



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Ciências Biológicas
Laboratório de Fisiologia do Microrganismo

Atividade anti-*Helicobacter pylori* de extratos hidroetanólicos de caule e folhas de *Astronium fraxinifolium* e *Astronium graveolens*



Raquel Martins Loureiro

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara – SP
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Ciências Biológicas
Laboratório de Fisiologia do Microrganismo

Atividade anti-*Helicobacter pylori* de extratos hidroetanólicos de caule e folhas de *Astronium fraxinifolium* e *Astronium graveolens*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Raquel Martins Loureiro

Aluna

Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Orientadora

Araraquara - SP
2014

Dedico este trabalho aos meus pais Goreti e Miguel,

Como forma de prestar minha simples homenagem, longe de atingir todo o reconhecimento que merecem. Os principais responsáveis para o início de toda a minha história, com quem dividi meus sonhos, inclusive o de me tornar farmacêutica. Aprendi que as vitórias são consequências do amparo que tivemos nos momentos de derrota. Vocês foram meu alicerce de toda vida. Deram-me asas para voar mais longe e são os olhos aos quais procuro na multidão. Amo para sempre e sempre mais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter guiado meus passos, confortado meu coração nos momentos difíceis, dado força para continuar a minha caminhada a fim de realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Goreti e Miguel que, com muito carinho, não mediram esforços para que eu chegasse nesta etapa de minha vida.

A minha irmã por ser sempre a primeira pessoa a quem peço apoio, por me ajudar e mimar todas as vezes que retornava para casa.

A minha orientadora, Profa. Dra. Tais Maria Bauab, pela oportunidade concedida, pela atenção e dedicação. Que, de forma acolhedora, não foi somente a minha referência profissional, como também meu amparo dentro da graduação.

*Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, juntamente com seu aluno Leonardo Perez de Souza por fornecer os extratos de *Astronium sp.**

*Aos professores, Dr. Cristiano B. Pereira e Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos, da Universidade de Tocantins em Palmas (TO) pela coleta e identificação de *Astronium fraxinifolium*;*

*A pós-graduanda Eliana Ramos, do Instituto Agrônomo de Campinas (Campinas), e ao Prof. Dr. Jorge Tamashiro, do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela coleta e identificação de *Astronium graveolens*;*

A Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e a sua aluna Amanda Correia Saraiva pelas leituras espectrofotométricas realizadas no Laboratório de Imunologia;

A minha co-orientadora Bruna Vidal Bonifácio, mesmo de forma não oficial, por tantos ensinamentos práticos e teóricos, por ter proporcionado meu crescimento profissional e pessoal. E por ter sido meu grande alicerce no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos;

Ao mestrando Matheus Ramos pelos ensinamentos, pelas grandes ajudas e por transmitir seu amor pela pesquisa. "Welcome to research", Obrigada Matheus;

A doutoranda Kamila Maria Silveira Negri pelo compartilhamento de suas experiências, pelos ensinamentos, pela paciência ao ensinar e por ter contribuído para meu desenvolvimento;

A pós-doc Patrícia Bento pela ajuda, companheirismo e pela amizade cativante;

A equipe do Laboratório de Enzimologia Industrial: Ao Prof. Dr. Rubens Monti pela oportunidade de realizar as atividades de treinamento técnico. A doutoranda Andrea dos Santos por ter me ensinado os primeiros passos na pesquisa científica. Aos amigos Caio, Julio, Antônio, Ana Lúcia, Vinicius, Ju, Ozeni e Tais;

A minha amiga, Maria Luiza Belizzi Duarte, por ter dividido tantos momentos desde o meu primeiro dia em Araraquara. Pela amizade, carinho, conselhos. E por ter se tornado a minha metade morena e a irmã que a graduação me concedeu;

Aos alunos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos: Victor Lucena, Isadora, Aymê, Thais Jovenazzo, Erina e Malu pelo auxílio e pelo companheirismo no laboratório;

A República Só Caqui, minha segunda família, por ter me ensinado que morar junto não é dividir contas, é amar, respeitar, dividir, fazer. E pelos grandes momentos juntas, por cada risada, por ter conhecido grandes pessoas e aprendido um pouco com cada "caquízete" e por terem sido grandes responsáveis pelo meu crescimento pessoal;

A Turma 81 noturno por dividir os melhores seis anos que já vivi;

Ao Dalmo pelos conselhos. E que mesmo longe conseguiu acompanhar os momentos mais importantes da minha vida;

Aos professores que lecionaram e contribuíram para meu desenvolvimento;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de SP-FAPESP (Projeto BIOTA).

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	21
2.2. Objetivo Específico	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Materiais	21
3.2. Equipamentos	22
3.3. Extratos Vegetais	22
3.3.1. Obtenção e Procedência	22
3.3.2. Preparo das soluções dos extratos	24
3.3.3. Espectro de absorção	24
3.4. Cepa Microbiana	24
3.4.1. Estocagem e Manutenção	24
3.5. Avaliação da atividade antibacteriana	25
3.5.1. Padronização da suspensão bacteriana	25
3.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	25
3.5.2.1. Realização do Teste	25
3.5.2.2. Leitura Espectrofotométrica	26
3.6. Cálculo da viabilidade microbiana	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Determinação do CIM dos extratos vegetais	28
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERÊNCIAS	33

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é um importante patógeno que acomete cerca de 50% da população em todo o mundo e está envolvido em quadros de processos inflamatórios persistentes na mucosa gástrica, resultando diversas lesões, na maioria das vezes, gastrite crônica que poderá resultar em gastrite antral, úlcera duodenal, gastrite atrófica multifocal, úlcera gástrica e até mesmo câncer gástrico. Além disso, a resistência bacteriana aos antibióticos aliada a problemática mundial de pacientes com infecções graves e altas taxas de mortalidade diminuem o montante de drogas disponíveis, o que reforça a necessidade de novas formas de tratamento, principalmente de origem natural. O uso de plantas medicinais e fitoterápicos padronizados com eficácia e segurança tem apresentado relevantes resultados, visto que os metabólitos secundários produzidos por diversas plantas são capazes de alcançar alvos terapêuticos. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) do Ministério da Saúde propõe o estudo de várias espécies vegetais para o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. O Brasil apresenta 25% da flora mundial, é um cenário para o desenvolvimento de novos medicamentos de espécies vegetais. O Ministério da Saúde elaborou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) segundo levantamento em municípios que já faziam uso desta prática. Dentre as plantas medicinais listadas na RENISUS, está o gênero *Astronium* (Anacardiaceae), com as espécies *A. graveolens* e *A. fraxinifolium* dentre as 13 que possui. *A. fraxinifolium* é descrita no tratamento de hemorragias e diarreias, úlceras da pele, reumatismo e também tem ação anti-séptica. A atividade biológica de *A. graveolens* é decorrente da presença de substâncias voláteis repelentes. Neste trabalho foram estudados os extratos hidroetanólicos do caule e das folhas de ambas as espécies para determinação da atividade antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori* através da técnica de microdiluição, sendo a amoxicilina utilizada como controle positivo. Os resultados mostraram que tanto o extrato do caule como das folhas de ambas as espécies testadas, apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) maiores que 1000 µg/mL, e, portanto foram pouco ativos frente ao *H. pylori*.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*, *Astronium sp*, atividade antimicrobiana microdiluição.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 2. Fotomicrografia de <i>Astronium fraxinifolium</i>	19
Figura 3. Fotomicrografia de <i>Astronium graveolens</i>	20
Figura 4. Representação da microplaca para determinação da CIM.	26
Figura 5. Reação de oxirredução da resazurina.....	27
Figura 6. Foto do ensaio de microdiluição com bactérias revelado com resazurina (0,01%).	29
Figura 7. Inibição do crescimento de <i>H. pylori</i> pelo extrato hidroetanólico do caule de <i>A. fraxinifolium</i>	30
Figura 8. Inibição do crescimento de <i>H. pylori</i> pelo extrato hidroetanólico da folha de <i>A. fraxinifolium</i>	30
Figura 9. Inibição do crescimento de <i>H. pylori</i> pelo extrato hidroetanólico do caule de <i>A. graveolens</i>	31
Figura 10. Inibição do crescimento de <i>H. pylori</i> pelo extrato hidroetanólico da folha de <i>A. graveolens</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CIM dos extratos hidroetanólicos de caule e folhas das espécies de <i>Astronium</i> sp através da revelação com resazurina (0,01%).	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFC – caule de *Astronium fraxinifolium*

AFF – folhas de *Astronium fraxinifolium*

AGC – caule de *Astronium graveolens*

AGF – folhas de *Astronium graveolens*

AS – Ágar Sangue

CIM – Concentração Inibitória Mínima (Sigla em inglês: MIC)

CMH - Caldo Müeller-Hinton

MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*

MS – Ministério da Saúde

OMS - Organização Mundial da Saúde

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF - Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SUS - Sistema Único de Saúde

SFB - Soro fetal bovino

1. INTRODUÇÃO

A maioria das doenças infecciosas é decorrente de um simples agente causador, cuja identificação é de extrema importância, não apenas para medidas de controle como também para o diagnóstico e tratamento (FAUCI e MORENS, 2012). São micro-organismos patogênicos ou oportunistas como vírus, fungos, bactérias e parasitas que acometem pacientes diagnosticados com doenças infecciosas, sendo transmitidas de forma direta ou indireta entre as pessoas (WHO, 2014a).

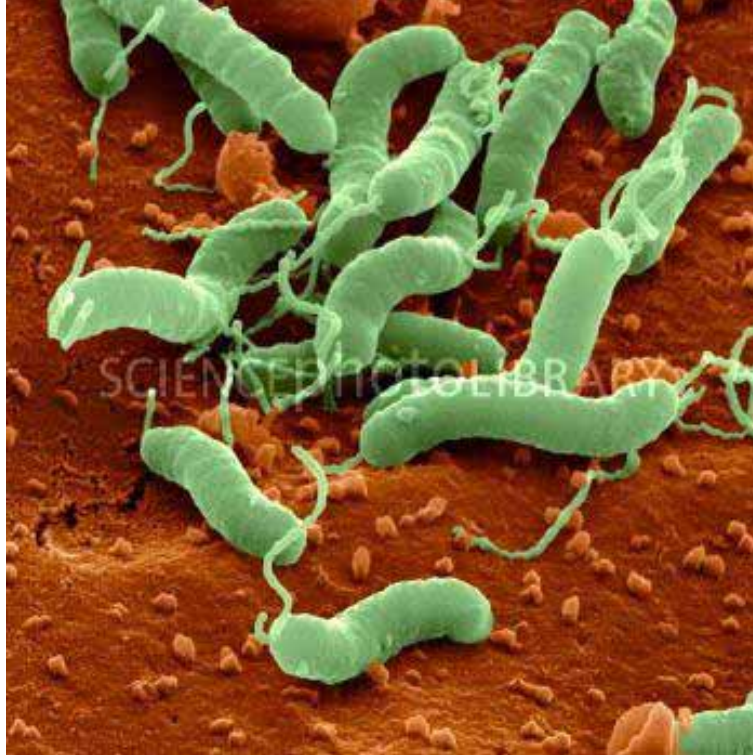
As doenças infecciosas destacam-se pela capacidade de gerar um grande impacto nos seres humanos. Desempenharam papel relevante no cenário de guerra atuando como responsáveis em estratégias através de pandemias e epidemias locais, definindo destinos de nações (FAUCI e MORENS, 2012) e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda são causas predominantes de morte em países de baixa renda (WHO, 2014b).

No contexto histórico, a propagação de micro-organismos infecciosos originando condições favoráveis para a disseminação de doenças infecciosas está relacionada ao momento em que o homem passou a viver em sociedade e deu início ao desenvolvimento do cultivo, suprimindo as necessidades alimentares e provocando a estabilização e crescimento populacional (STACHER, 1995). O surgimento de infecções e doenças crônicas é dependente do habitat do indivíduo, baseando-se na microbiota do hospedeiro (BEIRÃO et al., 2014).

Neste âmbito destaca-se o micro-organismo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), um dos patógenos mais difundidos globalmente (CAVE, 1997). Caracteriza-se por uma bactéria Gram-negativa, espiralada e microaerófila (RAMIS et al., 2012) que desencadeiam patologias de origem gástrica em cerca de 50% da população em

todo o mundo e sua prevalência depende da idade, classe socioeconômica e etnia (AYESH et al., 2013).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de *Helicobacter pylori*.



Fonte: Science Photo Library, 2014

A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, na maioria dos casos, é adquirida na infância causando inflamação aguda e crônica no estômago, visto que as crianças possuem hábitos de vida mais expostos, o que as torna mais vulneráveis e, se não tratada, pode persistir para o resto da vida (FIORENTINO et al., 2013; CARTÁGENES et al., 2009). Em adultos também ocorre inflamação aguda e crônica no estômago, mas a aquisição natural é mais rara, podendo variar dependendo da classe econômica e da etnia. Geralmente nos países em desenvolvimento as crianças são infectadas antes dos 10 anos de idade devido ao nível de saneamento e higiene doméstica. Nos países desenvolvidos a doença acomete a faixa etária mais avançada (TAN e WONG, 2011).

A prevalência das doenças oriundas desse micro-organismo em adultos nos países desenvolvidos é entre 20 a 55% e em crianças varia de 4 a 32%. Em países em desenvolvimento os valores são maiores podendo atingir até 90% da população adulta e em crianças varia de 16 a 92%, e pode ser aumentada com alguns fatores tais como condições precárias de higiene, baixas condições socioeconômicas, elevada densidade populacional (CANCELA et al., 2008).

A transmissão da doença ainda não está completamente elucidada, estando entre as vias oral-oral, fecal-oral e gastro-oral. A dificuldade de estabelecer apenas uma via para aquisição do *H. pylori* é devido às várias formas de contágio que em determinados ambientes estão interligadas como em creches ou ambiente familiar devido à convivência próxima. Na via oral-oral, através de refluxo gastroesofágico, a bactéria consegue alcançar a mucosa oral e se alojar na saliva e placa dental, sendo transmitida pelo contato íntimo. Na via fecal-oral, a bactéria desloca-se do estômago para o intestino no muco e suco gástrico, podendo ser eliminada nas fezes e contaminar a água e alimentos. Esta via ocorre comumente em regiões com condições precárias de higiene e saneamento. Na via gastro-oral, a bactéria é encontrada no suco gástrico e pode ser eliminada pelo vômito (CARTÁGENES et al., 2009).

O *H. pylori* é uma bactéria capaz de colonizar especificamente a mucosa gástrica (FIORENTINO et al., 2013), causando uma infecção inicial que geralmente desenvolve gastrite aguda, que pode ser resolvida com a eliminação da infecção pelo *H. pylori* ou gerar uma gastrite crônica, o que ocorre com a grande maioria. Sobretudo, alguns pacientes irão desenvolver gastrite antral que poderá ser complicada para uma úlcera duodenal e ocasionalmente para um linfoma. Além disso, outros pacientes poderão desenvolver gastrite atrófica multifocal e

subsequentemente pode levar ao desenvolvimento da úlcera gástrica, câncer gástrico e ocasionalmente linfoma (TAN e WONG, 2011).

Na atualidade, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o *H. pylori* como carcinógeno Tipo 1 devido a estudos epidemiológicos que demonstraram que o risco de câncer gástrico causado por este patógeno é de aproximadamente 75%. A capacidade de este micro-organismo induzir o processo inflamatório da gastrite sugere que ele seja o responsável na iniciação e promoção da neoplasia gástrica (FIORENTINO et al., 2013).

Ainda que metade da população mundial possua o patógeno, cerca de 80% desses indivíduos não apresentam evidências clínicas e somente 3% deles desenvolvem neoplasias gástricas, podendo sugerir que o meio ambiente, a genética do hospedeiro e o tipo de cepa da bactéria estão envolvidos no desenvolvimento da doença (LIMA e RABENHORST, 2009).

A barreira epitelial gástrica é importante na proteção contra micro-organismos desconhecidos sobre a mucosa. Assim, ela consiste em revestimento de células epiteliais representando a primeira barreira de proteção, possuindo junções localizadas apicalmente entre as células e desempenhando papéis críticos em preservar a integridade da barreira epitelial, função, polaridade celular e adesão intercelular (FIORENTINO et al., 2013).

O *H. pylori*, entretanto, é capaz de produzir enzimas tóxicas como lipases, ureases e proteases que desconfiguram os fatores de proteção do epitélio, além de possuir fácil locomoção para atravessar a camada de muco devido aos seus flagelos. E ainda sintetiza outras enzimas como superóxido dismutase, catalase e arginase que conferem proteção contra atividade lítica de macrófagos e neutrófilos,

impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro, e assim expressando o sucesso da infecção gástrica (LADEIRA et al., 2003; LIMA e RABENHORST, 2009).

A enzima urease hidrolisa a uréia presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando a produção de amônia. Esta, então, atuará como receptor de íons H^+ gerando um pH neutro no meio intracelular, o que garante ao *H. pylori* a resistência a acidez gástrica, considerado um de seus mais conhecidos fatores de virulência (WROBLEWSKI et al., 2010).

Em relação ao tratamento, o regime medicamentoso mais utilizado é a terapia tripla de Maastricht (MACHADO et al., 2008), com associação entre claritromicina, amoxicilina e omeprazol, porém devido ao uso indiscriminado desses medicamentos na faixa etária pediátrica, já é observado no Brasil resistência bacteriana à claritromicina e amoxicilina (CANCELA et al., 2008). Como alternativa, foi lançado a terapia quadrupla com sal de Bismuto recomendada como terapia de segunda linha juntamente com um inibidor da bomba de prótons e dois antibióticos e até mesmo de eventual terapia de primeira linha nas recomendações de Maastricht. Ford et al (2008). Utilizados em curto prazo, 1 a 2 semanas, os compostos de bismuto são seguros (CUNHA E AREIAS, 2010). A resistência a amoxicilina é considerada rara na maioria dos países, entretanto, no Brasil, é o antibiótico mais prescrito para crianças, sendo aproximadamente 38% das cepas já resistentes (CANCELA et al., 2008).

A resistência bacteriana é dada a cepas de micro-organismos capazes de sobreviver e multiplicar-se até mesmo em meio com concentrações elevadas de antimicrobianos, maiores a doses terapêuticas dadas a humanos. Além disso, dentre os diversos problemas encontrados para o aumento da resistência bacteriana destacam-se o erro na seleção, indicação e prescrição dos medicamentos. Muitas

vezes derivados da falta de conhecimento da farmacologia ou diagnósticos incertos (WANNMACHER, 2004). Pacientes que não seguem o tratamento e fazem uso de antimicrobianos de forma excessiva também colaboram para desenvolvimento da resistência bacteriana (COGO, et al.; 2010).

Neste âmbito, esta problemática tornou-se preocupação mundial devido à frequência de pacientes com infecções graves, aliado a altas taxas de mortalidade (ARIAS e CARRILHO, 2012). Adicionalmente, a rápida evolução que torna as bactérias cada vez mais resistentes tem resultado em uma drástica diminuição do arsenal de drogas disponíveis, gerando cepas resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos, fato que torna ainda mais necessária a busca por novas fontes antimicrobianas, principalmente de origem natural (ROCHA et al.; 2011).

Os extratos vegetais mostram uma grande oportunidade de reverter este quadro devido à versatilidade neles presente (DAS et al, 2010). Assim, a fitoterapia e as plantas medicinais proporcionam potenciais terapêuticos e econômicos visados (COSTA et al., 2010).

As plantas medicinais possuem grande diversidade química em sua composição, se destacando no mercado atual e motivando ainda mais pesquisas nessa área. Possuem princípios ativos, conhecidos como compostos secundários de metabolismo, desenvolvidos para defesa contra patógenos e são pertencentes a diferentes classes como terpenos, alcalóides, quinonas, lignanas, flavonoides, xantonas, lactonas, entre outras. Os extratos vegetais e óleos essenciais são uma alternativa na diminuição do uso de medicamentos sintéticos, em vista do custo reduzido, facilidade de acesso e melhorar a atividade terapêutica (VENTUROSOSO et al., 2011).

O uso de plantas medicinais é uma prática muito antiga e durante muitos anos foi o principal recurso terapêutico nos tratamentos. Entretanto, os medicamentos industrializados passaram a ser inseridos gradualmente na sociedade em decorrência de grandes avanços na ciência da saúde e da forte campanha publicitária promovida pelas indústrias com intuito e promessas de cura em diversos diagnósticos. Contudo, no Brasil, grande parte da população continua fazendo uso de terapias adjuvantes para cuidar da saúde (BADKE et al., 2011).

O Brasil destaca-se com seu patrimônio ambiental, ao possuir 25% da flora mundial, um cenário de interesse comercial e com capacidade para desenvolvimento de novos medicamentos. Embora as condições no país facilitem a difusão desta prática terapêutica, destacam-se as propriedades tóxicas que algumas plantas medicinais possuem e são desconhecidas pelos indivíduos, podendo gerar risco à saúde, além de serem comercializadas de maneira não controlada (ALMEIDA et al., 2013).

A Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 971, de 03 de maio de 2006 foi elaborada com o objetivo de estimular os mecanismos naturais de prevenção e recuperação da saúde por meio das práticas integrativas e complementares como as plantas medicinais e fitoterápicos, de forma a garantir a integralidade da atenção à saúde, das condições de bem-estar físico, mental e social estabelecido pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BADKE et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a). Posteriormente, aprovou-se o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), através da Portaria Interministerial nº 2960, de 9 de dezembro de 2008, voltado para o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014b).

Em 2009, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), onde foram selecionadas 71 espécies vegetais após alguns levantamentos em municípios que já faziam uso desta prática. O objetivo foi orientar pesquisas que possam determinar o uso de plantas medicinais e fitoterápicos para a população de forma mais segura e eficaz (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014c). Entre os gêneros listados pelo Ministério da Saúde, encontra-se o *Astronium*.

Diante desta área promissora de estudos, um grupo de pesquisadores composto por uma equipe multidisciplinar, incluindo biólogos, botânicos, farmacêuticos e químicos estão construindo seus estudos e propondo o projeto temático intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, com suporte financeiro da FAPESP (Projeto Biota - processo nº09/52237-9). O projeto tem como objetivo o desenvolvimento de novos fitoterápicos e é constituído de estudos envolvendo plantas incluídas na lista proposta pelo SUS com atividade em doenças crônicas em especial as utilizadas no combate a doenças do trato gastrointestinal, ressaltando o *Astronium* sp, da família Anacardiaceae.

A família Anacardiaceae possui vasta distribuição geográfica, podendo ser encontrada na Argentina, México, Bolívia e Paraguai. No Brasil, é encontrada principalmente no nordeste. A madeira é bem utilizada em construção civil como ripas, caibros por ser resistente e imputrescível (PACHECO et al., 2006).

O gênero *Astronium* é neotropical e reúne espécies arbóreas. É constituído por 13 espécies e 8 variedades (CARMELLO-GUERREIRO e PAOLI, 2000), sendo 12 espécies distribuídas de norte a sul no Brasil, ocupando habitats como o Cerrado no pantanal do Mato Grosso, as florestas da Caatinga e áreas ao redor, floresta

Amazônica e a Mata Atlântica (AGUIAR et al., 2003). No presente trabalho foram estudadas as espécies *Astronium fraxinifolium* e *Astronium graveolens*.

O *Astronium fraxinifolium* (Gonçalo-Alves) (Figura 2) é uma espécie arbórea do Cerrado, característica de terrenos secos, com rochas e melhores condições químicas. A espécie possui madeira compacta e resistente, utilizada na marcenaria até para fino acabamento, construção civil e naval e paisagismo (FEITOSA et al., 2011). Possui excelente qualidade e grande quantidade de tanino, o que a torna resistente à podridão em contato com o solo por longos períodos (AGUIAR et al., 2003).

As cascas e folhas são utilizadas através de chás ou infuso e possuem indicação terapêutica adstringência e ação anti-inflamatória (SILVA et al., 2010a). A presença de taninos na casca da árvore de *A. fraxinifolium* contém atividades antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante e antimicrobiana, sendo usada na medicina popular para bronquite e tuberculose. Enquanto que as raízes e as folhas são usadas principalmente para o tratamento de úlceras, bronquite, resfriados e reumatismos (LEITE, 2002; MARTINS, 2013).

Figura 2. Fotografia de *Astronium fraxinifolium*.



Fonte: Embrapa, 2014.

Silva et al. (2010a) realizaram a triagem fitoquímica de algumas plantas do cerrado, dentre elas, o *A. fraxinifolium*. Os resultados mostraram uma forte presença de taninos, esteróides e triterpenos nas folhas. Maia et al. (2002) estudaram os componentes do óleo essencial de *A. fraxinifolium*, destacando-se a presença de 42,2% de cis-beta-ocimeno, 13,3 % de biciclogermacreno, 13,2% de limoneno e 11,1% de trans-beta-ocimeno.

O *Astronium graveolens* Jacq. (aroeira) (Figura 3) é encontrado no cerrado brasileiro e possui fontes importantes, relatadas na cultura popular, de princípios ativos de seus metabólitos secundários. Mede de 15 a 25 metros de altura e tronco entre 40 a 60 cm de diâmetro. Suas folhas possuem de 4 a 7 pares de folíolos com cheiro característico (SILVA et al., 2010b). A atividade biológica desta espécie está atrelada às substâncias voláteis que ela possui como trans-beta-ocimeno, substância utilizada como repelente para a espécie de formiga *Atta laegivata* (PERES FILHO et al., 2002).

Hernández et al. (2013) estudaram a composição do óleo essencial de *A. graveolens* e constataram que a presença de monoterpenos foi predominante na amostra com porcentagem de 59%, dos quais 23,9% correspondem ao trans- β -ocimeno, 19,8% ao α -pineno, 15,5% ao δ -3-careno e 12,7% ao α -felandren.

Figura 3. Fotografia de *Astronium graveolens*.



Fonte: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014.

Para avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos de plantas medicinais, existem diferentes métodos como o de difusão em ágar, método de macrodiluição e de microdiluição, sendo este último bastante utilizado, pois permite verificar a menor concentração de extratos necessária para inibir o crescimento do micro-organismo, valor conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Esta técnica possui outras vantagens em relação ao menor custo, maior reprodutibilidade e sensibilidade (cerca de 30 vezes mais que outros métodos descritos na literatura), menor quantidade de amostra requerida, possibilidade de utilizar um maior número de amostras ao mesmo tempo (OSTROSKY et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial antibacteriano dos extratos vegetais de *Astronium graveolens* e *Astronium fraxinifolium*.

2.2. Objetivo Específico

Determinar a atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos do caule e das folhas de *Astronium graveolens* e *Astronium fraxinifolium* frente ao *Helicobacter pylori*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

- Agar Müller Hinton + 5% de sangue de carneiro (AS) - Biomérieux®
- amoxicilina - União Química®
- Caldo Müller-Hinton (CMH) - Difco®

- cloreto de sódio - J.T.Baker[®]
- dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma Aldrich[®]
- fosfato de sódio dibásico - J.T.Baker[®]
- fosfato de sódio monobásico - Reagen[®]
- glicerol - Sigma-Aldrich[®]
- resazurina - Sigma-Aldrich[®]
- soro fetal bovino (SFB) - Vitrocell[®]

3.2. Equipamentos

- autoclave vertical - Phoenix[®]
- balança analítica - Shimadzu[®]
- câmara de fluxo laminar - Veco[®]
- espectrofotômetro - Pharmacia LKB Ultrospec III[®]
- espectrofotômetro de microplacas Epoch - Biotek[®]
- estufa de incubação bacteriológica com CO₂ - Forma Scientific[®]
- peagômetro - Marconi[®]
- purificador de água destilada - Millipore[®]
- purificador de água mili-Q - Millipore[®]
- ultrassom - Thornton[®]
- vortex mixer SA8 - Stuart[®]

3.3. Extratos Vegetais

3.3.1. Obtenção e Procedência

As folhas e caules de *A. fraxinifolium* foram coletados em dezembro de 2007 no município de Porto Nacional (TO) pelo Prof. Dr. Cristiano B. Pereira. Exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade de Tocantins em Palmas (TO)

sendo identificadas pelo Prof. Dr. Eduardo R. dos Santos, obtendo o número de registro 333.

As folhas e caules de *A. graveolens* foram coletados em outubro de 2007 em viagens de campo no Bosque dos Jequitibás no município de Campinas (SP) pela pós-graduanda Eliana Ramos do Instituto Agrônomo de Campinas (Campinas). Exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas, sendo identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro do Instituto de Biologia (UNICAMP) obtendo o número de registro 148133.

Os extratos hidroetanólicos utilizados foram obtidos pelo doutorando Leonardo Perez de Souza, do projeto “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” (processo BIOTA-FAPESP nº 09/52237-9) e cedidos pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Campus Experimental do Litoral Paulista - UNESP - São Vicente.

Os extratos foram obtidos pelo método de extração exaustiva de percolação simples segundo a Farmacopéia Brasileira (2010). O processo teve início com o intumescimento prévio de uma quantidade do pó com etanol 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolado. Após esse período, o percolado foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%). O empacotamento foi feito de forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção de 5:1 (cada 5 referente ao percolador, 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolado ficou em 1,0 a 2,0 mL/min/Kg de droga vegetal comum tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm.

Após a extração, os percolados foram rotaevaporados sob pressão reduzida, em temperatura 50 °C. Os extratos foram transferidos para vidros tarados e deixados

em capela até completa eliminação do solvente. Quando necessário, os extratos foram liofilizados para completa remoção da água.

3.3.2. Preparo das soluções dos extratos

Os extratos foram diluídos na concentração de 2000 µg/mL em dimetilsulfóxido - DMSO (20%) e Caldo Müeller Hinton - CMH (80%), como solução-estoque até o início dos experimentos.

3.3.3. Espectro de absorção

Os extratos vegetais adequadamente dissolvidos foram submetidos à leitura em espectrofotômetro (absorvância - Abs) num intervalo de leitura de 400 a 700 nm, para a determinação do comprimento de onda de absorção dos mesmos.

A partir dessas análises, foi possível avaliar o comprimento de onda máximo de absorção dos extratos vegetais e verificar a possível interferência da coloração nas leituras de absorbância para determinar o comprimento de onda na determinação dos CIMs dos extratos.

3.4. Cepa Microbiana

Foi utilizada a cepa padrão de *Helicobacter pylori* ATCC 43504.

3.4.1. Estocagem e Manutenção

A cepa de *H. pylori* foi mantida em CMH contendo 50% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20 °C. Para o uso, o *H. pylori* foi repicado em CMH acrescido de 50% de SFB e incubado a 37 °C, por 72 horas em 10% de CO₂ e umidade controlada.

3.5. Avaliação da atividade antibacteriana

3.5.1. Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão foi padronizada a partir de uma cultura em ágar sangue (AS) de 72 horas com 10% de CO₂, adicionando-se CMH acrescido de 50% de SFB até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala McFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 570 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH acrescido de 50% de SFB, obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

3.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

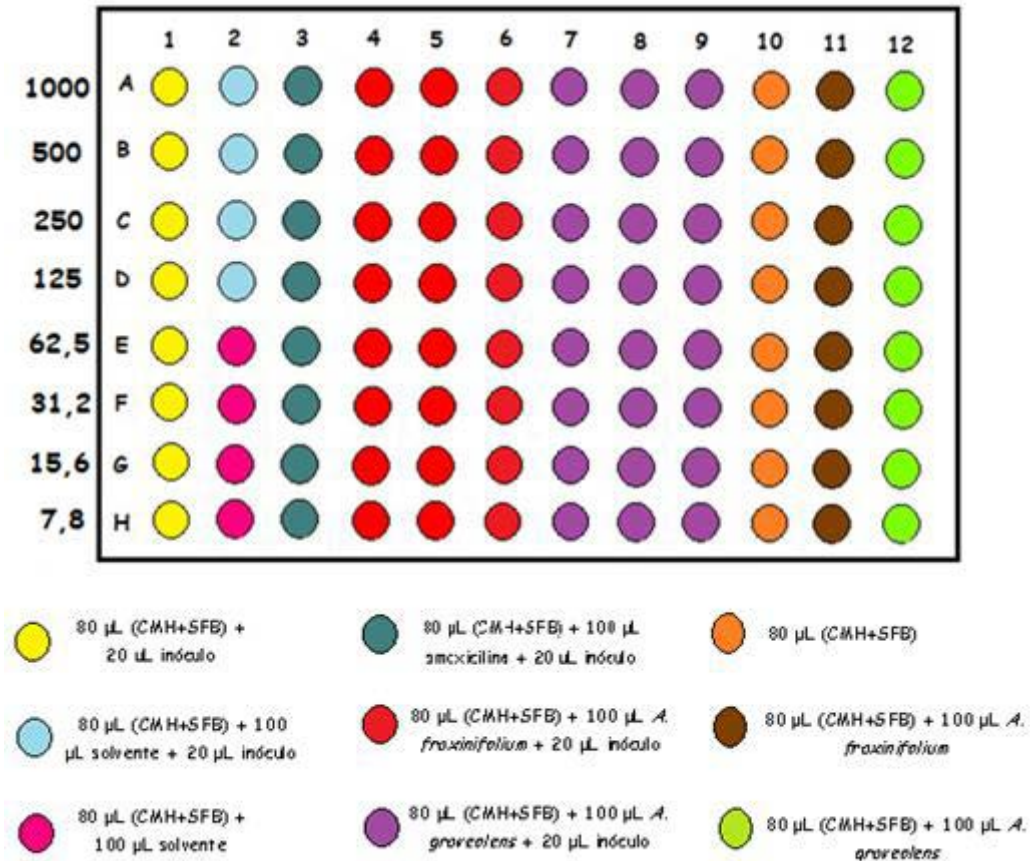
3.5.2.1. Realização do Teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo suplemento M100-S16 do CLSI (2006) adaptada para as bactérias fastidiosas, com modificações.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH acrescido de 50% de SFB. Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções dos extratos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL da suspensão do micro-organismo em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a amoxicilina (1000 µg/mL). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extratos vegetais e o controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 72 horas sob condição de microaerofilia. Em cada microplaca foram testados dois extratos vegetais em triplicata. Os testes foram realizados em triplicata. A Figura 4 mostra esquematicamente a organização dos testes nas microplacas.

Figura 4. Representação da microplaca para determinação da CIM.



Fonte: Autora.

3.5.2.2. Leitura Espectrofotométrica

Após a incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas, obtendo-se valores a partir dos quais foram construídos gráficos que expressam a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com Gudiña et al. (2010).

A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada a CIM a menor concentração do extrato

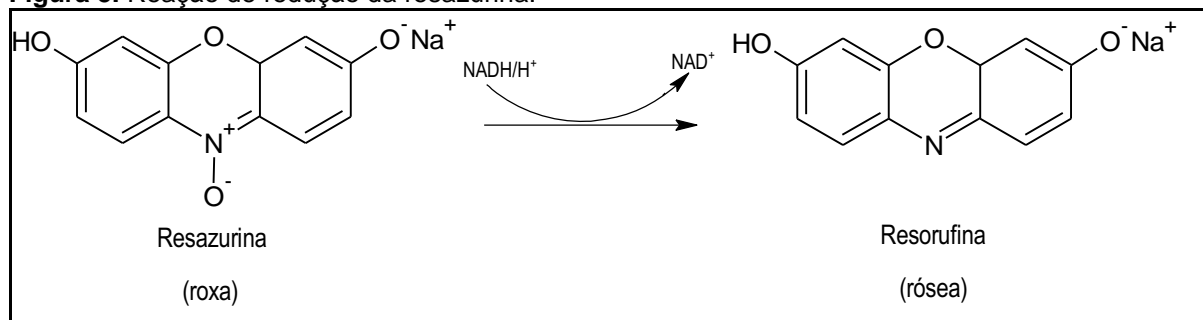
vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008; HAWSER e ISLAM, 1999).

3.5.2.3. Leitura com Revelador

Foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100 µg/mL) do qual 30 µL foi adicionado em cada orifício das microplacas nos testes com bactérias. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea) (Figura 5). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Figura 5. Reação de redução da resazurina.



Fonte: Bonifácio, 2013

3.6. Cálculo da viabilidade microbiana

A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a viabilidade microbiana para cada micro-organismo, que foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias testadas para o micro-organismo de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1 - (Ac/A0)] \times 100$$

onde: Ac representa a média das absorvâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorvância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo e A0 a média das absorvâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010). O resultado final representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do CIM dos extratos vegetais

A CIM dos extratos hidroetanólicos das espécies *A. fraxinifolium* e *A. graveolens* das regiões folha e caule de ambas as espécies estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. CIM dos extratos hidroetanólicos de caule e folhas das espécies de *Astronium* sp através da revelação com resazurina (0,01%).

	Extratos vegetais	CIM (µg/mL)
<i>A. fraxinifolium</i>	AFC	>1000
	AFF	>1000
<i>A. graveolens</i>	AGC	>1000
	AGF	>1000
Amoxicilina		31,25

AFC – caule de *Astronium fraxinifolium*

AGC – caule de *Astronium graveolens*

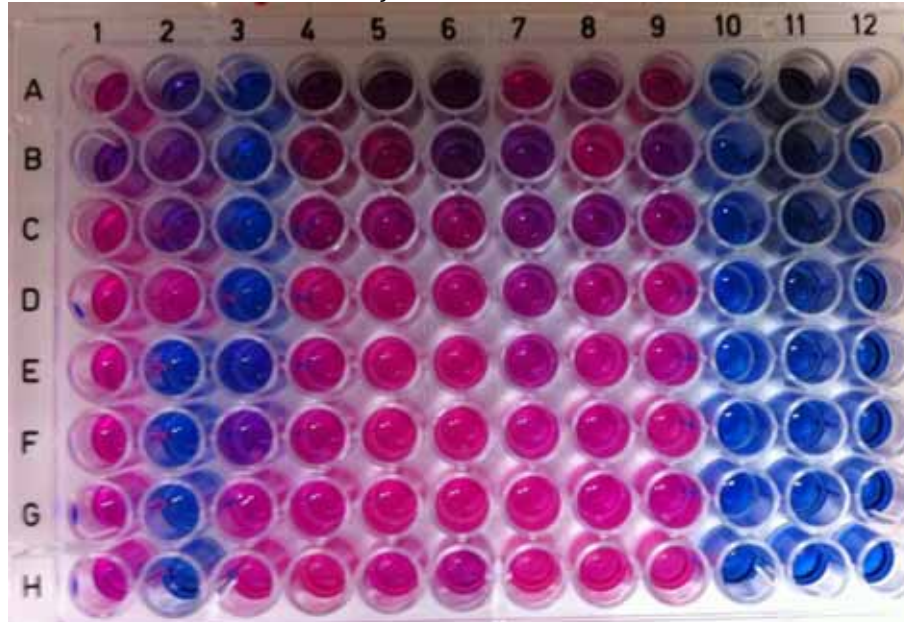
AFF – folhas de *Astronium fraxinifolium*

AGF – folhas de *Astronium graveolens*

A revelação pela resazurina mostrou que os extratos de *Astronium* sp testados: caule e folhas de *A. fraxinifolium* (AFC e AFF), e caule e folhas de *A. graveolens* (AGC e AGF) não apresentaram atividade antimicrobiana contra *H. pylori* nas condições testadas ao apresentarem CIM maiores que 1000 µg/mL. A amoxicilina apresentou CIM de 31,25 µg/mL para *H. pylori*.

A Figura 6 mostra representativamente um ensaio revelado com resazurina 0,01% para *H. pylori*.

Figura 6. Foto do ensaio de microdiluição com bactérias revelado com resazurina (0,01%).



Fonte: Autora

As Figuras 7 e 8 a seguir representam graficamente a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir em diferentes concentrações das substâncias testadas.

Figura 7. Inibição do crescimento de *H. pylori* pelo extrato hidroetanólico do caule de *A. fraxinifolium*.

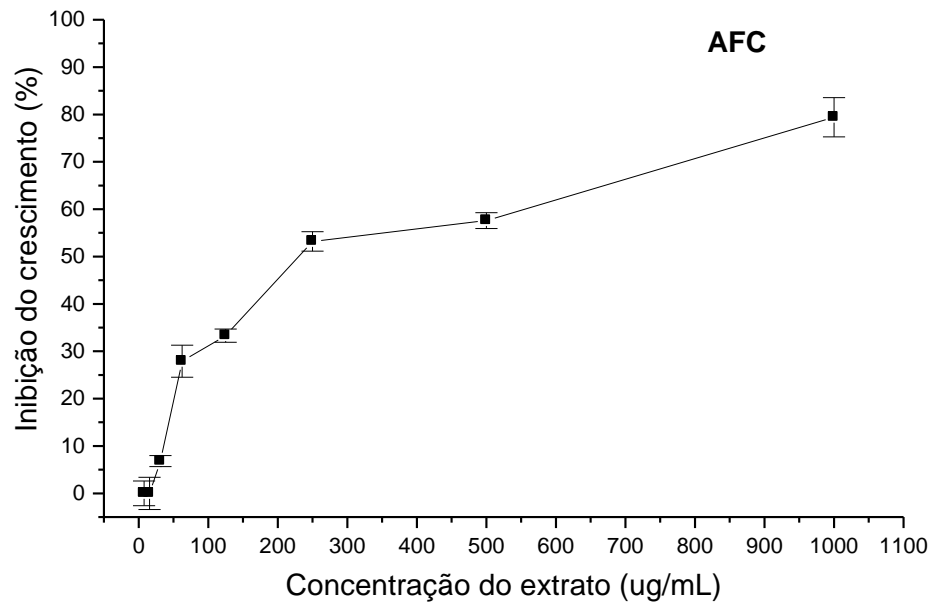


Figura 8. Inibição do crescimento de *H. pylori* pelo extrato hidroetanólico da folha de *A. fraxinifolium*.

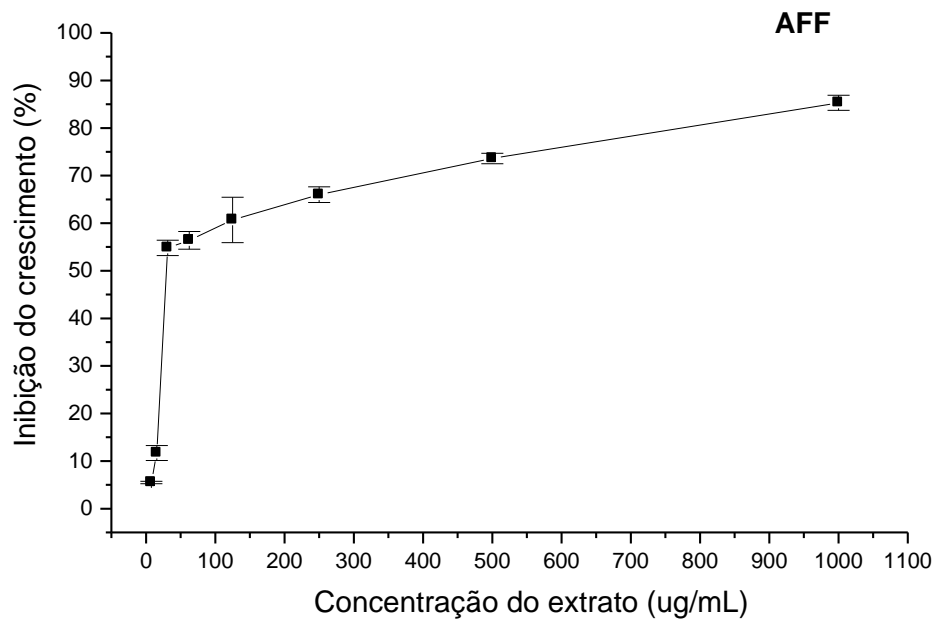


Figura 9. Inibição do crescimento de *H. pylori* pelo extrato hidroetanólico do caule de *A. graveolens*.

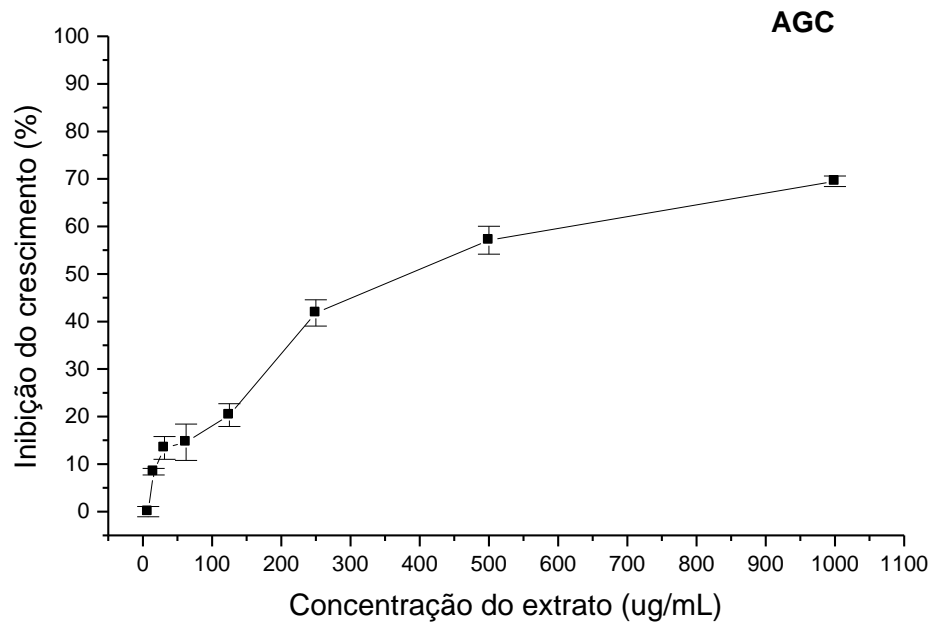
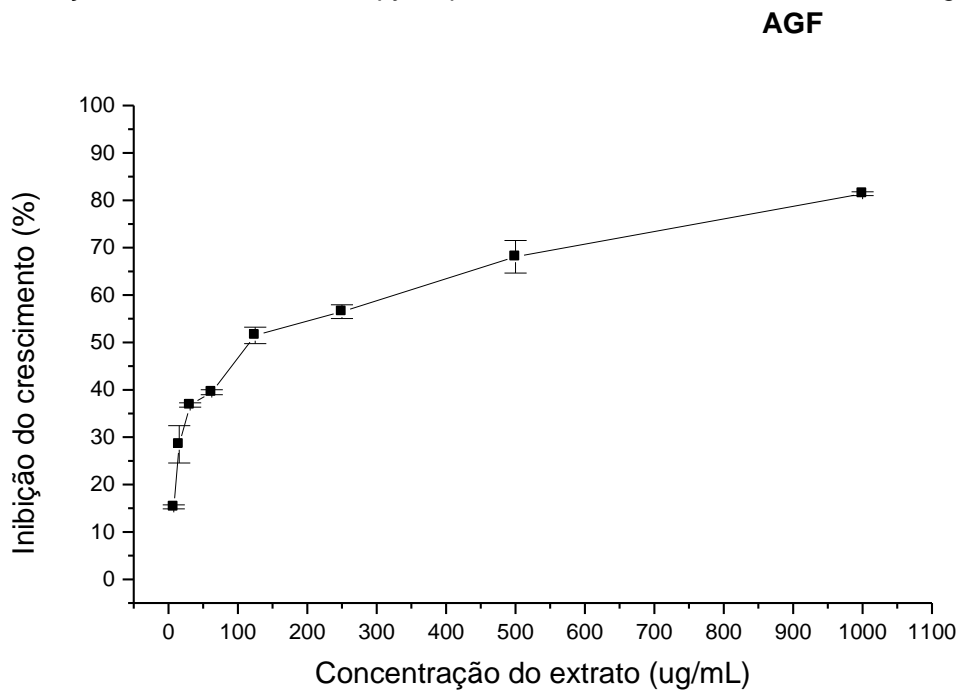


Figura 10. Inibição do crescimento de *H. pylori* pelo extrato hidroetanólico da folha de *A. graveolens*.



Com os valores obtidos da leitura espectrofotométrica foi possível plotar gráficos que relacionam a porcentagem de inibição do crescimento microbiano com a concentração de extrato vegetal. Como observado, todos os extratos de caule e folha de *Astronium sp* apresentaram baixa atividade antibacteriana contra o *H. pylori*, resultando em gráficos cujo ponto maior de inibição ainda é menor que 90% .

Os resultados descritos, no presente trabalho, para os extratos de caule e folha de *A. fraxinifolium* e *A. graveolens* através da revelação com resazurina demonstraram que não houve atividade antimicrobiana, visto a coloração rosa formada na microplaca nos poços de teste. Entretanto, utilizando as leituras espectrofotométricas, cuja precisão é maior, pode-se notar que, de certa forma, os extratos apresentaram atividade, embora em um menor percentual de inibição, não sendo capaz de ser detectada a CIM com o revelador resazurina. Isso decorre da sensibilidade do agente revelador resazurina (cor azul), que é oxidada na presença de células viáveis formando a resorufina, substância de coloração rósea. No entanto, as nuances de cores entre o azul e o rósea podem ocasionar dúvidas na determinação da CIM (STOPPA et al., 2009), detectada nesse caso somente quando ocorre uma porcentagem de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 90% (HÖRNER et al., 2008; GUDIÑA et al., 2010; HAWSER e ISLAM, 1999). Já a leitura espectrofotométrica fornece leituras (de turvação) que variam de 0 a 100 % de inibição de crescimento, demonstrando, portanto, maior sensibilidade. Apesar disso, neste estudo, os resultados da leitura visual foram condizentes com a leitura espectrofotométrica.

Deve-se destacar que os resultados obtidos neste estudo se referem ao potencial antimicrobiano de plantas medicinais, que está relacionado aos metabólitos secundários que elas produzem com função de proteção ou defesa contra ataque de micro-organismos e insetos. Tais metabólitos podem sofrer variações quanto às concentrações nas espécies em decorrência de fatores ambientais como temperatura e condições hídricas (SILVA et al., 2010b).

Não existem relatos observados na literatura a respeito da atividade antibacteriana do *A. fraxinifolium* e *A. graveolens* contra o *H. pylori*, o que estimula

ainda mais a busca por novas estratégias que possam aprimorar a atividade biológica de plantas medicinais e outras fontes naturais. Apesar dos extratos mostrarem-se pouco ativos nestas concentrações testadas, é notória a existência de um percentual entre 70% e 80% de atividade inibitória. Com isso, alternativas como o fracionamento mostram uma nova possibilidade de melhorar a atividade antibacteriana.

5. CONCLUSÃO

Os extratos hidroetanólicos de *A. fraxinifolium* e *A. graveolens* testados quanto ao potencial antibacteriano para *H. pylori* foram pouco ativos com CIM indetectáveis pela revelação com resazurina. Contudo, com o auxílio das leituras espectrofotométricas pode-se notar que houve um potencial inibitório de crescimento bacteriano, destacando a sensibilidade do método, o que deixa ainda mais evidente a necessidade de realizar as duas leituras durante o teste de atividade antimicrobiana e a necessidade de explorar outras alternativas de trabalho com estes extratos, como por exemplo o fracionamento, com finalidade de melhorar a atividade inibitória.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. V.; BORTOLOZO, F. R.; MORAES, M. L. T.; ANDRADE, J. A. C. Genetic variation in *Astronium fraxinifolium* populations in consortium. **Crop Breed. Appl. Biotechnol**, v. 3, n. 2, p. 95-106, 2003.

ALMEIDA, A. A. C.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, R. M. Bioprodutos aplicados à odontologia: prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 3, p. 155-160, 2013.

- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo de preocupação? **Semina Ciênc Agrar.**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- AYESHA, M. H.; JADALAHA, K.; AWADI, E. A.; ALAWNEHA, K.; KHASSAWNEH, B. Association between vitamin B12 level and anti-parietal cells and anti-intrinsic factor antibodies among adult Jordanian patients with *Helicobacter pylori* infection. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 17, n. 6, p.:629-632, 2013.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas Medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc. Anna Nery Rev. Enferm.**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BEIRÃO, E. M.; PADOVAN, A. C. B.; FURTADO, J. J. D.; COLOMBO, A. L.; MEDEIROS, E. A. S. Does the change on gastrointestinal tract microbiome affects host? **Braz. J. Infect. Dis.**, pii: S1413-8670(14)00099-3. doi: 10.1016/j.bjid.2014.04.002, 2014.
- BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados.** 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.
- CANCELA, F. G.; CARVALHO, S. D.; NORTON, R. C.; PENNA, F. J. *Helicobacter pylori* na infância: Particularidades clínicas e terapêuticas da infecção em crianças e adolescentes. **Rev Med Minas Gerais**, v. 18, 4 Supl 3, S13-S16, 2008.
- CARMELO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. Estudo do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) como notas taxonômicas. **Rev. Bras. Bot.**, v. 23, n. 1, p. 87-96, 2000.
- CARTÁGENES, V. D. A.; MARTINS, L. C.; CARNEIRO, L. M.; BARILE, K. A. S.; CORVELO, T. C. *Helicobacter pylori* in children and association with CagA strains in mother-child transmission in the Brazilian Amazon region. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 3, p. 298-302, 2009.
- CAVE, D. R. How is *Helicobacter pylori* transmitted? **Gastroenterology**, v. 133, 6 Suppl, S9-14, 1997.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 6ª ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.
- COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; CUNICO, M. M.; RIBEIRO, M. L.; CAMARGO, E. R.; KUSSEN, G. M. B.; NOGUEIRA, K. S.; COSTA, L. M. D. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p. 304-309, 2010.

COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; ARRUDA, T. A.; OLIVEIRA, P. T.; DAMETTO, F. R.; CARVALHO, R. A.; MELO, M. D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

CUNHA, A. R. B.; AREIAS, J. A. A. P. **Cancro gástrico e *Helicobacter pylori***. 2010. 27f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Porto, Porto, 2010.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **J. Med. Plants Res.**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Base de dados plantas do Pantanal**. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/plantas/fichanc.php?topbusca=Astronium+fraxinifolium+Schott>>. Acesso em: 25 set. 2014.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Guaritá**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/trilhas/lei/lei02.htm>>. Acesso em: 25 set. 2014.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The perpetual challenge of infectious diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, n. 5, p. 454-461, 2012.

FEITOSA, D. G.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R.; PAIANO, M. O. Crescimento de mudas de Gonçalves-Alves (*Astronium fraxinifolium*) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Rev. Árvore**, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2011.

FIORENTINO, M.; DING, H.; BLANCHARD, T. G.; CZINN, S. J.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A. *Helicobacter pylori*-Induced Disruption of Monolayer Permeability and Proinflammatory Cytokine Secretion in Polarized Human Gastric Epithelial Cells. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 3, p. 876-883, 2013.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. Paracasei A20. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999

HERNÁNDEZ, V.; MORA, F.; ARAQUE, M.; MONTIJO, S.; ROJAS, L.; MELÉNDEZ, P.; TOMMASI, N. Chemical composition and antibacterial activity of *Astronium graveolens* jacq essential oil. **Rev. Latinoamer. Quím.**, v. 41, n. 2, p. 89-94, 2013.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; INGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 39, n. 4, p. 335-342, 2003

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Switzerland, v. 5, n. 1, p. 63-77, 2002.

LIMA, V. P.; RABENHORST, S. H. B. Genes associados a virulência de *Helicobacter pylori*. **RBC**, v. 55, n. 4, p. 389-396, 2009.

MACHADO, R. S.; SILVA, M. R.; VIRIATO, A. Furazolidona, tetraciclina e omeprazol: uma alternativa de baixo custo para erradicação de *Helicobacter pylori* em crianças. **J. Pediat.**, v. 84, n. 2, 2008.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. H. L.; ANDRADE E. H. A.; ZOGHBI M. G. B.; CARREIRA L. M. M. Essential oils from *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. and *A. fraxinifolium* Schott ex Spreng. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 1, p. 72–74, 2002.

MARTINS, A. O. B. P. B. **Identificação do perfil químico e avaliação das atividades antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas de *Astronium fraxinifolium* Schott ex.Spreng.(Gonçalvo)**. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Disponível em:
<c> Acesso: 10 set. 2014a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf > Acesso: 10 set. 2014b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plantas de interesse ao SUS. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/cgafb-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>. Acesso: 10 set. 2014c.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- PACHECO, M. V.; MATOS, V. P.; FERREIRA, R. L. C.; FELICIANO, A. L. P.; PINTO, K. M. S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **R. Árvore**, v. 30, n. 3, p. 359-367, 2006.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E. Preferência de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (*Hymenoptera formicidae*) a diferentes espécies florestais, em condições de laboratório. **Ciênc. Florest.**, v. 12, n. 2, p. 1-7. 2002.
- RAMIS, I. B.; MORAES, E. P.; FERNANDES, M. S.; MENDOZA-SASSI, R.; RODRIGUES, O.; JULIANO, C. R. V.; SCAINI, C. J.; SILVA, P. E. A. Evaluation of diagnostic methods for the direction of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 903-908, 2012.
- SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Helicobacter pylori*. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/76496/view>>. Acesso em: 25 set. 2014
- ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; PEREIRA-MAIA, E. C. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Quím. Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.
- SATCHER, D. Emerging Infectious: Getting Ahead of the Curve. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 1995.
- SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010a.
- SILVA, R. M. G.; SARAIVA, T. S.; SILVA, R. B.; GOLÇALVES, L. A.; SILVA, L. P. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* *Astronium graveolens*. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 632-637, 2010b.
- STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; FURTADO, N. A. J. C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quím. Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.
- TAN, V. P.Y.; WONG, B.C.Y. *Helicobacter pylori* and gastritis: untangling a complex relationship 27 years on. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 26, Suppl 1, p. :42-45, 2011.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathol.**, v. 37, n. 1, p.18-23, 2011.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos - ISSN 1810-0791**, v. 1, n. 4 p. 1-6, 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infectious diseases**. Disponível em : <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/>. Acesso em: 03 set. 2014a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.html>>. Acesso em: 04 set. 2014b.

WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer factors that modulate disease risk. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 713-739, 2010.

De acordo,

Aluna: Raquel Martins Loureiro

Orientadora: Profa. Dra.Taís Maria Bauab