release of 20.16 ± 0.58 nmol/2 × 10⁵ cells and 13.79 ± 2.58 µmol/5 × 10⁵ cells H₂O₂ and NO, respectively. The CHCl₃ extract at concentration of 200 µg/ml (maximum concentration that did not cause cell death) just induced the production of NO (8.63 ± 0.35 µmol/5 × 10⁵ cells).

Discussion

Many anti-*H. pylori* compounds exhibiting a significant inhibitory effect have been identified from plant materials, among them flavonoids, tannins, terpenes, aromatic aldehydes, alcohols, tannins and catechins [18,29-31]. Based on the popular use of *B. crassa* to treat gastritis and ulcer, we investigated, *in vitro*, the susceptibility of *H. pylori* ATCC 43504 (Amx5 and MtxR strain) to MeOH and CHCl₃ extracts obtained from the leaves of this medicinal plant. Both extracts presented MIC value of 1024 µg/ml. In summary, our results suggest that *B. crassa* produces

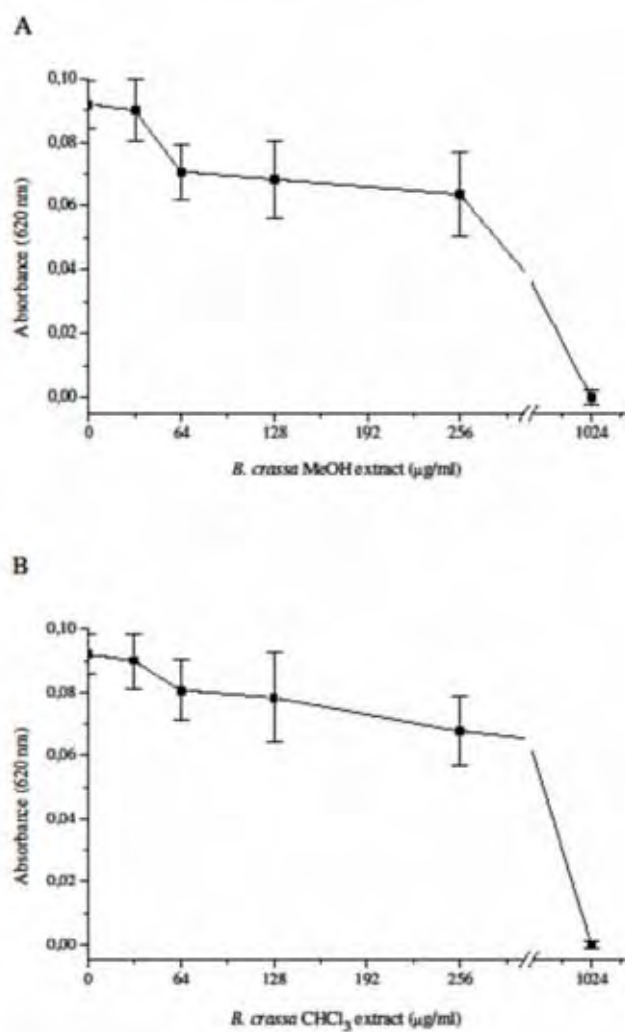


Figure 1
Effect of the MeOH (A) and CHCl₃ (B) extracts obtained of *Byrsonima crassa* on growth of *Helicobacter pylori*, following incubation for 72 h.

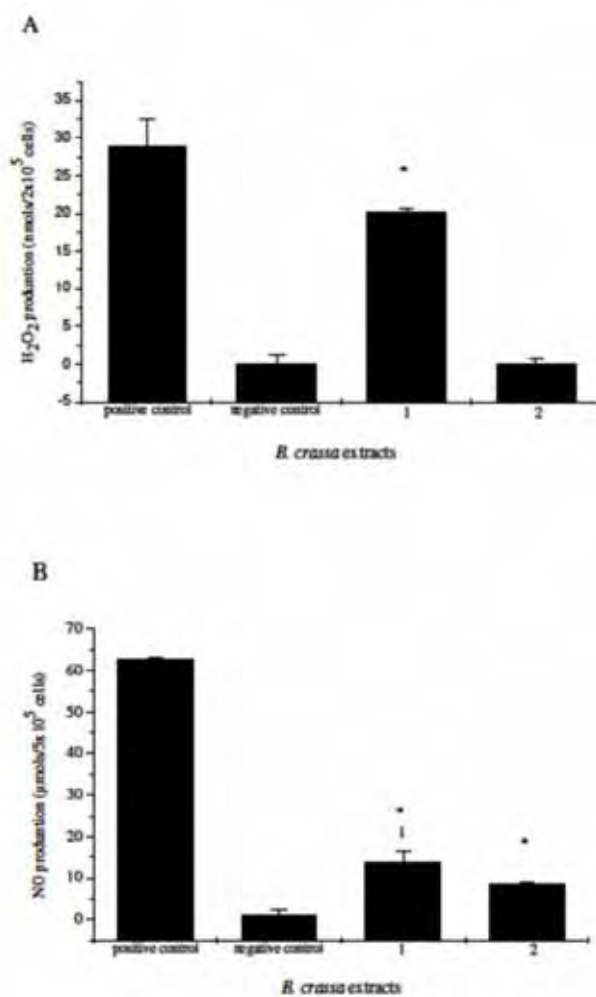


Figure 2
 H_2O_2 (A) and NO (B) production from peritoneal macrophages stimulated with 280 µg/ml MeOH (1) and 200 µg/ml $CHCl_3$ (2) extracts. Macrophages were exposed to *Brysonima crassa* extracts for 1 h (A) and 24 h (B). The results are the mean \pm SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. * $P < 0.05$, significantly different from control without stimulating (negative control).

secondary metabolites with anti-*H. pylori* activity. Probably, the antimicrobial activity demonstrated by extracts may be due to the presence of polyphenolic compounds, such as flavonoids, tannins, and terpenoids described in the phytochemical profile of *B. crassa* [16,32,33], not discarding the possibility of a synergistic effects between substances.

H. pylori infection has been associated with generation of oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) reactive species, which leads to oxidative stress in gastric mucosa [22,34,35]. This bacterium induces infiltration and activation of phagocytes, which produce inflammatory mediators, cytokines, ROS and RNS. To avoid the negative effects of ROS, *H. pylori*, like many other bacteria, produces enzymes involved in ROS scavenging, such as catalase and superoxide dismutase. *H. pylori* also activates inducible nitric oxide synthase in the gastric mucosa, which is associated with epithelial cell injury and apoptosis [2]. No evidence was found for a role of free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal injury in cases unrelated to *H. pylori* infection [35].

Macrophages are widely distributed in different tissues and play an essential role in the development of the specific and nonspecific immune response. These cells can be activated by a variety of stimuli as bacterial components, cytokines and chemicals. Once activated, macrophages produce and release numerous secretory products including several cytokines, inorganic reactive radicals, reactive oxygen intermediates (ROI) and reactive nitrogen intermediates (RNI) with biological activities [36]. Hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitric oxide (NO) are important in cell signaling and they are effectors molecules for microbicidal and cytotoxic response of macrophages after stimulation [37]. If ROI and RNI may be considered as beneficial intermediates (with respect to its microbicidal and tumoricidal activities), it also can become destructive for the host tissue in certain conditions [38]. NO and reactive oxygen species affect virtually every step of the development of inflammation.

The immunomodulatory activity of several plants compounds has already been described [39]. *Durilla elliptica* chloroform extract triggered the production of H_2O_2 , NO and tumor necrosis factor- α in a dose-dependent manner into cultured macrophages [40] whereas inhibitory effects in H_2O_2 and NO production by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa* were demonstrated [41]. In particular, those plants that reduce the formation of NO may be beneficial in pathophysiological conditions where excessive production of NO is a contributory factor.

In this study, we demonstrated that extracts of *B. crassa* induced the production H_2O_2 and NO. Agents that reduce

the formation of NO may be beneficial in *H. pylori* infections since an excessive production of NO is an aggravating factor in this condition. Finally, increased production of free radicals has been demonstrated to occur during the gastrointestinal metabolism of xenobiotics, which may lead to intestinal disorders [42].

Despite of the antiulcerogenic effect exhibited by *B. crassa* associated with HCl/ethanol induced gastric ulcers [16] and inhibitory activity against *H. pylori*, an immunostimulatory effect on the liberation of H_2O_2 and NO by *B. crassa* leaves was demonstrated. Based in these results, *B. crassa* can be considered a source of compounds with anti-*H. pylori* activity, but its use should be done with caution in treatment of the gastritis and peptic ulcers, since the reactive oxygen/nitrogen intermediates are involved in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced ulcerogenic agents and *H. pylori* infections.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MS and WV have been involved in the obtaining the extracts. EZC performed the immunological assays. CB and MSGR carried out the cell viability, antimicrobial experiments and preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by financial support.

References

1. Stagi PV, Davitolo RC, Vaja AE, Casali YA, Corrua S, Micalizzi B: Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (Jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine* 2006, 12:774-777.
2. Baldini CT, Lazzarocchia A, Telford J: Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol* 2005, 26:199-207.
3. Mathewi GM, Butler RN: Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and oxidative pentose pathway. *Helicobacter* 2005, 10:298-306.
4. Montecocco C, Rappuoli R: Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survive in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2:457-466.
5. Howden CV, Hunt RH: Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1998, 93:2230-2238.
6. Hoffman JS: Pharmacological therapy of *Helicobacter pylori* infection. *Semin Gastrointest Dis* 1997, 8:156-162.
7. Glupczynski Y: Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: a global overview. *Acta Gastro-Ent Belg* 1998, 61:357-366.
8. Babincová M, Schromerová K, Souborný P: Anticancer activity of water extract of *Scoparia dulcis*. *Fitoterapia* 2008, 79:587-588.
9. Falcao HS, Maruth R, Dias MF, Batista LP, Barbosa-Filho JT: Plants of the American continent with anticancer activity. *Phytomedicine* 2008, 15:22-46.
10. Hiruma-Lima CA, Calvo TR, Rodrigues CH, Andrade FD, Souza-Erikson AP: Anticancerogenic activity of *Alchornea cordifolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. *J Ethnopharmacol* 2006, 104:215-224.

11. Ishikawa T, Donatti RS, Diaz K, Yoshida M, Bacchi EM, Kato ET: Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae) leaves in rats. *J Ethnopharmacol* 2008, **118**:527-529.
12. Martins-Vasquez M, González-Espinoza AR, Lima LC, Moreno González MN, García-Arreaga AN: Antimicrobial activity of *Byronopsis crassifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharmacol* 1999, **66**:79-82.
13. Sanoniyá M, Cardoso CRP, Figueiredo ME, Rodrigues CM, dos Santos LC, dos Santos FV, Serpico JM, Coko IM, Vilgas W, Varanda EA: Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byronopsis inamedia* A. Juss. leaf extracts. *J Ethnopharmacol* 2007, **112**:319-326.
14. Joly AB: Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. Companhia Ed Nacional, São Paulo; 1998:908.
15. Silva SR, Silva AP, Munhoz CB, Silva MC Jr, Maderes MB: Guia de Plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros. Prática Gráfica e Editora Ltda, Brasília; 2001:172.
16. Sanoniyá M, Fonseca VB, da Silva MA, Rocha LR, dos Santos LC, Hiruma-Lima CA, Sousa-Brito ADM, Vilgas W: Flavonoids and anticarcinogenic activity from *Byronopsis crassa* leaves extracts. *J Ethnopharmacol* 2005, **97**:1-4.
17. Iwai K, Onodera A, Matsuo H: Antioxidant activity and inhibitory effect of Gamazaxim (*Vibrenum dilatatum* Thunb.) on oxidative damage induced by water immersion restraint stress in rat. *Int J Food Sci Nutr* 2001, **52**:443-451.
18. Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hiru Y: Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol* 2004, **48**:251-261.
19. Manghai L, Epifano F, Laporini L, Pagotto R, Trifiroli B: Phytochemical investigation on leaf extract of *Cordia alliodora* Cham. *J Med Food* 2008, **11**:193-194.
20. Ndjia RN, Tarkanga ADM, Mbulaha SM, Lumab HN, Makongob A, Ndjia LN, Nyong'atac K, Wirmumid C, Elangco SP: *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J Ethnopharmacol* 2007, **114**:93-7.
21. Shikov AN, Posharskaya ON, Makarov VG, Kvetzaya AS: Antibacterial activity of *Chenopodium acetosa* oil extract against *Helicobacter pylori*. *Phytoter Res* 2008, **22**:253-253.
22. Arvid A, Loima L, Rocoar P, Soom M, Lhtvikana K, Sepp E, Auvaque M, Zilmer K, Sahtam G, Zilmer M: *Helicobacter pylori* substantially increases oxidative stress in indomethacin-imposed rat gastric mucosa. *Medicina (Kaunas)* 2005, **41**:343-347.
23. Bagchi D, McGinn TR, Ye X, Bagchi M, Krohn RL, Chatterjee A, Stohs SJ: *Helicobacter pylori*-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2002, **47**:1405-1412.
24. Ernst P: Review article: the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999, **13**:13-18.
25. Doff JN: Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. *J Ethnopharmacol* 1998, **60**:1-8.
26. Borandrand E, Puarner JA: Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985, **24**:119-124.
27. Pick E, Mizel D: Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 1981, **48**:211-226.
28. Grant LC, Wagner DA, Glogowski J, Skopar PL, Wainok JS, Tannenbom SR: Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982, **132**:131-138.
29. Fukui T, Haruno A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T: Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sci* 2002, **71**:1449-1463.
30. Nostro A, Colini L, Di Bartolomeo S, Di Campà E, Grando R, Cannatale MA, Muzzio L, Alonzo V: Antibacterial effect of plants extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytoter Res* 2005, **19**:198-202.
31. Shin J, Kim JM, Bae EA, Hyun YJ, Kim DH: *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med* 2005, **71**:197-201.
32. Arantes VP, Sato DN, Vilgas W, Santos LC, Leite CCF: Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. *Rev Chic Farm Biotec Apl* 2005, **26**:195-198.
33. Cardoso CR, de Siles Coko IM, Bernard CC, Sanoniyá M, Vilgas W, Varanda EA: Mutagenic activity promoted by artemisinone and methanolic extract of *Byronopsis crassa* Nodosa. *Toxicol* 2006, **223**:55-62.
34. Allen LH, Beecher BR, Lynch JT, Rohrer V, Witzum LH: *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce intracellular superoxide release. *J Immunol* 2005, **174**:3658-3667.
35. Davies GR, Simmonds NJ, Rampton DS: *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production *in vivo*. *Gut* 1994, **35**:179-185.
36. Forman HJ, Torres M: Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 2001, **22**:189-216.
37. Kaser O, Kolodziej H, Kiderlin AF: Immunomodulatory principles of *Palargonium sidoides*. *Phytoter Res* 2000, **15**:122-126.
38. McBride AG, Boruttsá V, Brown GC: Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1999, **1454**:275-88.
39. Moreira RRD, Carlos IZ, Vilgas W: Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. *Biol Pharm Bull* 2001, **24**:201-204.
40. Mascia Lopes FC, Poloni Piacere MC, Jordão CM Jr, Higuchi CT, Rauldo D, Vilgas W, Fujimura Leite CQ, Carlos IZ: Immunological and microbiological activity of *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**:69-72.
41. Lopes FCM, Coko TR, Vilgas W, Carlos IZ: Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF- α . *Aliment Pharmacol Ther* 2005, **28**:1726-1730.
42. Mantsch CP, Rossen GM, Rahn CA, Strauss KE: Detection of free radicals as a consequence of rat intestinal cellular drug metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1986, **888**:1-9.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/9/2/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime.

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

