

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

Ácido Cafeíco e seus ésteres: inibição do “Burst” oxidativo de neutrófilos e efeito anti-*Helicobacter pylori*.

Luana Chiquetto Paracatu

Araraquara-SP

2012

LUANA CHIQUETTO PARACATU

Ácido Cafeíco e seus ésteres: inibição do “burst” oxidativo de neutrófilos e efeito anti-*Helicobacter pylori*.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Hematologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

Araraquara – SP

2012

Ficha Catalográfica

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

Paracatu, Luana Chiquetto
P222a Ácido cafeico e seus ésteres : inibição do "Burst" oxidativo de
neutrófilos e efeito anti-*Helicobacter pylori* / Luana Chiquetto Paracatu. –
Araraquara, 2012
83 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Luiz Marcos da Fonseca

1. Ácido cafeico. 2. *Helicobacter pylori*. 3. NADPH-oxidase.
4. Quimiluminescência. 5. Lipofilicidade. 6. Antioxidante. 7. Antimicrobiana.
I. Fonseca, Luiz Marcos da, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Ácido cafeico e seus ésteres: Inibição do “burst” oxidativo de neutrófilos e seu efeito anti-*Helicobacter pylori*.

A Comissão examinadora dos trabalhos de Defesa de dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 29/06/2012, considerou a candidata:

(X) Aprovada () Reprovada

**Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca
(Orientador e Presidente)**

**Profa. Dra. Cibele Bonacorsi
(Membro Titular)**

**Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes
(Membro Titular)**

**Profa. Dra. Miriane da Costa Gileno
(Membro Suplente)**

**Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi
(Membro Suplente)**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hematologia Clínica e no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara.

Fomento: Bolsa CAPES – Mestrado

*Não entendo.
Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender.
Entender é sempre limitado.
Mas não entender pode não ter fronteiras.
Sinto que sou muito mais completa quando não entendo.
Não entender, do modo como falo, é um dom.
Não entender, mas não como um simples de espírito.
O bom é ser inteligente e não entender.
É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida.
É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice.
Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco.
Não demais: mas pelo menos entender que não entendo.*

Clarice Lispector

Agradecimentos

À Deus, por toda a força, confiança e coragem. Que nunca me deixou desistir nos momentos mais difíceis, nos momentos em que a saudade, a tristeza e a dúvida tomaram conta de mim.

Àquele que sempre depusitei e deposito todos os meus sonhos e planos!

As minhas querida mãe e irmã, Célia e Naiara, por todo o amor, carinho, dedicação. Às vezes nos esquecemos de dizer o quanto amamos aqueles que mais amamos, e de agradecer por todo o amor e pequenas renúncias que fazemos em prol da felicidade dos nossos entes queridos. Obrigada a vocês que renunciaram momentos, que aguentam a saudade, que sofrem quando choro, que riem comigo quando sucedo. Pelas palavras certas nas horas incertas.

Amo vocês.

Agradeço a minha família que soube entender a ausência, a saudade e sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei. A vocês que nunca saíram dos meus pensamentos, Obrigada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca, pela oportunidade e confiança depositada em mim. Por permitir e colaborar com o meu avanço pessoal e profissional.

Ao professor Dr. Valdecir Farias Ximenes, Obrigada pela atenção, disponibilidade, ajuda, interesse e por ceder seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

À professa Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi, por ceder o laboratório de Microbiologia Clínica para que eu pudesse realizar parte deste trabalho.

À professora Dra. Cibele Bonarcosi, pelas correções e sugestões valiosas oferecidas para a execução e conclusão deste trabalho em todos os momentos. Muito obrigada por estar sempre presente e colaborar com meu crescimento profissional, por dispor do seu tempo, pela atenção, pela amizade.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Carolina, Ana, Maria Luiza, Miriane Maicon. Obrigada por todas as conversas, risadas, ajuda. Pelo apoio, desabafos e pelo tempo disposto quando precisei.

Às amigas Renata, Paula, Grace, Jaqueline, Vânia, Ozeni. Pela amizade, companheirismo, pelo apoio nos momentos bons e ruins. Pela força, por sempre rirem comigo e torcerem por mim. Vocês fazem parte dessa conquista.

À todos que contribuíram com este trabalho direta e indiretamente.

Lista de abreviaturas e unidades

H. pylori: *Helicobacter pylori*

PMN: Polimorfonuclear

LPMN: Leucócitos polimorfonucleares neutrófilos

ERO's: Espécies reativa de oxigênio

O₂^{•-}: Radical ânion superóxido

HOCl: Ácido hipocloroso

Cl₂: Cloro

Cl⁻: Íon Cloro

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

¹O₂: Oxigênio Singlete

OH[•]: Radical Hidroxila

NO[•]: Óxido Nítrico

OONO⁻: Peroxinitrito

SOD: Superóxido Dismutase

MPO: Mieloperoxidase

PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetato

DMSO: Dimetil sulfóxido.

TMB: 3,3',5,5' Tetrametilbezidina

PBS: Tampão Fosfato Salino

NBT: Nitro azul de tetrazólio

BHI: Brain Heart Infusion

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

AmoxS: Amoxicilina sensível

MtzR: Metronidazol resistente

QL: Quimiluminescência

QLDLum: Quimiluminescência dependente de luminol

QLDLuc: Quimiluminescência dependente de lucigenina

μL: Microlitro

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mg: Miligrama

M: Molar

μg: Micrograma

UFC: Unidade formadora de colônias

Lista Figuras

Figura 1: <i>Helicobacter pylori</i> e células inflamadas do epitélio gástrico.....	24
Figura 2: Etapas da infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	25
Figura 3: Mecanismo gerador do ânion superóxido nos leucócitos polimorfonucleares.....	28
Figura 4: Ação da NADPH oxidase, superóxido dismutase e mieloperoxidase.....	29
Figura 5: Reação química dependente de luminol.....	39
Figura 6: Esquema da reação de redução da lucigenina.....	41
Figura 7: Neutrófilo com precipitado negro de formazana no citoplasma.....	43
Figura 8: Efeito do ácido cafeico e seus ésteres no “burst” oxidativo de neutrófilos estimulados pelo <i>H.pylori</i>	47
Figura 9: Análise estatística da comparação da eficiência de supressão da QLDLum de neutrófilos estimulados pelo <i>H.pylori</i> , pelo ácido cafeico e seus ésteres nas concentrações de 10µM e 1 µM.....	48
Figura 10: Efeito do ácido cafeico e seus ésteres no “burst” oxidativo de neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado.....	49
Figura 11: Análise estatística da comparação da eficiência de supressão da QLDLum de neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado, pelo ácido cafeico e seus ésteres nas concentrações de 10µM e 1 µM.....	50
Figura 12: Efeito ácido cafeico e seus ésteres na produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado.....	51
Figura 13: Análise estatística da comparação da eficiência de supressão da QLDLuc de neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado, pelo ácido cafeico e seus ésteres nas concentrações de 10µM e 1 µM.....	52
Figura 14: Efeito ácido cafeico e seus ésteres na inibição da produção ácido hipocloroso por neutrófilos ativados por PMA.....	53
Figura 15: Microscopia de neutrófilos isolados. Neutrófilos separados por Histopaque sem estímulos.....	55
Figura 16: Microscopia de neutrófilos isolados. Neutrófilos estimulados por PMA. Notar a vacuolização dos citoplasmas e a degeneração nuclear (picnose).....	55
Figura 17: Microscopia de neutrófilos isolados. Neutrófilos estimulados por PMA com presença de NBT.....	56

Figura 18: Microscopia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do ácido cafeico na concentração de 10 μ M.....	56
Figura 19: Microscopia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do cafelato de metila a 10 μ M.....	57
Figura 20: Microscopia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do cafelato de butila a 10 μ M.....	57
Figura 21: Microscopia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do cafelato de heptila a 10 μ M.....	58
Figura 22: Fotomicrografia controle positivo. Células + PMA.....	59
Figura 23: Fotomicrografia controle negativo. Células sem a presença do estímulo PMA.....	59
Figura 24: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do ácido cafeico a 10 μ M.....	60
Figura 25: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do cafelato de metila a 10 μ M.....	60
Figura 26: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do cafelato de butila a 10 μ M.....	61
Figura 27: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do cafelato de heptila a 10 μ M.....	61
Figura 28: Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> pelo ácido cafeico e seus ésteres.....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estrutura dos ésteres semi-sintéticos derivados do ácido cafeíco.....	36
Tabela 2: Porcentagem da Inibição da quimiluminescência em neutrófilos estimulados por <i>H.pylori</i>	47
Tabela 3: Porcentagem da inibição da QLDLum em neutrófilos estimulados por zymoan opsonizado.....	49
Tabela 4: Porcentagem da inibição da QLDLuc induzida por zymozan.....	52
Tabela 5: Porcentagem da inibição da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados por PMA.....	54
Tabela 6: Porcentagem de células com precipitado de formazana na presença de ácido cafeico e seus ésteres no teste de redução do NBT.....	54
Tabela 7: Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> pelo ácido cafeíco e seus ésteres.....	63

Resumo

A ação patogênica do *Helicobacter pylori* envolve a colonização do trato gastrointestinal e a produção de EROs por neutrófilos atraídos e ativados pelo agente da infecção. A reação mediada pelos PMN é, todavia, ineficaz para eliminar o *H. pylori* e as EROs contribuem para a lesão tecidual e desenvolvimento de gastrites e úlcera péptica. O ácido cafeico é um dos mais importantes compostos fenólicos, e apresenta diferentes propriedades biológicas, entre elas antioxidante e antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante e anti-*H.pylori* do ácido cafeico e seus ésteres. Foram avaliados os ésteres: cafelato de metila, cafelato de butila e cafelato de heptila e realizada uma comparação entre as propriedades antioxidantes do ácido cafeico e tais ésteres, por meio de ensaio de quimiluminescência dependente de luminol e lucigenina, ensaio de inibição da produção do ácido hipocloroso e também ensaios morfológicos com e sem a presença de NBT. Os resultados deste estudo mostraram que os ésteres do ácido cafeico apresentaram melhores resultados em comparação com o ácido cafeico para a capacidade antioxidante. O cafelato de heptila apresentou os melhores resultados para a quimiluminescência dependente de luminol e lucigenina induzida por *H. pylori* e/ou zymozan opsonizado na concentração de 10 μ M e 1 μ M. O efeito do ácido cafeico e seus ésteres, também foi estudado na inibição da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados com PMA. O cafelato de heptila novamente provou ser melhor em capacidade antioxidante, levando a crer que a lipofilicidade deste composto e dos outros cafelatos, devido à sua estrutura molecular, foi a causa desta melhor atividade. Na avaliação da atividade antibacteriana, os melhores resultados foram demonstrados pelo cafelato de butila e cafelato de heptila, apresentando ambos 100% de inibição do crescimento de *H. pylori*, na concentração de 250 μ g/mL. Muito provavelmente a maior lipofilicidade destes compostos dada a estrutura lipídica da membrana externa do *H. pylori* é também um fator preponderante na atividade antimicrobiana observada.

Palavras-chaves: Ácido cafeico, *Helicobacter pylori*, NADPH-oxidase, quimiluminescência, lipofilicidade, antioxidante, antimicrobiana.

Abstract

The pathogenic action of *Helicobacter pylori* involves the colonization of the gastrointestinal tract and ROS production by neutrophils attracted and activated by the agent of infection. However, the reaction mediated PMN is ineffective to remove the *H. pylori* and ROS contribute to tissue damage and development of gastritis and peptic ulcer. Caffeic acid is one of most important phenolic compounds, and has different biological properties including antioxidant and antimicrobial activities. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activity of caffeic acid and esters. Esters evaluated: methyl caffeic acid ester, butyl caffeic acid ester and heptyl caffeic acid ester and a comparison between the antioxidant properties of caffeic acid and these esters through luminol and lucigenin chemiluminescence assay dependent, inhibition of production of hypochlorous acid assay, morphological tests with and without the presence of NBT. The results of this study showed that the esters of caffeic acid had better results in comparison with caffeic acid to their antioxidant capacity. The heptyl caffeic acid ester showed the best results for the luminol and lucigenin dependent chemiluminescence induced by *H. pylori* and / or opsonized zymozan in the concentrations of 10 μ M and 1 μ M. The effect of caffeic acid and esters, was also studied in inhibiting of production of hypochlorous acid by neutrophils activated with PMA. The heptyl caffeic acid ester again proved to be better at antioxidant activity, implying that the lipophilicity of this compound as well as others caffeic acid esters, due to their molecular structure, was cause of this better activity. In assessing the antibacterial activity, best results were shown by butyl caffeic acid ester and heptyl caffeic acid ester, both with 100% inhibition of growth of *H. pylori* in a concentration of 250 mg / mL. Most probably the higher lipophilicity of these compounds given the lipid structure of the outer membrane of *H. pylori* is also a major factor in the observed antimicrobial activity.

Keywords: caffeic acid, *Helicobacter pylori*, NADPH-oxidase, chemiluminescence, lipophilicity, antioxidants, antimicrobial.

Sumário

Lista de Abreviaturas e unidades

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

Capítulo 1.....	17
1. Introdução.....	18
2. Revisão de Literatura.....	22
2.1 <i>Helicobacter pylori</i> e sua patogenia na geração de úlceras pépticas.....	23
2.2 Leucócitos Polimorfonucleares Neutrófilos.....	26
2.3 Complexo NADPH oxidase e “burst” oxidativo.....	27
2.4 Ácido Cafeico.....	30
3. Objetivos.....	32
4. Material e Métodos.....	34
4.1 Reagentes e soluções.....	35
4.2 Meios de Cultura bacteriana.....	35
4.3 Estímulos.....	35
4.4 Equipamentos.....	35
4.5 Substâncias testes.....	35
4.6 Comitê de Ética para ensaio com neutrófilos isolados humanos.....	36
4.7 Separação dos granulócitos neutrófilos por gradiente duplo de densidade em ficoll-hypaque.....	36
4.8 Viabilidade celular: Teste de exclusão do corante Azul de Trypan.....	37
4.9 Avaliação da inibição da produção EROs do “burst” oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de luminol (QLDLum).....	38
4.10 Avaliação da inibição da produção EROs do “burst” oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina (QLDLuc).....	40
4.11 Inibição da produção de ácido hipocloroso: neutrófilos ativados.....	42
4.12 Teste do Nitro Blue Tetrazolium (NBT).....	42
4.13 Inibidores da degradação dos leucócitos (Estudo morfológico).....	43
4.14 Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i>	44
4.15 Avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	44

5. Resultados.....	45
5.1 Ensaio de viabilidade Azul de Trypan.....	46
5.2 Ensaio de QLDLum com neutrófilos estimulados pela bactéria <i>Helicobacter pylori</i> . Efeito supressor do ácido cafeico e seus ésteres.....	46
5.3 Ensaio de QDLum com neutrófilos estimulados por zymozan. Efeito supressor do ácido cafeico e seus ésteres.....	48
5.4 Ensaio de QLDLuc com neutrófilos induzidos por zymozan. . Efeito supressor do ácido cafeico e seus ésteres.....	50
5.5 Produção de ácido hipocloroso: Neutrófilos ativados.....	53
5.6 Teste do NBT em neutrófilos. Efeito protetor do ácido cafeico e seus ésteres.....	54
5.7 Avaliação da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação por PMA. Proteção exercida pelos ésteres do ácido cafeico.....	58
5.8 Ensaio de Inibição de crescimento de <i>Helicobacter pylori</i>	62
6. Discussão.....	64
7. Conclusão.....	72
8. Referências Bibliográficas.....	74
9. Anexo 1.....	82

1. Introdução

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é reconhecido mundialmente como um dos principais agentes envolvidos no desenvolvimento de gastrite crônica e úlcera péptica, sendo unicamente o microrganismo de sucesso que habita o estômago e duodeno humano, aumentando o risco desenvolver câncer de estômago (KAMKAEN et al, 2006; TOYODA et al, 2009; PASTENE et al, 2009; PANDEY et al, 2010.) *H. pylori* é um bacilo espiral gram-negativo, microaerófilo e secretor de urease, uma enzima que converte a ureia em amônia, que reduz a acidez do estômago, levando a um ambiente gástrico mais propício para o crescimento do microrganismo. A prevalência de contaminação em países desenvolvidos é de cerca de 25 a 50% da população e podem chegar a 90% nos países em desenvolvimento (SÁNCHEZ-ZAUCO, GIONO-CEREZO, MALDONADO-BERNAL, 2010).

Embora os mecanismos envolvidos na inflamação induzida por *H. pylori* não estejam ainda completamente esclarecidos, o papel dos neutrófilos e de espécies reativas de oxigênio (ERO's) na patogênese de doenças associadas com esta bactéria é amplamente relatado (WANG et al, 2008). O termo “burst” oxidativo refere-se a uma série de eventos metabólicos que ocorrem quando os fagócitos são devidamente estimulados os quais envolvem o aumento do consumo de oxigênio e produção de ERO's, essencial para a destruição dos microrganismos fagocitados. Estes eventos dependem inicialmente da atividade de uma oxidase de membrana, a NADPH oxidase. Esta enzima catalisa a redução de oxigênio para radical ânion superóxido, utilizando como doador de elétrons, o NADPH (BARBIOR, 1999). A reação inicial ocorre da seguinte forma:



Os radicais gerados por esta enzima conduzem a produção de uma grande variedade de oxidantes reativos com ação microbicida, mas, em contrapartida, também podem causar uma série de danos teciduais (BARBIOR, 2004).

Durante o “burst” respiratório, a maior parte do oxigênio consumido é convertida em peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , por dismutação espontânea do radical ânion superóxido ou pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). A mieloperoxidase (MPO) na presença de cloreto produz o ácido hipocloroso. A produção de HOCl, e todas as outras ERO's, é parte do processo bactericida do neutrófilo (KITAGAWA et al, 2003).

A infecção pelo *H. pylori* conduz a produção de ERO's, visto que neutrófilos são atraídos para o local da infecção, incorporando as bactérias e ativando-se. A bactéria não é eliminada pelas ERO's liberada pelos neutrófilos, entretanto o fluxo de neutrófilos no local de infecção e a produção de grande quantidade de ERO's contribuem para danos nos tecidos, com desenvolvimento de gastrite crônica e úlcera péptica. A severidade das lesões, aumento do risco de apoptose celular e danos do DNA na mucosa gástrica parecem estar relacionados com a intensidade do estresse oxidativo mediada por ERO's (DING et al, 2007).

A incorporação de drogas ou preparações antioxidantes na terapia de erradicação do *H. pylori* pode diminuir o estresse oxidativo, bem como favorecer a eliminação das bactérias (DUNN, COHEN, BLASER, 1997).

Vários compostos com atividade antioxidantes têm sido isolados de plantas medicinais e alimentos funcionais e os compostos fenólicos são certamente as substâncias mais representativas com esta atividade (FONSECA, 2009).

O ácido cafeico (3,4-dihidroxi ácido cinâmico) é um dos compostos fenólicos mais importantes, apresentando diversas propriedades farmacológicas. É naturalmente encontrado em muitos produtos, como frutas, legumes, vinho, azeite e café, portanto, frequentemente presente na dieta humana. O ácido cafeico tem sido relatado por sua grande variedade de atividades biológicas, incluindo antioxidante, antitrombose, anti-hipertensiva, anti-fibrótica,

propriedades antiviral, atuando como importante scavenging de radicais, e também como quelante de íons metálicos (PRASAD et al, 2010).

2. Revisão de Literatura

2.1 *Helicobacter pylori* e sua patogenia na geração de úlceras pépticas

Há alguns anos acreditava-se que a gastrite crônica e úlceras pépticas fossem resultado 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 associado ao uso de algumas drogas 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, associado a uma dieta alimentar para reduzir a irritação na mucosa gástrica (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 *H. pylori* (Figura 1) e que todos os pacientes diagnosticados deveriam ser submetidos à terapia antimicrobiana (NIH, 1994). Atualmente, estima-se que 50% da população mundial devem estar colonizadas pelo *H. pylori*, podendo ser esse percentual muito maior em países em desenvolvimento, sendo adultos os mais infectados. Entretanto, mesmo em países desenvolvidos a prevalência é significativa, nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de 30% da população está infectada com *H. pylori* e destes, cerca de um terço desenvolve úlcera duodenal (THE HELICOBACTER FOUNDATION, 2011).

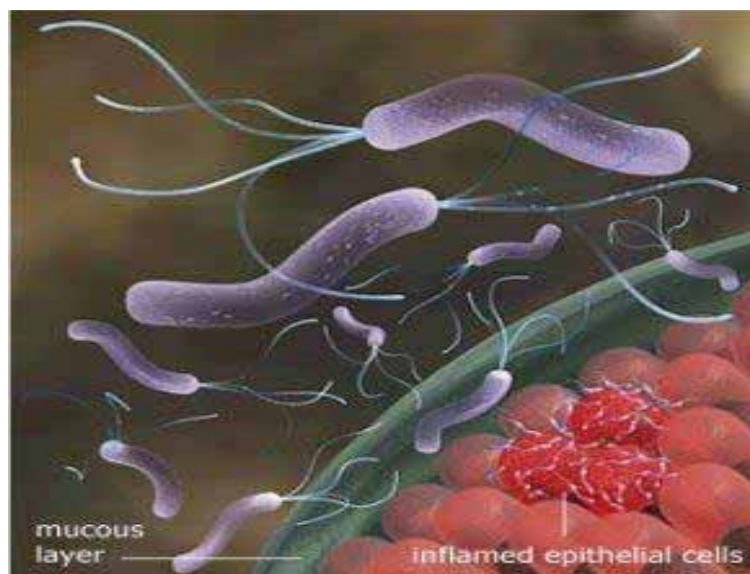


Figura 1 – *Helicobacter pylori* e células inflamadas do epitélio gástrico (THE OSTTEOBELL, 2010).

O estômago é um órgão produtor do suco gástrico, o qual é constituído por enzimas digestivas e ácido clorídrico concentrado, limitando muito o desenvolvimento microrganismos. O mecanismo de defesa do *H. pylori* a este ambiente hostil é extremamente eficaz e consiste na produção, como já reportado, de grande quantidade da enzima uréase (Figura 2), capaz de converter uréia em amônia e bicarbonato, gerando assim um micro-ambiente favorável a sua multiplicação, protegendo-a da acidez estomacal (THE HELICOBACTER FOUNDATION, 2011).



O *H. pylori* pode causar linfoma de alto grau no estômago, sendo a primeira bactéria implicada diretamente como causadora de uma neoplasia (ISAACSON, SPENCER, 1996; NAKAMURA et al., 1997)

Embora os mecanismos envolvidos na inflamação gástrica induzida pelo *H. pylori* ainda não estejam completamente esclarecidos, o papel dos leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (LPMN) e de ERO's na patogênese de doenças associadas a essa bactéria é

amplamente reportado (WANG et al., 2008). Nos estágios iniciais da colonização, um grande número de LPMN migra para o sítio da infecção no lúmen gástrico, cuja presença é mantida durante a fase crônica da doença. Algumas citocinas, como a interleucina-8 (IL-8), que é uma poderosa molécula quimioatratora de neutrófilos, liberadas por mononucleares, especialmente macrófagos, e proteínas expressas pelo próprio *H. pylori* parecem ser importantes para a manutenção do intenso infiltrado neutrofílico na mucosa gástrica (AUGUSTO et al., 2007). Embora sejam fagócitos profissionais, altamente especializados no processo fagocítico e de destruição de microrganismos, os neutrófilos, nesse caso, são incapazes de controlar a infecção causando dano tecidual (KEENAN, PETERSON, HAMPTON, 2005; PASTENE et al, 2009).

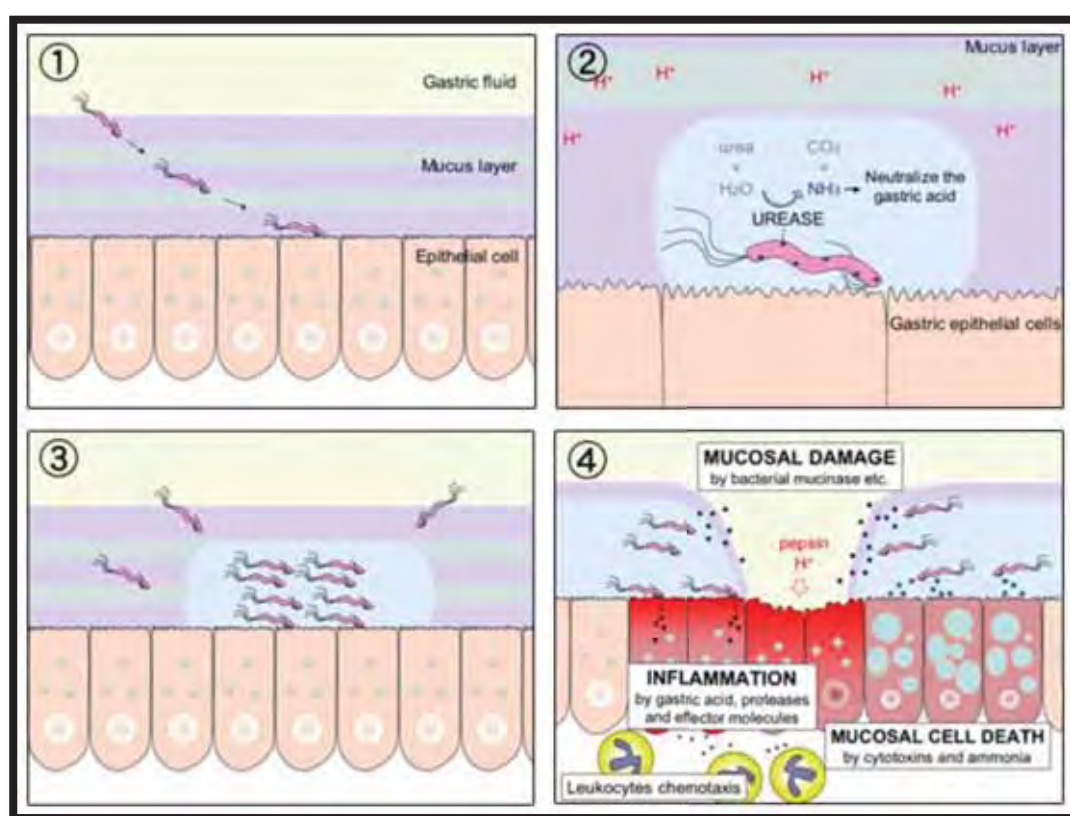


Figura 2: Etapas da infecção por *Helicobacter pylori*. Adaptado de PLUYM, 2010.

2.2 Leucócitos Polimorfonucleares – Neutrófilos

Os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos constituem a primeira barreira interna da defesa inata do hospedeiro contra microrganismos. São células originárias da medula óssea, providas de grânulos contendo várias enzimas proteolíticas. Possuem vida média relativamente curta e sua principal função é de defesa do organismo contra agentes externos. Assim como os macrófagos são móveis e, portanto livres para migrar por diapedese aos sítios de inflamação e, uma vez no local, podem englobar e digerir os microrganismos através da ação de proteínas e enzimas microbicidas contidas nos seus grânulos citoplasmáticos (FREIRE, QUELUZ, 1995). A destruição microbiana envolve basicamente dois eventos celulares: degranulação no vacúolo fagocítico com a formação de fagolisossomo e o “burst” oxidativo com a produção de EROs (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998).

A sequência do processo fagocítico foi visualizada pela primeira vez por Metchnikoff na década de 1880, quando observou a migração de fagócitos para áreas de dano tissular em esponjas e animais inferiores (METCHNIKOFF, 1887).

Somente em 1933 surgiram alguns trabalhos relatando o aumento do consumo de oxigênio, não mitocondrial, (“burst” oxidativo) que acompanha o estímulo fagocítico nos neutrófilos. Baldrige e Gerald usaram a determinação do consumo de oxigênio para verificar se a fagocitose era um fenômeno puramente de contato ou uma resposta biológica com consumo de energia (BALDRIDGE, GERALD, 1993).

No processo bactericida os agentes etiológicos são englobados em vacúolos fagocíticos (fagossomos). Os grânulos dos neutrófilos se fundem a essa estrutura gerando o fagolisossomo. As enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas, estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos atuam sobre os patógenos, na tentativa de eliminá-los. Existem quatro tipos de grânulos que contém diferentes enzimas e proteínas: os azurófilos ou primários, os específicos ou secundários, gelatinase ou terciários e as vesículas secretoras. O

mais importante deles, os grânulos azurófilos, apresentam uma importante enzima na geração das ERO's, a mieloperoxidase (ARNHOLD, 2004; BORREGAARD, COWLAND, 1997; ABBAS, LICHTMAN, 2005). O conteúdo destes grânulos pode ser também liberado no meio extracelular, após a ativação dos neutrófilos.

2.3 Complexo NADPH oxidase e “burst” oxidativo

O termo “burst” oxidativo ou surto respiratório refere-se a uma série de eventos metabólicos que ocorrem quando os fagócitos são apropriadamente estimulados e envolve o aumento do consumo de oxigênio e a produção de ERO's, essenciais para destruição dos microrganismos fagocitados. Tais eventos dependem da atividade de uma oxidase de membrana, a NADPH oxidase, que catalisa a redução do oxigênio à radical ânion superóxido, usando como doador de elétrons o NADPH (BABIOR, 1999).



O sistema NADPH-oxidase (Figura 3) é composto pelas proteínas citosólicas p40 phox, p47phox, p67phox, Rac1 e Rac2 e pelo componente de membrana flavocitocromo b₅₅₈ composto de gp91phox e p22phox. Em células não ativadas, a p40phox, a p47phox e a p67phox encontram-se no citosol celular como um complexo. A separação destes dois grupos de componentes em compartimentos distintos garante a inatividade do complexo enzimático em células inativas. Quando esta célula é exposta a uma ampla variedade de estímulos, o componente citosólico p47phox sofre fosforilação e o complexo citosólico migra para a membrana, onde interage com o citocromo b₅₅₈, a gp91phox e a p22phox para formar o complexo NADPH-oxidase ativo. Este complexo ativo é o responsável pela produção do radical ânion superóxido com a transferência de elétrons da NADPH para o O₂ através da flavoproteína. A ativação requer também a participação de duas proteínas de baixo peso molecular, a Rac2 (citosólica) e a Rap1A ligada ao citocromo b₅₅₈. Durante a ativação, a

Rac2 se liga à guanosina trifosfato (GTP) e migra para a membrana juntamente com o complexo citosólico para se ligar ao citocromo b558 e a Rap1A distribuídos na superfície celular (BABIOR, 1999).

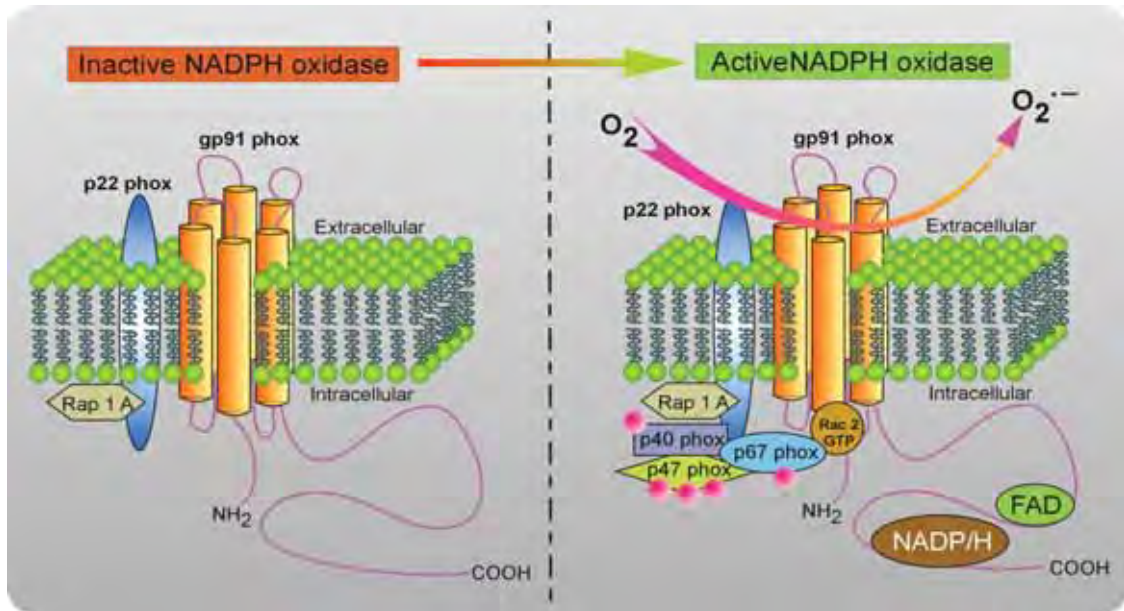


Figura 3: Mecanismo gerador do ânion superóxido nos leucócitos polimorfonucleares (THE GENKYOTEX, 2010).

Uma vez gerado, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Figura 4) sofre conversão para outras EROs que são (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998):

- **Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)** - A maior parte do oxigênio consumido é convertida a peróxido de hidrogênio por dismutação espontânea do radical superóxido, ou pela ação da superóxido dismutase (SOD):



- **Ácido Hipocloroso (HOCl):** O H_2O_2 formado é consumido pela mieloperoxidase que é capaz de utiliza-lo para oxidar uma variedade de compostos aromáticos, além de oxidar o íon cloreto à um potente oxidante, o HOCl.
- **Oxigênio Singlete (1O_2)** - Teoricamente pode ser produzido através da reação do H_2O_2 com HOCl, ou pela dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$:



- **Radical Hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$):** Uma pequena parte do H_2O_2 produzido reduz alguns complexos de ferro para formar o radical hidroxila.
- **Óxido Nítrico ($\text{NO}^{\cdot}$):** Formado por via independente pela ação da enzima óxido nítrico sintetase.
- **Peroxinitrito ($\text{OONO}^{\cdot}$):** Produto formado pela reação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ com o $\text{NO}^{\cdot}$. É um potente oxidante com propriedades similares ao radical hidroxila.

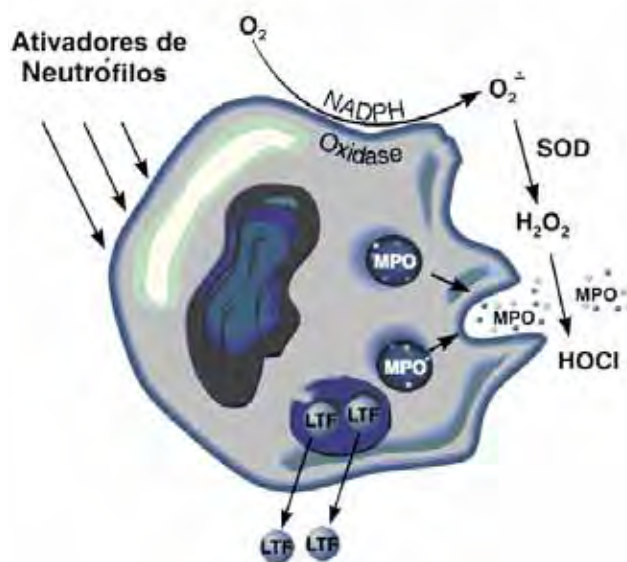


Figura 4: Ação da NADPH oxidase, superóxido dismutase e mieloperoxidase (BRENNAN et al., 2003).

Como para quase tudo que diz respeito aos mecanismos de defesa do organismo, o lado vital da geração de ERO's como espécies microbicidas é contraposto pela sua efetiva participação em doenças de cunho inflamatório. Este é o caso da gênese e progressão da aterosclerose, doenças vasculares associadas ao diabetes, artrite reumatóide, falência renal, asma, colite ulcerativa, mal de Alzheimer, incluindo gastrite e úlcera associada ao *H. pylori*. Em todos estes casos, crescentes evidências sugerem uma efetiva participação do complexo NADPH-oxidase via estimulação crônica de células endoteliais, neutrófilos, macrófagos

(JOHNSON, 2002). A modulação e controle da atividade exacerbada desse complexo enzimático em neutrófilos tornaram-se recentemente alvo de grande número de pesquisas que procuram encontrar moléculas naturais ou sintéticas com essas propriedades.

2.4 Ácido Cafeico

Compostos com atividade antioxidante têm sido isolados das mais diversas famílias de plantas (FONSECA, 2009) e os compostos fenólicos são, por certo, as substâncias com maior representatividade desta atividade.

O ácido cafeico é um composto fenólico antioxidante, que neutraliza radicais livres que possam causar danos oxidativos nas membranas celulares e DNA. É um dos hidroxycinamatos mais amplamente distribuídos e pode ser encontrado em diversas formas como ésteres e amidas (FU et al., 2010). Esse ácido ajuda a prevenir danos às nossas células causados pela luz ultravioleta e também apresenta muitas outras atividades biológicas além do poder antioxidante, como por exemplo, anti-hipertensiva, anti-fibrótica, antiviral, anti-tumorigênica (PRASAD et al., 2010).

Alguns autores observaram o efeito hipoglicemiante deste ácido, demonstrando que este composto fenólico pode reduzir os níveis de glicose no sangue (JUNG et al., 2006; CHENG et al., 2003).

Ácidos fenólicos têm sido reportados como importantes antioxidantes, com capacidade “scavenging” de radicais livres e poder quelante de metais como ferro. Conhecidamente absorvido pela corrente sanguínea, o ácido cafeico apresenta capacidade de proteger *in vitro* a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, além de apresentar um grande poder inibidor de dano no DNA dependente de ferro (HYNES, O’COINCEANAINN, 2004; CHAO, HSU, YIN, 2009).

Este ácido pode ser encontrado em diversas frutas como maçã, uva, tomate e ameixas. Diversos autores mostram a presença de ácido cafeico e outros ácidos fenólicos no própolis e mel (JAGANATHAN, MANDAL, 2009; SALOMÃO et al., 2007). Na China, ele foi isolado das folhas de *Alsophila spinulosa*, planta descrita com propriedades úteis no tratamento da hepatite e gota (CHIANG, LO, LU, 1994).

Um estudo realizado por Kuenzing et al. (1984), demonstrou que o ácido cafeico e o ácido ferúlico podem desempenhar um papel na defesa do organismo contra a carcinogênese, inibindo a formação de compostos N-nitrosos (KUENZING et al, 1984).

Estéres de ácidos fenólicos podem apresentar uma maior lipofilicidade com células eucarióticas, o que resulta em uma melhor interação com as mesmas e, no caso dos neutrófilos, essa interação possivelmente resultaria em uma maior efetividade antioxidante, visto que as ERO's são originadas, como já vimos anteriormente, por uma enzima de membrana.

Pelo exposto, seria de considerável interesse clínico, a avaliação do ácido cafeico e seus ésteres quanto a uma possível atividade antioxidante e anti - *Helicobacter pylori*, considerando que a ação patogênica dessa bactéria envolve a colonização do trato gastrointestinal e também produção de grande quantidade de ERO's por neutrófilos atraídos para o local da infecção. Dessa forma moléculas que inibem concomitante a colonização bacteriana e as ERO's produzidas por neutrófilos seriam potenciais agentes terapêuticos nas patologias associadas a essa bactéria.

3. Objetivos

Objetivo Geral

Estudar o potencial do ácido cafeico e seus ésteres semi-sintéticos como inibidores do complexo NADPH-oxidase, e consequentemente anti-EROs, em fagócitos por metodologia *ex vivo*, simulando assim a ação potencialmente farmacológica dessas moléculas em condições próximas a testes *in vivo*. Avaliar também o efeito anti-*Helicobacter pylori* desses compostos.

Objetivos Específicos

- Avaliar a inibição de EROs produzidas no “burst” oxidativo em neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos normais por quimiluminescência dependente de luminol (QLDLum) e quimiluminescência dependente de lucigenina (QLDLuc).
- Avaliar a inibição da produção de ácido hipocloroso em neutrófilos ativados.
- Observar a proteção do ácido cafeico e seus ésteres à membrana dos neutrófilos frente à ativação por PMA, através de ensaios morfológicos.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos para a bactéria *Helicobacter pylori*.

4. Material e Métodos

4.1 Reagentes e soluções

Os reagentes e soluções utilizados neste estudo foram: Histopaque 1077 e 1119 (Sigma), Tampão PBS, Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck), Azul de Trypan (Vetel), Líquido de Lázarus, Luminol (Sigma), Lucigenina (Sigma), Nitro Azul de Tetrazólio (NBT) (Sigma) fornecidos pelo Laboratório de Hematologia Clínica.

4.2 Meios de Cultura bacteriana:

Os meios de cultura para *Helicobacter pylori* foram: Ágar Columbia (Acumedia), Caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Acumedia) e soro fetal bovino (Cultlab) fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica.

4.3 Estímulos

Os estímulos celulares utilizados nos testes foram fornecidos pelo laboratório de Hematologia Clínica e Microbiologia Clínica: *Helicobacter pylori* (cepa ATCC 43504), Zymozam (Sigma), PMA (Sigma).

4.4 Equipamentos:

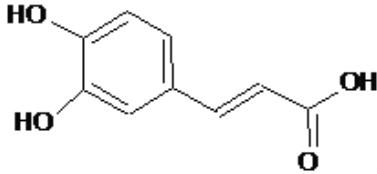
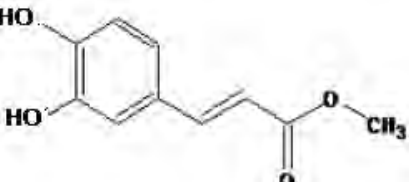
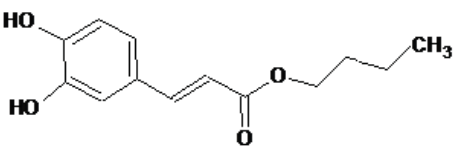
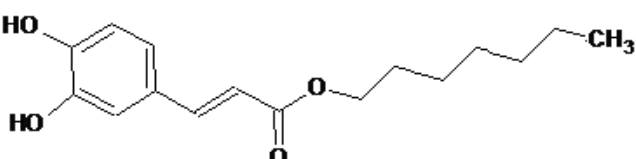
Luminômetro: Synergy 2 – BioTek, Espectrofotômetro multicanal: Tecan- Spectra, Citospin: Citospin 248 – FANEM, Banho Maria: Fabbe. Centrífuga: Segurita r:16 cm, Balança: Gehaka AG 200.

4.5 Substâncias testes:

Ácido Cafeico e seus ésteres (Tabela 1): Cafelato de Metila, Cafelato de Butila, Cafelato de Heptila. Estes compostos foram isolados e sintetizados no laboratório de Química

Orgânica do Instituto de Química - Unesp Araraquara, trabalho de Iniciação Científica Bolsa Fapesp 2009/08699-8, 2009, orientadora Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva.

Tabela 1: Estrutura dos ésteres semi-sintéticos derivados do ácido cafeíco.

1- Ácido Cafeico	
2- Cafelato de metila	
3- Cafelato de Butila	
4- Cafelato de Heptila	

4.6 Comitê de Ética para ensaio com neutrófilos isolados humanos

O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, autorizando a coleta do material conforme o documento apresentado no Anexo 1.

4.7 Separação dos granulócitos neutrófilos por gradiente duplo de densidade em ficoll-hypaque

Método que utiliza HISTOPAQUE®-1119 e HISTOPAQUE®-1077 (Sigma) para separar as células mononucleares e os polimorfonucleares (BOYUM, 1968).

Em tubo falcon estéril foram adicionados 3 mL de HISTOPAQUE®-1119, cuidadosamente acrescentou-se 3 mL de HISTOPAQUE®-1077 e 6mL de sangue total. Centrifugou-se a 700 g por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formaram-se duas camadas distintas de células separadas pela sua densidade. A camada superior composta de células mononucleadas foi aspirada utilizando-se uma pipeta de Pasteur e desprezada. A segunda camada composta de polimorfonucleares foi transferida para outro tubo falcon estéril e adicionados 10mL de tampão PBS para 1ª lavagem, centrifugando-se por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado novamente 10 mL de PBS para a segunda lavagem. Novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS suplementado (10 mL de PBS mais 100 µL solução de glicose (1 mg/mL), 100 µL de solução de cloreto de magnésio (0,5 mM) e 100 µL de solução de cloreto de cálcio (1mM)). A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, onde as células foram diluídas a 1/20 (10 µL de suspensão de polimorfonucleares em 190 µL de Líquido de Lázarus) Após a contagem a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 5×10^6 células/mL e empregadas nos ensaios na concentração final de 1×10^6 células/mL.

4.8 Viabilidade Celular: Teste de exclusão do corante Azul de Trypan

50 µL de suspensão de LPMN na concentração de 1×10^6 células/mL em tampão PBS foram incubados por 90 minutos a 37°C na presença de ácido cafeico e seus ésteres em diferentes concentrações. Como controle a mesma quantidade de células foi incubada em tampão PBS na ausência das substâncias. Após período de incubação, acrescentou-se 20 µL da solução do corante Azul de Trypan por 5 minutos à temperatura ambiente. Em câmara de Neubauer, as células vivas, portanto íntegras e viáveis, apresentaram-se brilhantes e transparentes enquanto que as células mortas mostraram-se coradas de azul, pois sua

membrana perde a capacidade de repelir o corante, permitindo a entrada do mesmo. A porcentagem de células viáveis foi definida pela fórmula:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = [\text{células vivas} / (\text{células vivas} + \text{células mortas})] \times 100.$$

4.9 Avaliação da inibição da produção EROs do “burst” oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de luminol (QLDLum)

A oxidação do luminol (5-Amino-2,3-dihidro- 1,4-phthalazinedione) em meio aquoso, e consequentemente sua quimiluminescência, pode ser obtida por vários agentes oxidantes como as EROs (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical ânion superóxido e mesmo o oxigênio singlete), sempre na presença de um catalisador como íons inorgânicos (ânion persulfato, cátions de Fe^{+3} , Ca^{+2} e Cu^{+2} e seus complexos), metaloproteínas (citocromo C, haptoglobina), e enzimas como peroxidase de raiz forte (HRP) e MPO. Em soluções tamponadas e na presença de enzimas como a HRP ou MPO, o monoânion luminol é univalentemente oxidado por uma variedade de oxidantes, e posteriormente, o radical superóxido é introduzido, produzindo um alfa-hidroxiperóxido, com posterior adição intramolecular e formação de um endoperóxido. Após liberação do N_2 , forma-se o aminoftalato no estado eletronicamente excitado que ao decair ao seu estado fundamental produz luminescência (SANTOS, SANTOS, COSTA, 1993). A quimiluminescência dependente de luminol é utilizada para a detecção de todas as ERO formadas no “burst” oxidativo, indistintamente (Figura 5).

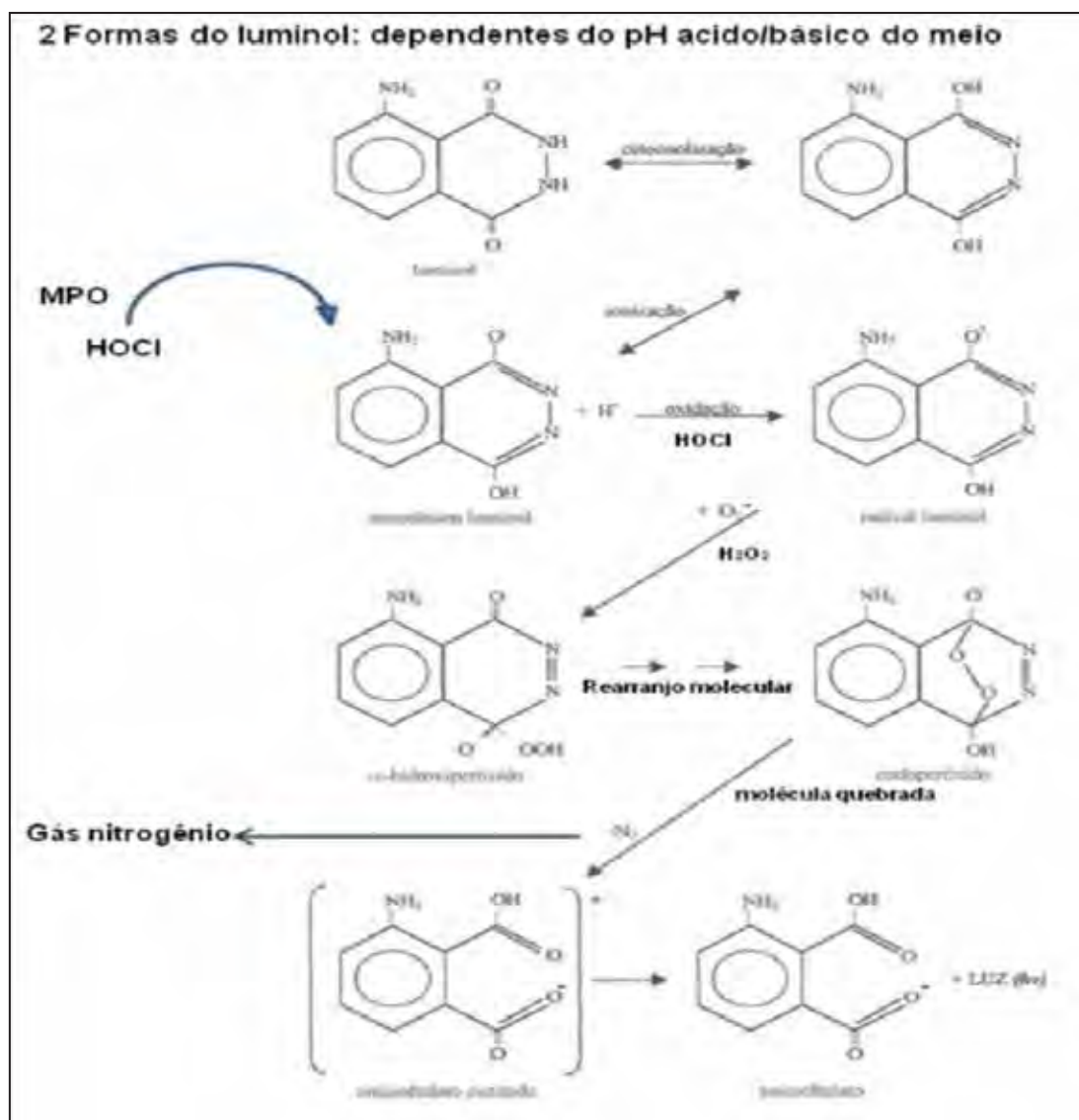


Figura 5: Reação química dependente de luminol. As EROs convertem o luminol via oxigenação em intermediários instáveis e excitados emitindo luz na forma de fótons.

Procedimento:

Foi preparada uma solução estoque de luminol 10⁻² M dissolvendo 0,002 g em 1 mL de tampão PBS. Suspensão de *H. pylori* (a 0,2 UDO) ou zymozam opsonizado (1mg/mL) foi usado como estímulo do “burst” oxidativo. O ácido cafeico e seus ésteres foram preparados nas concentrações de: 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM sendo suas concentrações na reação final: 100 µM, 10 µM, 1 µM e 0,1 µM. Para realização dos testes adicionou-se a placa de leitura: tampão PBS suplementado, suspensão celular de neutrófilos (1 x 10⁶ células/mL),

luminol (1×10^{-5} M), as substâncias em diferentes concentrações e estímulos do “burst” oxidativo: *H. pylori* ou Zymozan opsonizado. Após posicionamento da placa na câmara de leitura do luminômetro, o monitoramento da reação foi iniciado. O tempo de reação variou conforme o estímulo: 30 minutos para zymozan opsonizado e 90 minutos para *H. pylori*. (KITAGAWA et al., 2003; GALICE et al., 2006).

4.10 Avaliação da inibição da produção EROs do “burst” oxidativo. Ensaio quimiluminescente dependente de Lucigenina (QLDLuc)

Lucigenina (Nitrato bis -N- metil acridina) tem sido usada especificamente para quantificação da geração de anion superóxido no “burst” oxidativo de neutrófilos e outras células (GASBARRINI et al., 1998; ALVES et al., 2003). A reação acontece quando ocorre a redução da lucigenina para seu radical cátion lucigenina e este reage com o ânion superóxido formando um dioxetano que se quebra descompondo-se em duas moléculas de acridina, uma eletronicamente excitada e que emite luz ao voltar ao seu estado fundamental (SPASOJEVIC et al., 2000) (Figura 6).

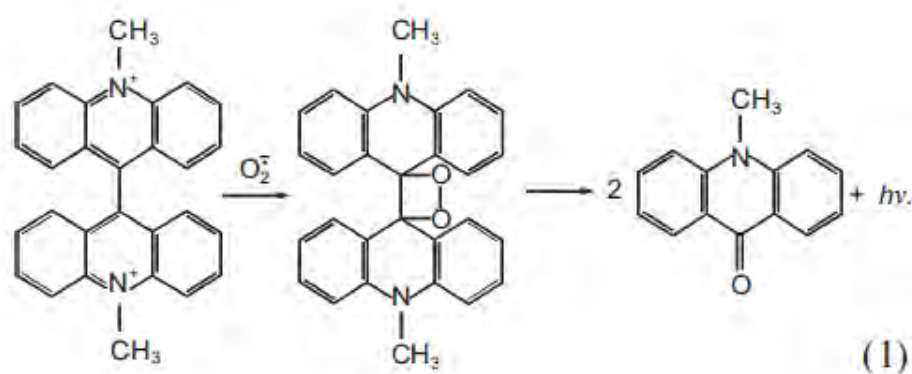


Figura 6: Esquema da reação de redução da lucigenina (SCHEPETKIN, 1999).

Procedimento:

Foi preparada uma solução estoque de lucigenina 250 μM dissolvendo 25 μL desta em 975 mL de tampão PBS, estando uma concentração final a 10 μM . O estímulo do “burst” oxidativo foi zymozam opsonizado. O ácido cafeico e seus ésteres foram preparados nas concentrações de: 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM sendo suas concentrações na reação final: 100 μM , 10 μM , 1 μM e 0,1 μM . Como controle neste ensaio utilizou-se uma substância conhecida por inibir a NADPH oxidase e, portanto inibidor de ânion superóxido, a apocinina. As concentrações utilizadas de apocinina foram as mesmas citadas acima. Para realização dos ensaios adicionou-se a placa de leitura: tampão PBS suplementado, suspensão celular de neutrófilos (1×10^6 células/mL), lucigenina (1×10^{-5} M), as substâncias em diferentes concentrações e o estímulo do “burst” oxidativo (zymozan opsonizado). Após posicionamento da placa na câmara de leitura no luminômetro, o monitoramento da reação foi iniciado. O tempo de reação foi padronizado em 30 minutos para zymozan opsonizado (KANEGAE et al, 2007; KITAGAWA et al., 2003).

4.11 Inibição da produção de ácido hipocloroso: neutrófilos ativados.

A determinação da produção de HOCl por neutrófilos foi baseada na reação do HOCl com taurina para produzir taurina cloramina. A MPO e H_2O_2 foram produzidos através de neutrófilos estimulados por PMA. Suspensão de LPMN (1×10^6 células/mL) foi pré-incubada a 37°C durante 10 minutos em PBS suplementado contendo 10 mM de taurina e os compostos testados. Em seguida, as células foram estimuladas pela adição de PMA (0,1 μM) e incubadas durante mais 30 minutos a 37°C. A reação foi parada por adição de catalase (20 $\mu\text{g/mL}$) e os tubos de reação foram centrifugados a 2000 rpm. Os sobrenadantes (200 μL) foram transferidos para uma placa de 96 poços e 50 μL solução de TMB foi adicionado. A inibição da produção de HOCl foi calculada medindo a quantidade de taurina cloramina produzida no

controle, no qual as células foram incubadas na ausência dos compostos testados. A diminuição na absorbância foi medida a 655 nm e comparada com a do controle.

4.12 Teste do Nitro Azul de Tetrázolio (NBT)

Adicionou-se a microtubos LPMN (1×10^6 células/mL), tampão PBS, DMSO 2%, PMA como estímulo a $0,1 \mu\text{M}$ e as substâncias nas concentrações finais de $10 \mu\text{M}$. Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se aos tubos de reação solução de NBT ($1,22 \text{ mM}$) e incubou-se mais 30 minutos em temperatura ambiente (CIARLINI et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2009). Após incubação confeccionou-se lâminas com auxílio da centrífuga CitoSpin, obtendo-se uma camada monocelular de células. Corou-se com corante de rotina hematológica, May Grounwald/Giemsa. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x), estabelecendo-se a percentagem de células positivas que apresentavam grânulos escuros de formazana no seu citoplasma (NBT reduzido pelo radical ânion superóxido) (Figura 7).

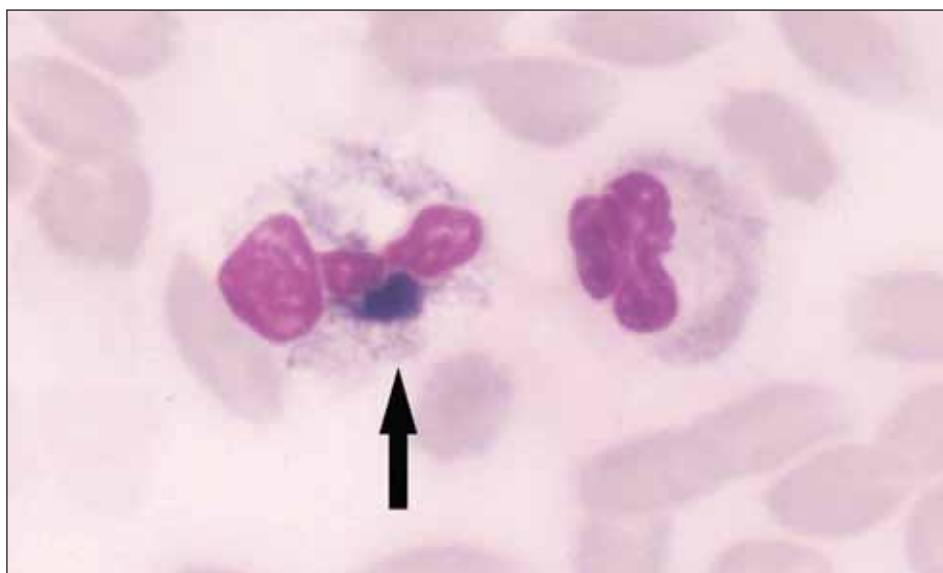


Figura 7: Neutrófilo com precipitado negro de formazana no citoplasma.

4.13 Ensaio para avaliação da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação por PMA

Em tubos tipo *eppendorf* foram adicionados PBS, LPMN (1×10^6 células/mL), ácido cafeico e seus ésteres ($10 \mu\text{M}$) e PMA ($0,1 \mu\text{M}$). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, $100 \mu\text{L}$ da reação foram utilizados para fazer lâmina em CitoSpin, a qual foi corada com corante hematológico (May Grounwald/Giemsa). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de imersão ($100\times$), estabelecendo-se qualitativamente a morfologia celular em relação aos controles positivo apresentando dano celular e negativo com ausência de dano celular.

4.14 Atividade anti-*Helicobacter pylori*: microrganismo

Helicobacter pylori (cepa ATCC 43504), amoxicilina sensível (AmoxS) e metronidazol resistente (MtzR), foi semeado em placas contendo ágar Columbia, suplementado com 10% de soro fetal bovino, as quais foram incubadas por 72 horas a 36°C - 37°C , em atmosfera contendo 10% de CO_2 .

4.15 Avaliação da atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Cavidades de microplaca foram preenchidas com $100 \mu\text{L}$ de caldo BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo diferentes concentrações ($62,5$ a $1000 \mu\text{g/mL}$) das substâncias testes sobre os quais foi adicionado o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* (10^6 UFC/mL em caldo BHI contendo 10% de soro fetal bovino). Leitura espectrofotométrica em 620 nm foi realizada e a microplaca incubada a $36\text{-}37^\circ\text{C}$, em atmosfera contendo 10% de CO_2 , 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 absorbância 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 das substâncias testes) e controle de cor (meio de cultura acrescido de diferentes concentrações das substâncias testes). A CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes (NCCLS, 1999; OSATO et al., 2001; NCCLS, 2003).

5. Resultados

5.1 Ensaio de viabilidade Azul de Trypan

Como relatado em Material e Métodos, utilizamos esse teste para avaliação da viabilidade celular dos neutrófilos frente às diferentes concentrações do ácido cafeico e seus ésteres. O corante Azul de Trypan tem a capacidade de penetrar somente em células mortas, que tiveram a integridade funcional da sua membrana destruída. Para todas as substâncias, nas diferentes concentrações utilizadas nos ensaios deste estudo, o método demonstrou uma viabilidade celular acima de 95%, valor esse igual aos controles sem os compostos químicos. A concentração final de DMSO nas maiores concentrações do ácido cafeico e ésteres avaliados não ultrapassou 2%.

5.2 Ensaio de QLDLum com neutrófilos estimulados pela bactéria *Helicobacter pylori*.

Efeito supressor do ácido cafeico e seus ésteres.

O efeito do ácido cafeico e seus ésteres sobre o “burst” oxidativo de neutrófilos induzido pelo *H. pylori* é apresentado na Figura 8. Em todas as concentrações testadas o ácido cafeico demonstrou menor eficácia comparada aos seus ésteres. Na concentração de 1 μ M tivemos: cafelato de heptila > cafelato de butila = cafelato de metila > ácido cafeico. Dentre os ésteres, o cafelato de heptila demonstrou melhor eficácia especialmente quando observamos a concentração de 1 μ M, comparada com a mesma concentração do cafelato de butila.

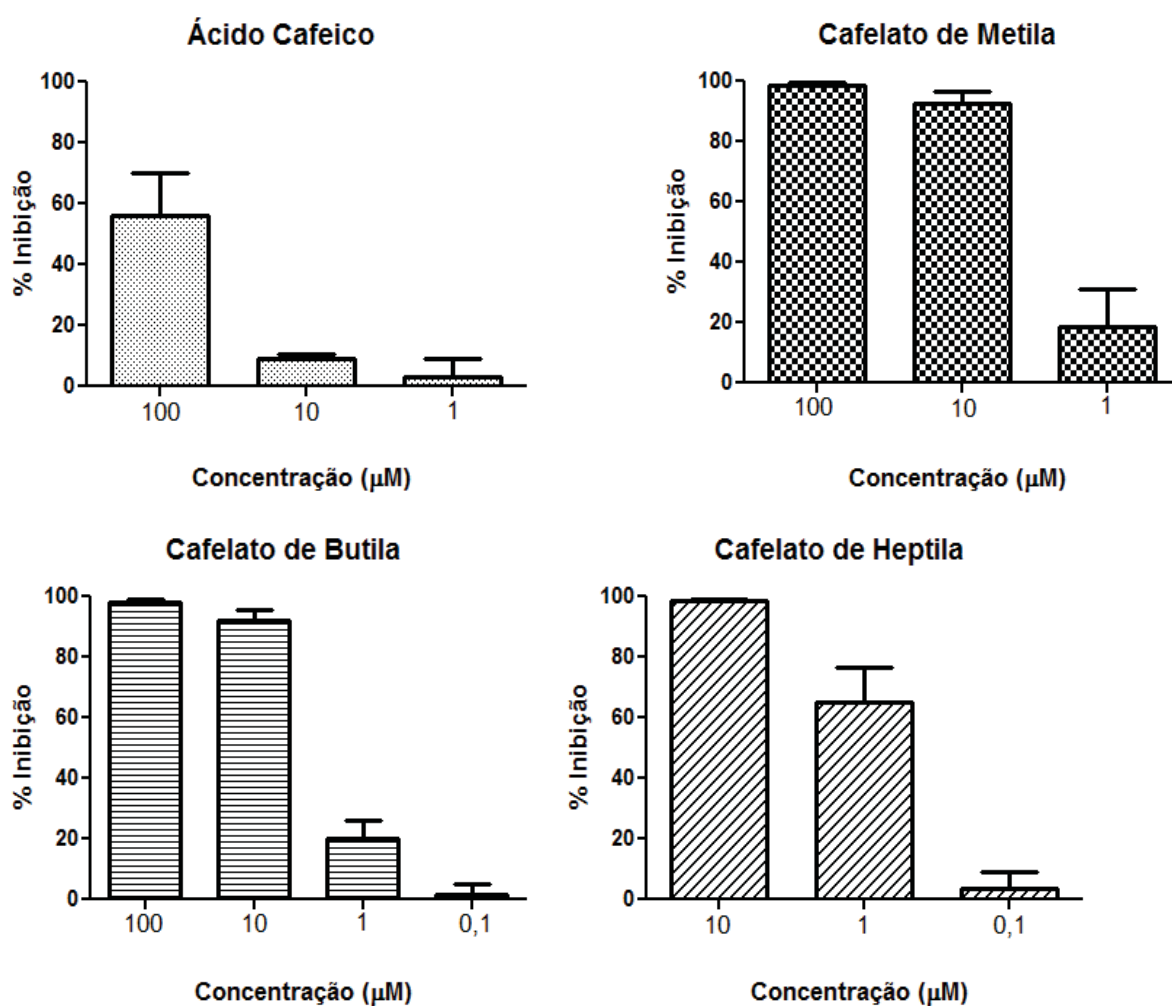


Figura 8: Efeito do ácido cafeico e seus ésteres no “burst” oxidativo de neutrófilos estimulados pelo *H.pylori*.

Quando observamos a Tabela 2, podemos visualizar melhor os resultados de cada substância.

Tabela 2: Porcentagem da inibição da QLDLum em neutrófilos estimulados pelo *H. pylori*

	Concentração (μM)			
	100μM	10μM	1μM	0,1μM
Ácido Cafeico	56,0 ± 14,1	9,0 ± 1,7	3,3 ± 5,7	----
Cafelato de Metila	98,3 ± 1,1	92,6 ± 4,1	18,6 ± 12,4	----
Cafelato de Butila	98,3 ± 1,1	93,0 ± 3,6	18,0 ± 5,0	2,3 ± 4,0
Cafelato de Heptila	----	98,6 ± 0,5	65,0 ± 11,7	4,6 ± 6,4

Valor apresentado como média ± desvio padrão.

A Figura 9 apresenta a comparação dos resultados de todas as substâncias nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. Como observado o ácido cafeico vs cafelato de metila, cafelato de butila e cafelato de heptila apresentaram diferenças estatisticamente significativa em 10 μ M; enquanto que na concentração de 1 μ M somente cafelato de heptila apresentou diferença estatisticamente significativa ao ácido cafeico. Na concentração de 1 μ M somente o cafelato de heptila apresentou diferença significativa em relação ao cafelato de metila e cafelato de butila.

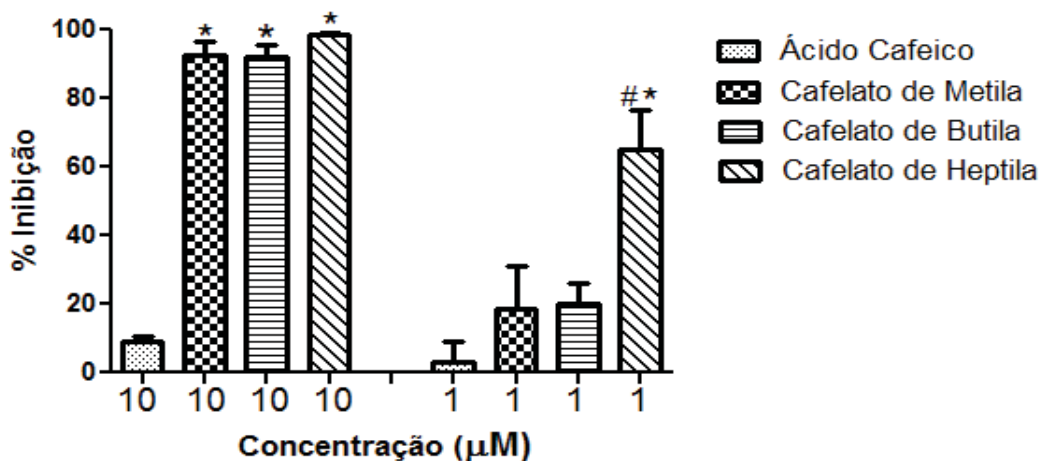


Figura 9: Análise estatística da comparação da eficiência de supressão da QDLum de neutrófilos estimulados pelo *H.pylori*, pelo ácido cafeico e seus ésteres nas concentrações de 10 μ M e 1 μ M. *: Ésteres vs. ácido cafeico. #: Ésteres vs. Ésteres. Diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

5.3 Ensaio de QDLum com neutrófilos estimulados por zymozan. Efeito supressor do ácido cafeico e seus ésteres

O efeito do ácido cafeico e seus ésteres sobre o “burst” oxidativo induzido zymozan é apresentado na Figura 10. Em todas as concentrações testadas o ácido cafeico demonstrou menor eficácia comparada aos seus ésteres. Na concentração de 1 μ M tivemos: cafelato de heptila > cafelato de butila > cafelato de metila > ácido cafeico. Dentre os ésteres, o cafelato de heptila demonstrou melhor eficácia, especialmente, nas concentrações de 1 μ M e 0,1 μ M,

comparada com a mesma concentração do cafelato de butila.

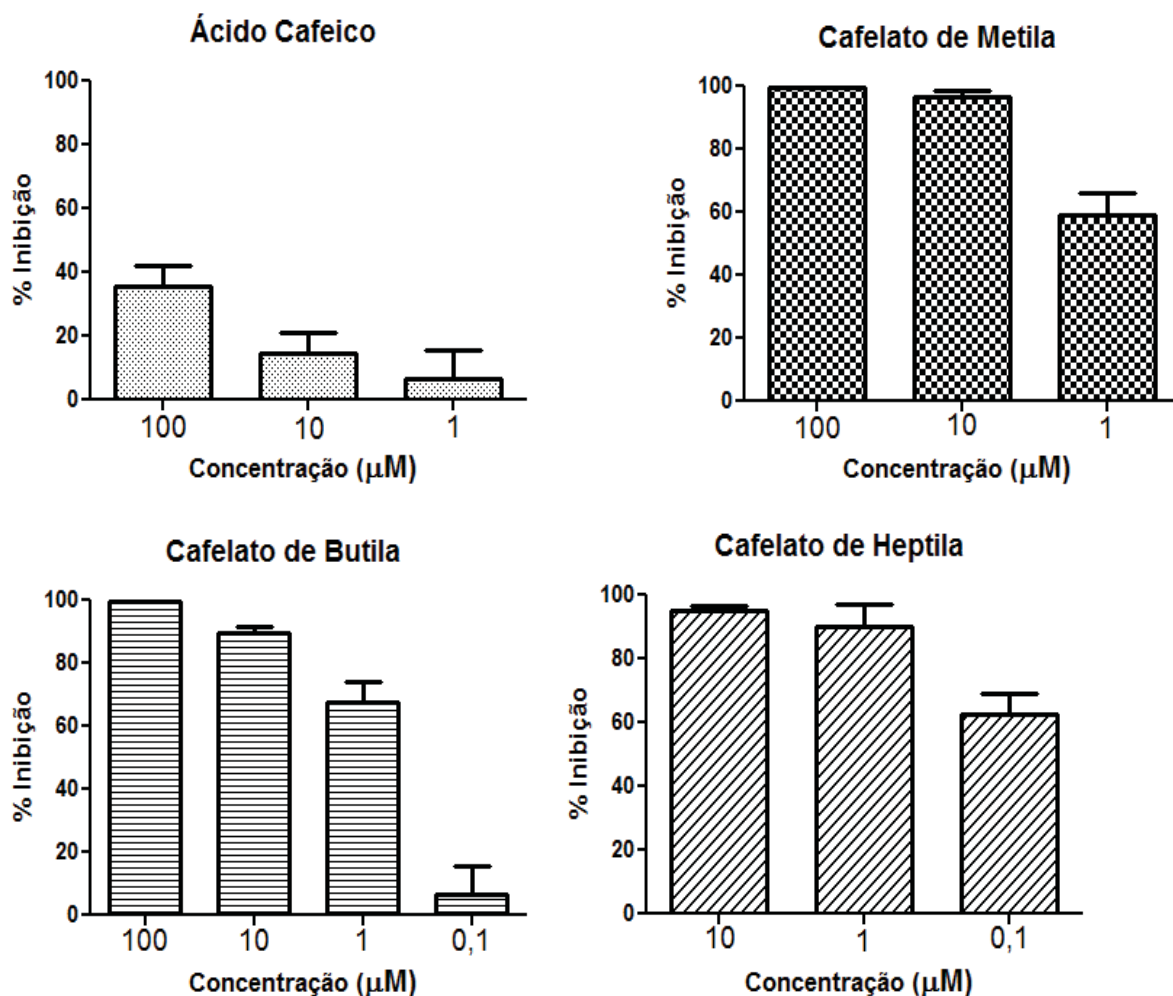


Figura 10: Efeito do ácido cafeico e seus ésteres no “burst” oxidativo de neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado.

Na Tabela 3, podemos visualizar melhor os resultados obtidos com cada substância.

Tabela 3: Porcentagem da inibição da QLDLum em neutrófilos estimulados com zymozan opsonizado.

	Concentração (μM)			
	100μM	10μM	1μM	0,1μM
Ácido Cafeico	35,5 ± 6,3	14,5 ± 6,3	6,5 ± 9,2	----
Cafelato de Metila	99,6 ± 0,5	96,5 ± 2,1	59,0 ± 7,1	----
Cafelato de Butila	99,5 ± 0,7	89,5 ± 2,1	67,5 ± 6,3	6,5 ± 9,2
Cafelato de Heptila	----	95,0 ± 1,4	90,0 ± 7,1	62,5 ± 6,3

Valor apresentado como média ± desvio padrão.

A figura 11 apresenta a comparação dos resultados de todas as substâncias nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M. Como observado o ácido cafeico vs cafelato de metila, cafelato de butila e cafelato de heptila apresentaram diferenças estatísticas significativas em 10 μ M e 1 μ M. Na concentração de 1 μ M somente o cafelato de heptila apresentou diferença estatística significativa em relação ao cafelato de metila e cafelato de butila.

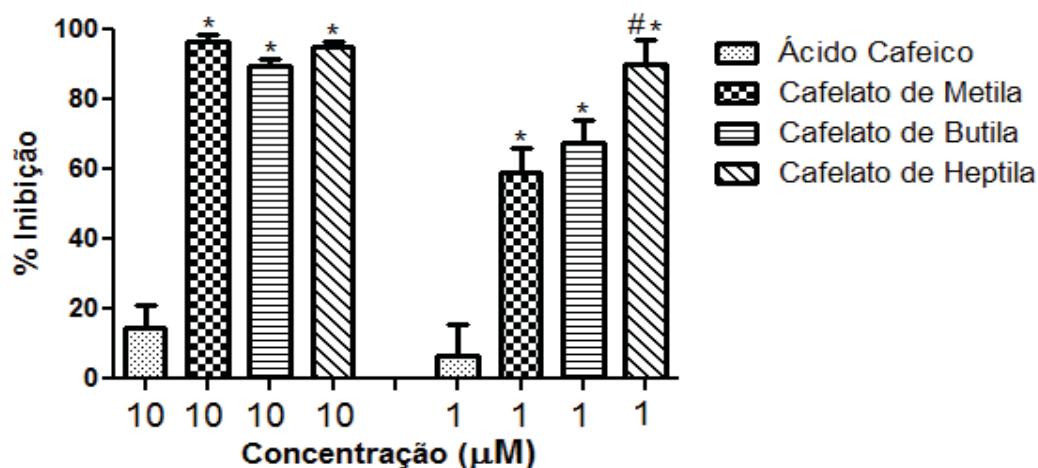


Figura 11: Análise estatística da comparação da eficiência de supressão da QLDLum de neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado, pelo ácido cafeico e seus ésteres nas concentrações de 10 μ M e 1 μ M. *: Ésteres vs ácido cafeico. #: Ésteres vs. Ésteres. Diferença estatística significativa com $p < 0.05$.

5.4 Ensaio de QLDLum com neutrófilos induzidos por zymozan. Efeito supressor do ácido cafeico e seus ésteres

O efeito do ácido cafeico e seus ésteres sobre o “burst” oxidativo induzido por zymozan é apresentado da Figura 12. Em todas as concentrações testadas o ácido cafeico demonstrou menor eficácia comparada aos seus ésteres. Na concentração de 1 μ M tivemos: cafelato de heptila > cafelato de butila = cafelato de metila > ácido cafeico.

Dentre os ésteres, o cafelato de heptila demonstrou melhor eficácia, especialmente, quando observamos a concentração de 1 μ M e 0,1 μ M, comparada com a mesma concentração do cafelato de butila.

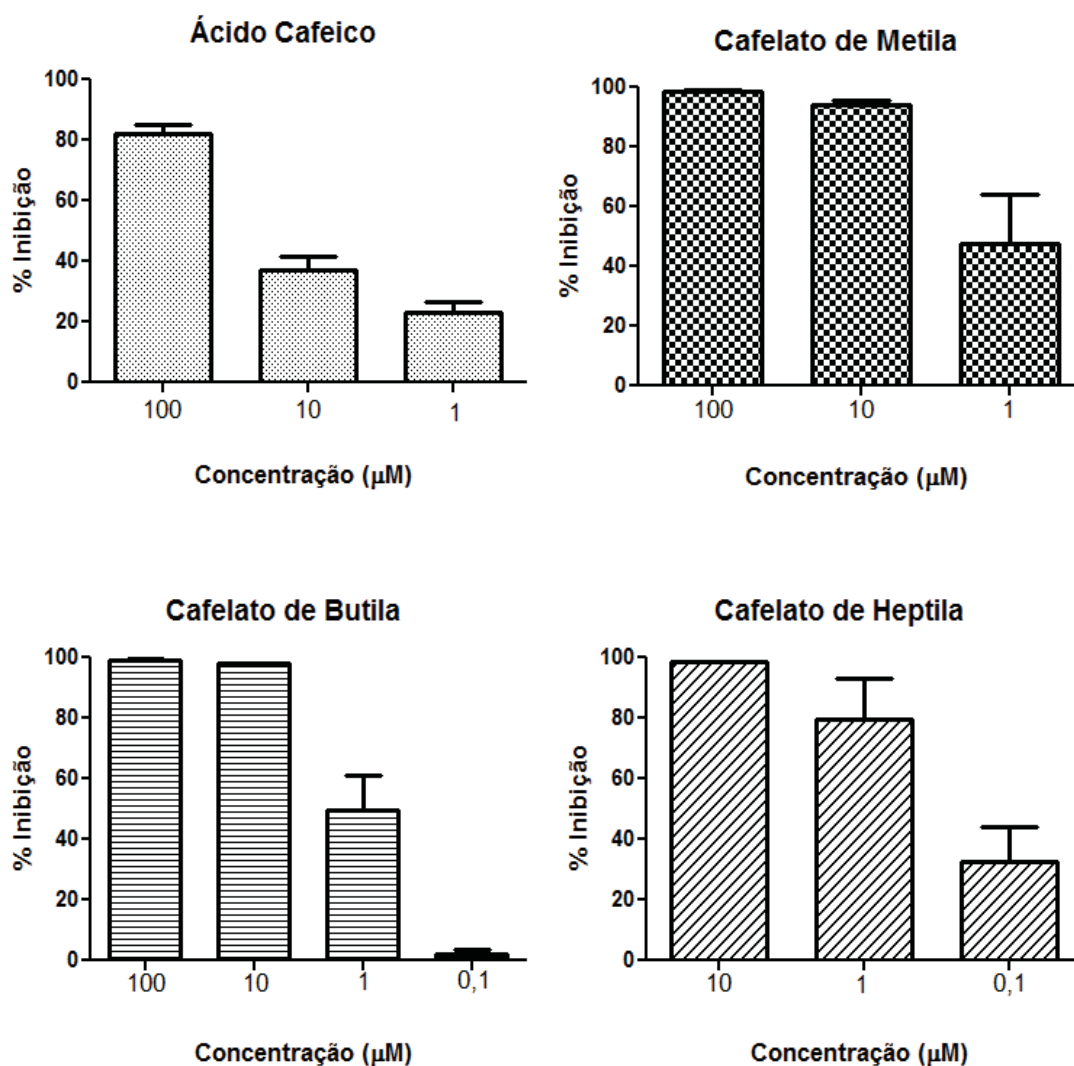


Figura 12: Efeito ácido cafeico e seus ésteres na inibição da produção de radical ânion superóxido por neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado.

Quando observamos a Tabela 4, podemos visualizar melhor os resultados com cada substância.

Tabela 4: Porcentagem da inibição da QLDLuc induzida por zymozan.

	Concentração (μM)			
	100μM	10μM	1μM	0,1μM
Ácido Cafeico	81,8 ± 3,4	37,1 ± 4,2	22,9 ± 3,4	----
Cafelato de Metila	98,8 ± 0,3	93,8 ± 1,9	47,6 ± 16,6	----
Cafelato de Butila	99,1 ± 0,2	97,8 ± 0,3	49,5 ± 11,6	2,1 ± 1,4
Cafelato de Heptila	----	98,3 ± 0,4	79,6 ± 13,6	32,6 ± 11,3

Valor apresentado como média ± desvio padrão.

A figura 13 apresenta a comparação dos resultados de todas as substâncias nas concentrações de 1μM e 10μM. Como observado a apocinina vs ácido cafeico, cafelato de metila, cafelato de butila e cafelato de heptila apresentaram diferenças estatísticas significativas em 10μM; enquanto que na concentração de 1μM somente cafelato de heptila apresentou diferença estatisticamente significativa da apocinina. Em relação a comparação do ácido cafeico vs ésteres na concentração de 10μM todos os ésteres apresentaram diferença estatisticamente significativa. Em 1μM somente o cafelato de heptila apresentou diferença significativa em relação ao ácido cafeico.

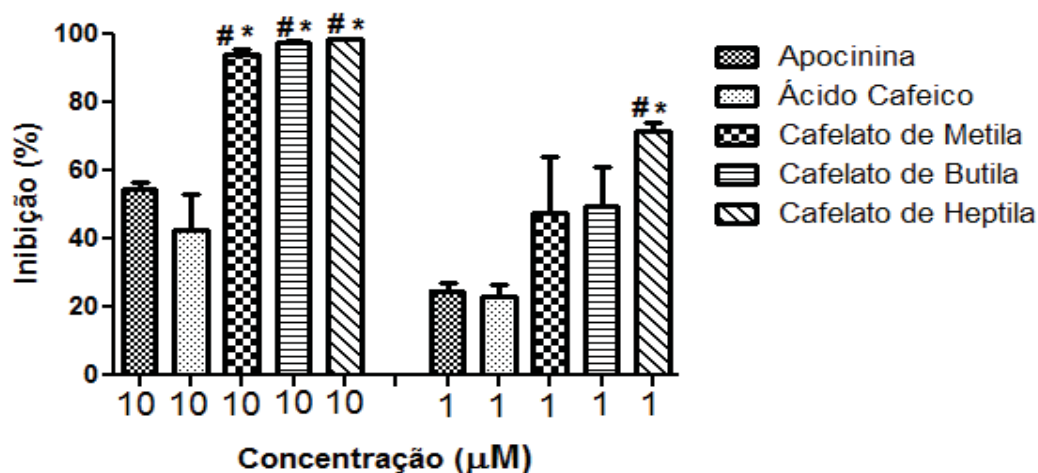


Figura 13: Análise estatística da comparação da eficiência de supressão da QLDLuc de neutrófilos estimulados por zymozan opsonizado, pelo ácido cafeico e seus ésteres nas concentrações de 10μM e 1 μM. *: Apocinina vs. Ácido cafeico e seus ésteres. #:Ác.Cafeico vs ésteres. Diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

5.5 Ensaio de inibição da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos estimulados.

O efeito do ácido cafeico e seus ésteres na geração do HOCl induzida por PMA é apresentado da Figura 14. Em todas as concentrações testadas o ácido cafeico demonstrou menor eficácia comparada aos seus ésteres. Na concentração de 1 μ M tivemos: cafelato de heptila > cafelato de butila > cafelato de metila = ácido cafeico. Dentre os ésteres, o cafelato de heptila demonstrou melhor eficácia, especialmente, quando observamos a concentração de 10 μ M e 1 μ M.

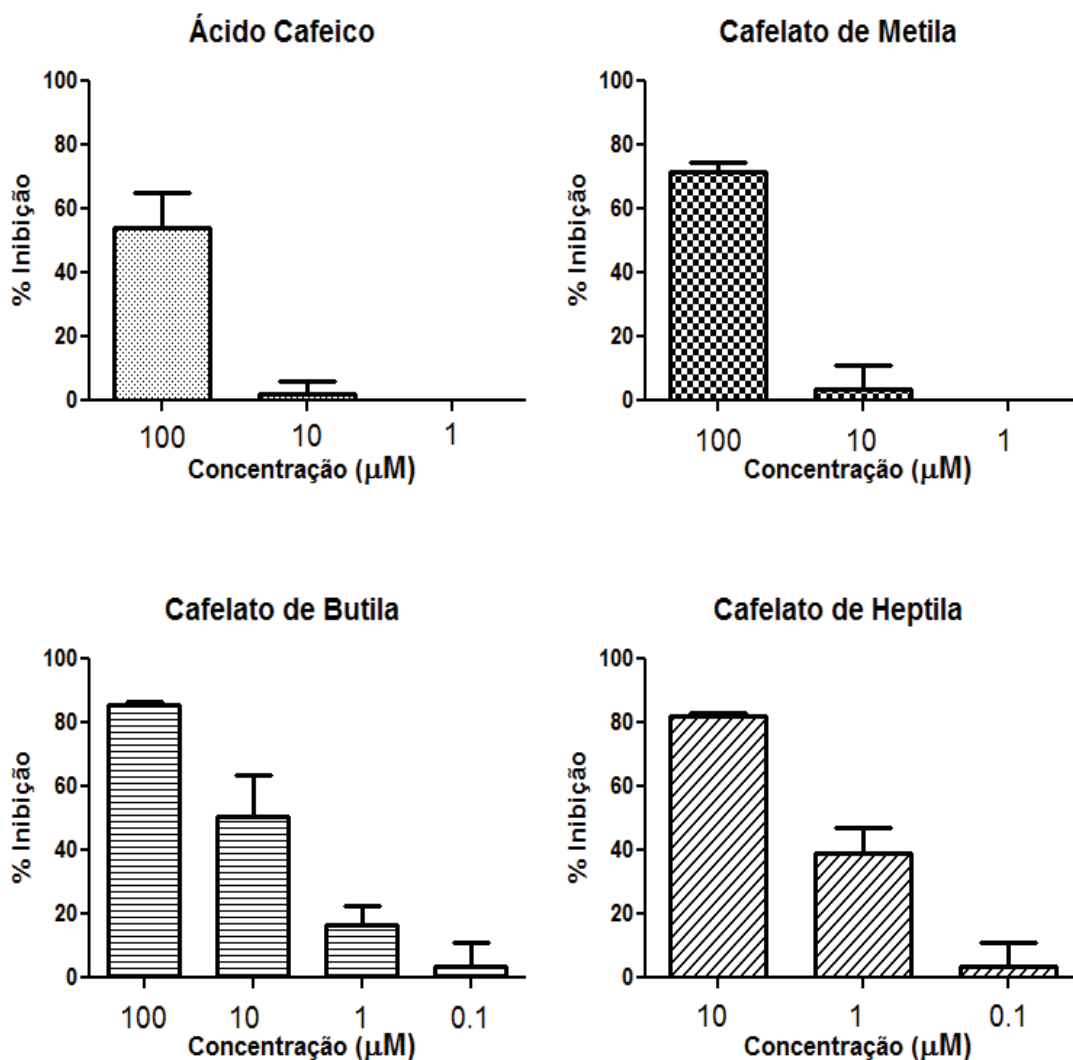


Figura 14: Efeito ácido cafeico e seus ésteres na inibição da produção ácido hipocloroso por neutrófilos ativados por PMA.

Quando observamos a Tabela 5, podemos visualizar melhor os dados de cada substância.

Tabela 5: Porcentagem da inibição da produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados por PMA.

	Concentração (μM)			
	100μM	10μM	1μM	0,1μM
Ácido cafeico	54,3 ± 10,9	2,6 ± 4,6	0 ± 0	----
Cafelato de metila	71,3 ± 3,0	3,7 ± 7,5	0 ± 0	----
Cafelato de butila	85,5 ± 1,3	50,6 ± 12,8	16,3 ± 6,3	3,7 ± 7,5
Cafelato de heptila	----	82,0 ± 1,0	39,0 ± 7,9	3,7 ± 7,5

Valor apresentado como média ± desvio padrão.

5.6 Teste do NBT em neutrófilos. Efeito protetor do ácido cafeico e seus ésteres.

A tabela 6 apresenta a porcentagem de células positivas que apresentaram grânulos escuros de formazana no seu citoplasma.

Tabela 6: Porcentagem de células com precipitado de formazana na presença de ácido cafeico e seus ésteres no teste de redução do NBT.

	10μM
Positivo	98%
Negativo	0%
Ácido Cafeico	23%
Cafelato de Metila	21,6%
Cafelato de Butila	4%
Cafelato de Heptila	2%

As figuras 15 a 21 apresentam os resultados do teste de redução do NBT e fotomicrografias controle. Neste ensaio a atividade oxidativa é mensurada pela presença de

precipitados negros de formazana, no citoplasma do neutrófilo, proveniente da redução do NBT pelo radical ânion superóxido.

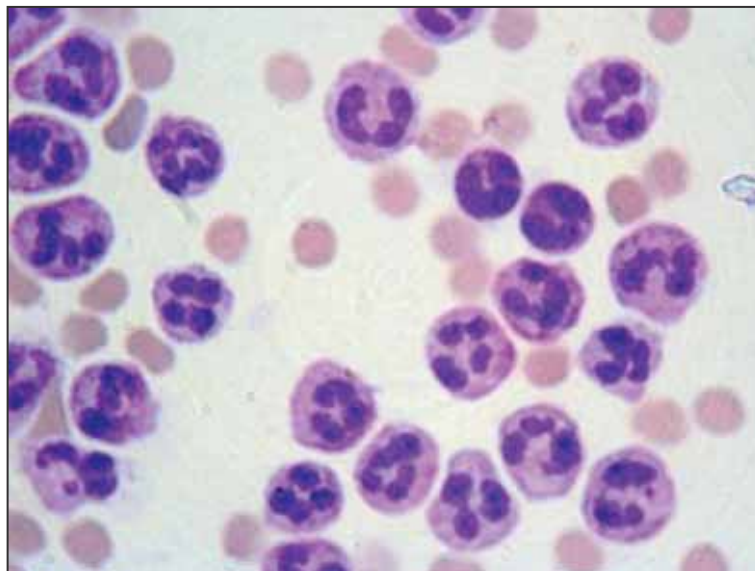


Figura 15: Fotomicrografia de neutrófilos isolados. Neutrófilos separados por Histopaque sem estímulo.

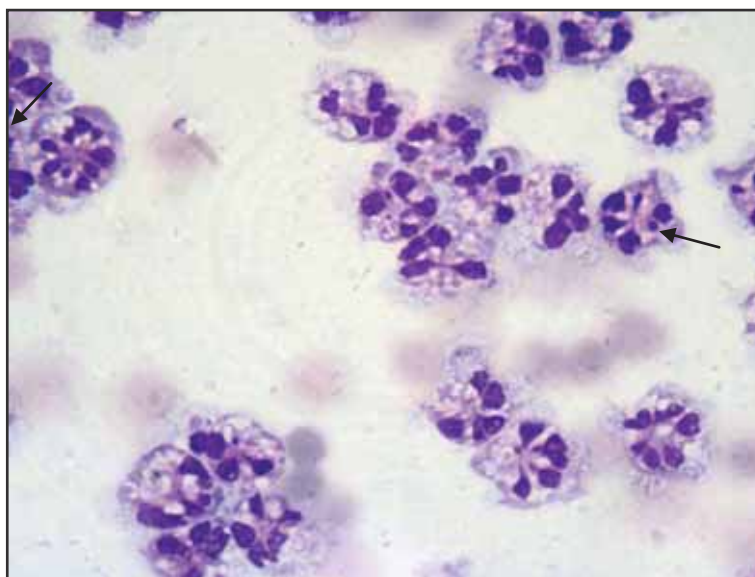


Figura 16: Fotomicrografia de neutrófilos isolados. Neutrófilos estimulados por PMA. Notar a vacuolização dos citoplasmas e a degeneração nuclear (picnose).

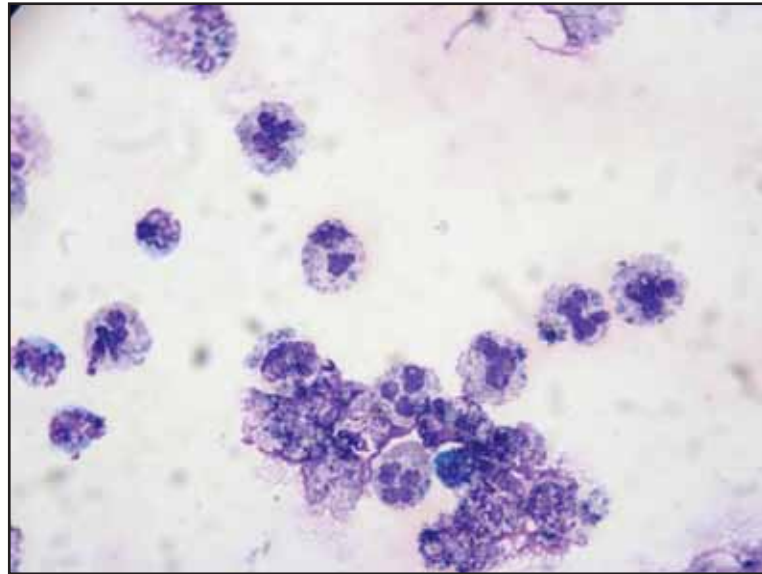


Figura 17: Fotomicrografia de neutrófilos isolados. Neutrófilos estimulados por PMA com presença de NBT. Podemos visualizar depósitos de precipitados negros de formazana no citoplasma.

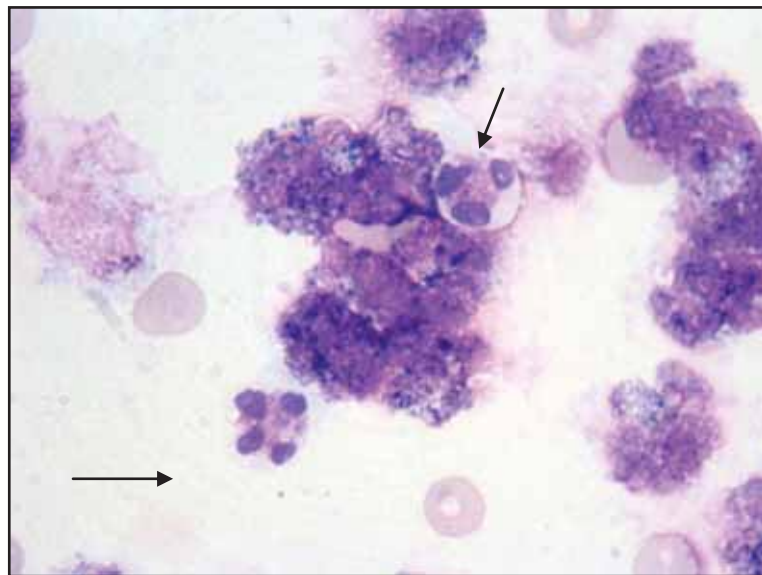


Figura 18: Fotomicrografia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do ácido cafeico na concentração de $10\mu\text{M}$. Poucas células protegidas.

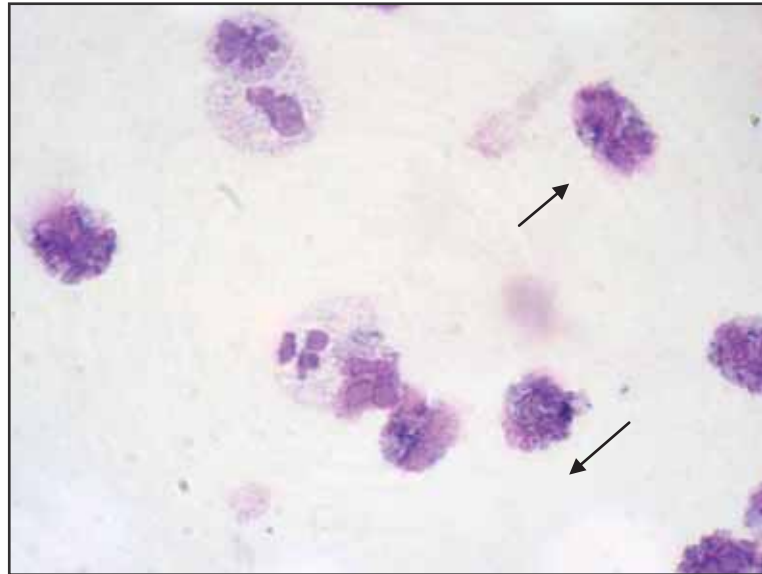


Figura 19: Fotomicrografia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do cafelato de metila a $10\mu\text{M}$. Podemos visualizar depósitos de precipitados negros de formazana no citoplasma.

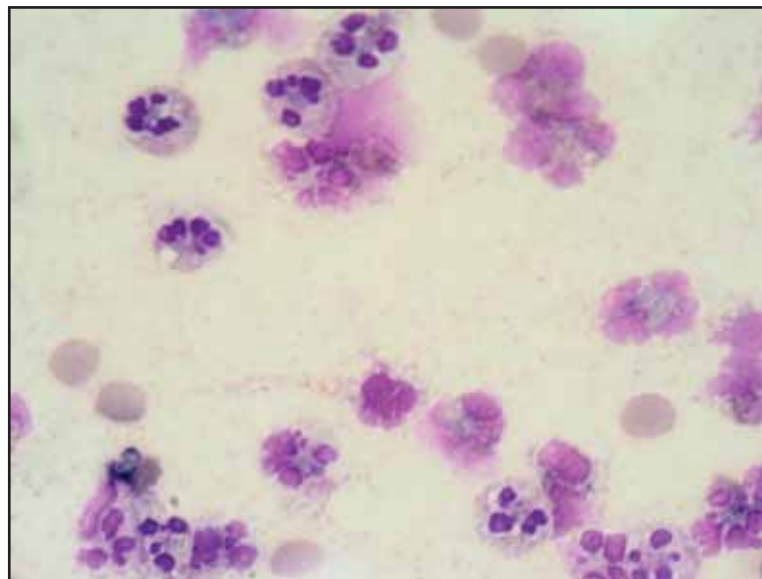


Figura 20: Fotomicrografia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do cafelato de butila na concentração de $10\mu\text{M}$. Neutrófilos sem depósitos de formazana no citoplasma.

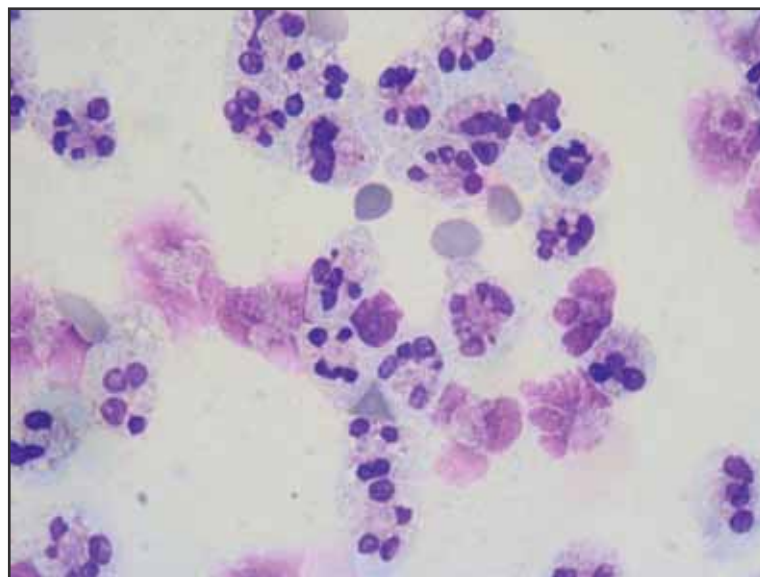


Figura 21: Fotomicrografia de neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados estimulados por PMA com presença de NBT, sob ação do cafelato de heptila a $10\mu\text{M}$. Observamos maior número de células protegidas. Nenhum precipitado de formazana observado.

5.7 Avaliação da morfologia dos neutrófilos sob efeito da estimulação por PMA.

Proteção exercida pelos ésteres do ácido cafeico

Queríamos observar o que ocorreria com os neutrófilos em presença das substâncias químicas e um estímulo celular potente, o PMA, sem nenhum outro interferente. As Figuras 22 a 27 apresentam os resultados do teste da avaliação da morfologia dos neutrófilos frente à ação do ácido cafeico e seus ésteres comparado as fotomicrografias controle. Neste ensaio, vemos a ação destrutiva decorrente da estimulação com PMA sobre os neutrófilos e a potente proteção dos ésteres do ácido cafeico frente a este estímulo.

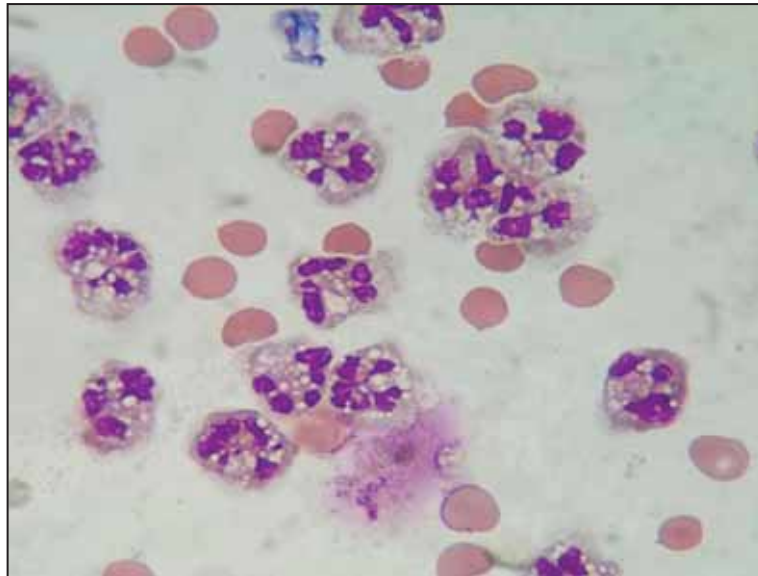


Figura 22: Fotomicrografia controle positivo. Células + PMA. Note a presença de grande vacuolização no citoplasma e núcleo picnótico.

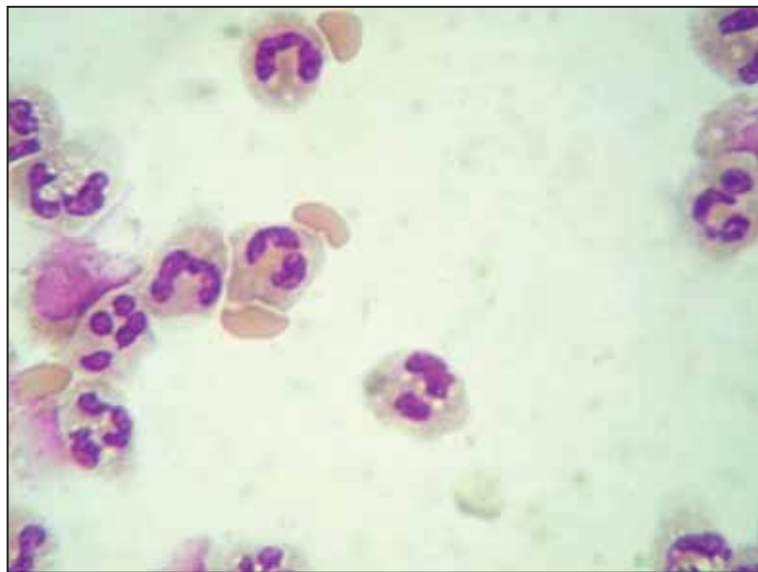


Figura 23: Fotomicrografia controle negativo. Células sem a presença do estímulo PMA.

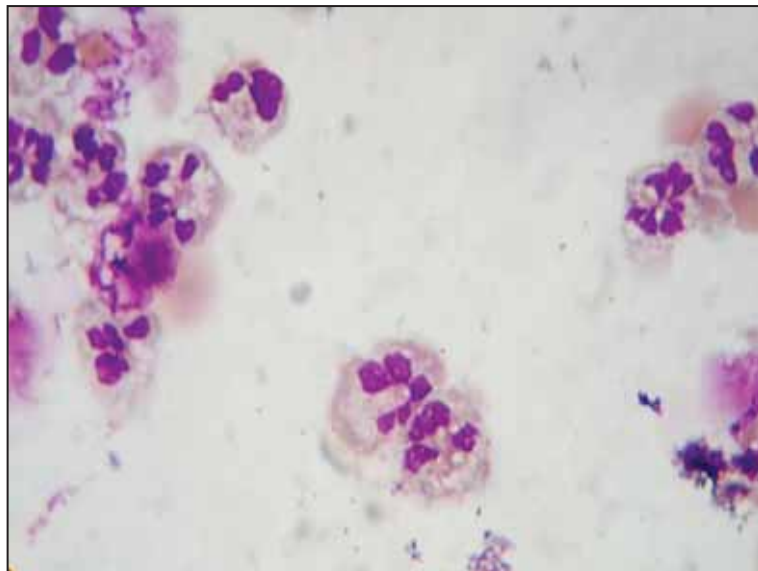


Figura 24: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do ácido cafeico a 10 uM. Ainda nota-se a presença de vacúolos e degeneração nuclear.

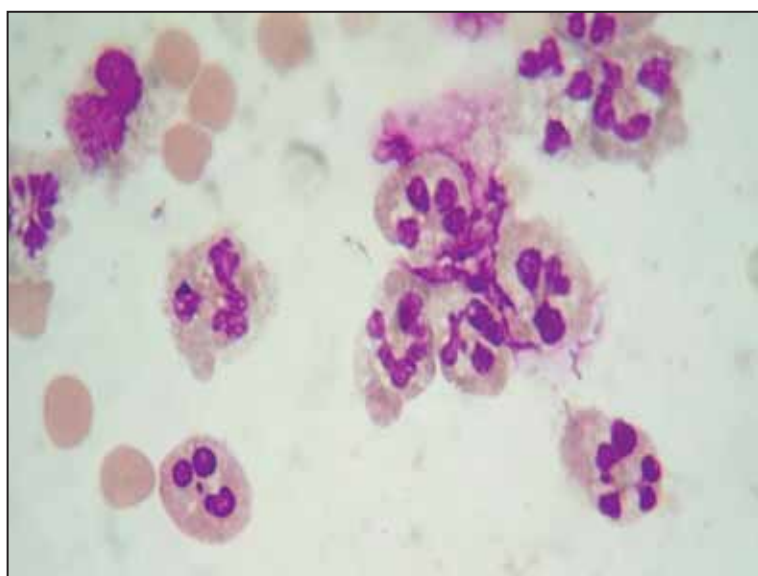


Figura 25: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do cafelato de metila a 10 μ M. Conforme adicionamos um grupamento metila, a proteção de membrana e consequentemente a vacuolização do citoplasma começa a diminuir.

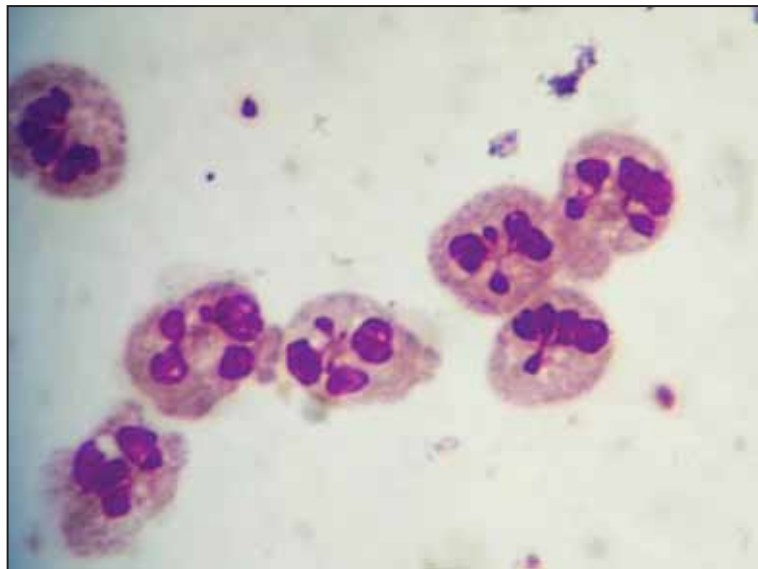


Figura 26: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do cafelato de butila a 10 μ M. Quase não há vacúolos de citoplasma, os neutrófilos apresentam-se em sua forma normal, semelhante ao controle negativo da figura 24.

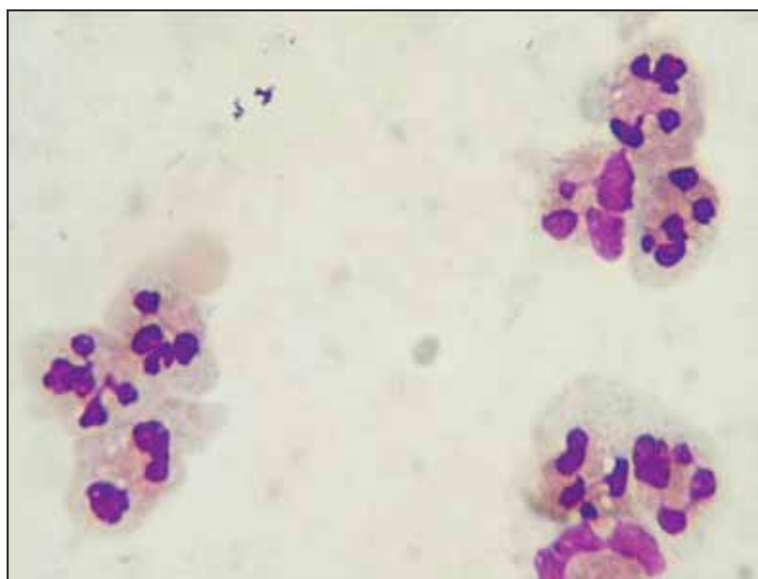


Figura 27: Fotomicrografia de neutrófilos ativados por PMA sob ação do cafelato de heptila a 10 μ M. Nota-se na figura a ausência de vacúolos de citoplasma, núcleos não degenerados e membrana celular intacta. Os neutrófilos apresentam-se em sua forma normal, semelhante ao controle negativo da figura 24.

5.8 Ensaios de inibição de crescimento de *Helicobacter pylori*.

O efeito do ácido cafeico e seus ésteres sobre o crescimento de *H. pylori* é apresentado na Figura 28 e Tabela 7. Os melhores resultados foram demonstrados pelo cafelato de butila e heptila, os quais apresentaram CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$. Na maior concentração testada o ácido cafeico e o cafelato de metila inibiram o crescimento bacteriano em 48,1% e 86,4%, respectivamente.

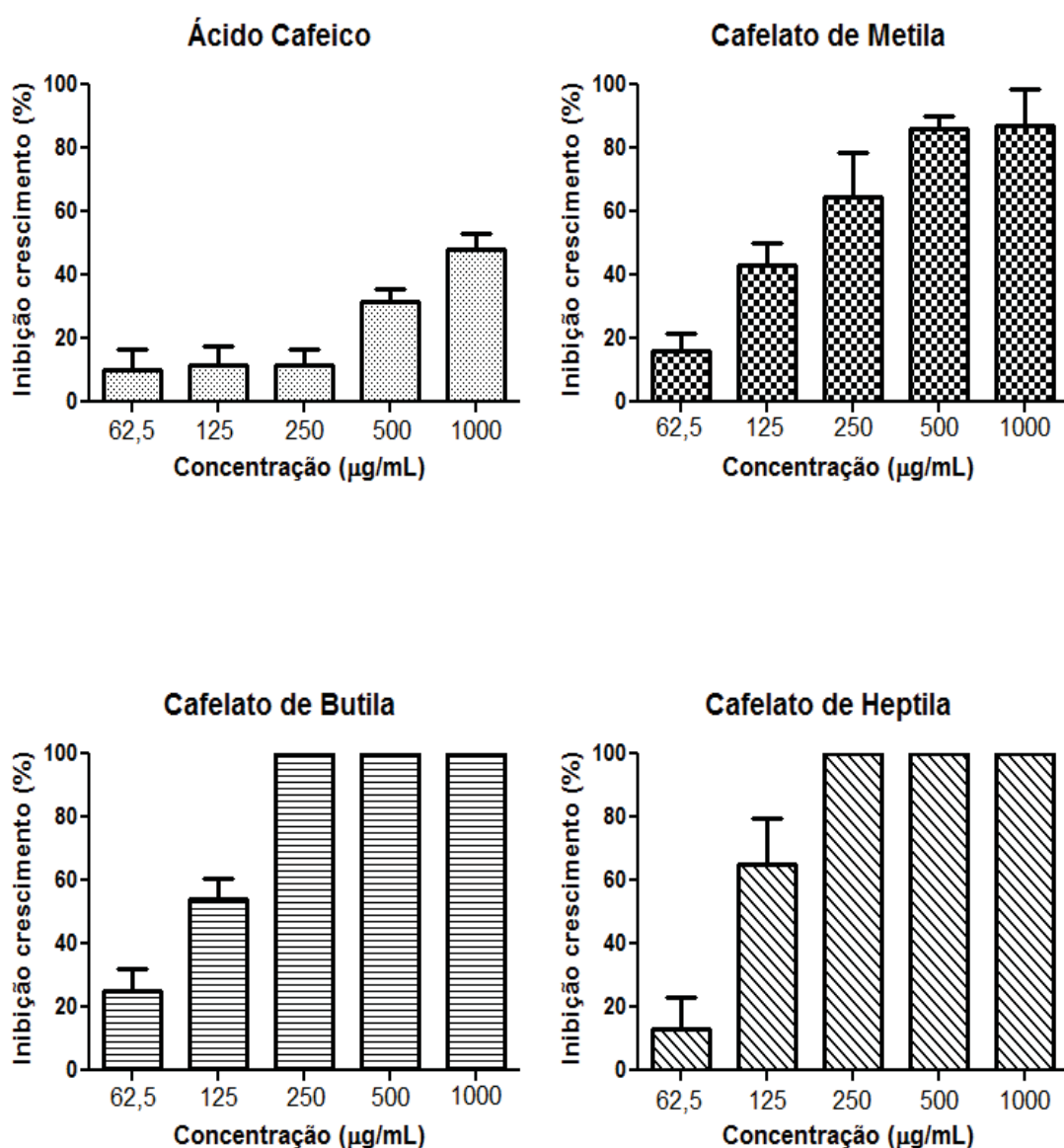


Figura 28: Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* pelo ácido cafeico e seus ésteres.

Tabela 7: Inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* pelo ácido cafeico e seus ésteres.

Inibição do crescimento(%)*						
	Concentração (µg/mL)					CIM (µg/mL)
	62,5	125	250	500	1000	
Ácido Cafeico	9,9 ± 6,9	11,4 ±5,9	11,4 ± 5,2	31,8 ± 3,6	48,1 ±5,2	>1000
Cafelato de Metila	16,0 ± 5,9	43,2 ± 7,0	64,8±13,7	86,0 ±4,0	86,4± 11,7	>1000
Cafelato de Butila	25,0 ±7,0	54,1 ± 6,7	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	250
Cafelato de heptila	13,0 ± 9,9	65,0±14,2	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	250

*Valor apresentado como média ± desvio padrão.

6. Discussão

Compostos fenólicos são constituintes encontrados em abundância em plantas medicinais como também em vegetais e frutas vermelhas comestíveis. Suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias são largamente reconhecidas. A grande vantagem destes compostos, como fármacos em potencial, é sua baixa toxicidade em relação a outras drogas (PASTENE et al, 2009).

Os compostos fenólicos, em particular seus ácidos são hidrofílicos e a sua capacidade antioxidante “*ex vivo*” aparentemente pode ser potencializada pela obtenção de seus derivados ésteres, com o consequente aumento de sua lipofilicidade e maior interação dessas moléculas com membrana lipídicas de células eucarióticas (XIMENES et al, 2010). O ácido cafeico apresenta uma grande variedade de propriedades biológicas, entre elas a antioxidante (WEI et al, 2010; MAURYA, DEVASA-GAYAM, 2010). Partindo da hipótese de que uma maior lipofilicidade poderia potencializar sua atividade antioxidante, os ésteres metílico, butílico e heptílico do ácido cafeico foram sintetizados (cafelatos de metila, butila e heptila) e sua capacidade de inibir o “burst” oxidativo de neutrófilos “*ex vivo*” foi avaliada.

Espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na patogenia de diversas doenças, inclusive câncer, doenças neurodegenerativas, desordens reumáticas e doenças inflamatórias agudas e crônicas, imunes e não imunes (PARIJ et al, 1998). Uma grande fonte endógena de ERO's provem da estimulação de fagócitos profissionais como os neutrófilos e monócitos/macrófagos, através do “burst” oxidativo, cuja finalidade é a destruição de microrganismos fagocitados. Todavia, esse procedimento nem sempre é eficiente na eliminação do agente etiológico, como é o caso da própria infecção pelo *H. pylori*. Nesse caso as ERO's, juntamente com enzimas dos grânulos dos fagócitos causam danos fisiológicos a mucosa no local da infecção, contribuindo para a formação da gastrite e úlcera péptica. Há bastante tempo é sabido que a quimiluminescência dependente de luminol (QLDLum) é

largamente dependente das reações do sistema MPO - H₂O₂ - Cl⁻ (± 95% das emissões) (DAHLGREEN, STENDHAL, 1983).

No entanto, outras ERO's também estão envolvidas na quimiluminescência gerada e como consenso, o luminol, por ser uma molécula pequena, a qual consegue penetrar na célula, reflete a produção total de ERO's nos eventos intra e extracelular (PARIJ et al, 1998).

Na Figura 8, podemos observar o poderoso efeito antioxidante no sistema neutrófilo + *H. pylori* + luminol (QLDLum) dos ésteres do ácido cafeico quando comparado com o mesmo efeito em relação ao ácido. Na Tabela 2, a visualização dessa diferença fica clara e a comparação estatística da Figura 9 não deixa dúvidas sobre o maior poder antioxidante dos ésteres no sistema celular “*ex vivo*” avaliado. Curiosamente na concentração 10 µM, os cafelatos de metila, butila e heptila apresentaram praticamente o mesmo efeito antioxidante e apenas na concentração muito pequena de 1 µM, o cafelato de heptila demonstrou ser superior aos seus congêneres atingindo a significativa marca de mais de 60% de inibição do sistema. Esses dados são muito expressivos, pois são moléculas com um poder antioxidante, nesse modelo, muito superiores aos supressores clássicos de ERO's, apresentados pela literatura, como apocinina, melatonina e fluortriptamina.

Outra constatação interessante é que esses compostos quando testados em modelos de avaliação antioxidante livre de células “*in vitro*” não mostram atividade significativamente diferentes entre si (dados não mostrados).

A explicação mais convincente para esses achados diz respeito à lipofilicidade dos ésteres (maior quanto maior for a cadeia carbônica) em relação à membrana lipídica dos neutrófilos. Essa evidência já foi demonstrada cabalmente para outro ácido fenólico e seus ésteres, o ácido gálico (XIMENES et al, 2010). A interação dos ésteres com a membrana lipídica aproxima mais os grupamentos hidroxilas das fontes geradoras de ERO's dos neutrófilos, favorecendo

sua propriedade “scavenger.” Outra possibilidade que deve ser levada em consideração é que a membrana dos fagócitos tem que estar absolutamente íntegra, para que a NADPH oxidase inicie o processo de formação de ERO's (STYRT, B.; KIEMPHER, 1986).

Evidentemente a interação das cadeias carbônicas com essa membrana deve propiciar algum grau de desestabilização da mesma, todavia não o suficiente a ponto de causar qualquer ruptura, pois como demonstramos o teste de exclusão do azul de Trypan não evidenciou lesão mais contundente das membranas dos neutrófilos quando expostos às concentrações dos cafelatos que avaliamos neste trabalho, evidenciando, ao contrário, a integridade das membranas celulares.

Dada a alta eficiência da ação antioxidante, podemos inferir um possível efeito sinérgico da ação “scavenger” somada à provável desestabilização de membrana pelas cadeias carbônicas dos ésteres nos neutrófilos, interferindo no mecanismo adequado da NADPH oxidase de membrana dos fagócitos.

Por outro lado, a quimiluminescência dependente de lucigenina (QLDLuc) é atribuída à produção extracelular de $O_2^{\cdot-}$. Sendo uma molécula de alto peso molecular, ela não consegue penetrar nos neutrófilos, dessa forma, a QLDLuc reflete apenas os eventos extracelulares (DAHLGREN, ANINSSON, MAGNUSSON, 1985).

Os resultados dos experimentos da inibição de QLDLuc foram similares aos da inibição de QLDLum no que diz respeito, principalmente, aos ésteres. Os cafelatos de metila, butila e heptila suprimem em, aproximadamente 100% a QLDLuc na concentração de 10 μ M e o heptila cerca de 80% na concentração de 1 μ M, uma inibição considerável em tão baixa concentração desse cafelato. Em geral, como na QLDLum, a inibição da QLDLuc é dose dependente.

Confirmando os dados obtidos com a QLDLum, principalmente, o teste de produção de ácido hipocloroso por neutrófilos ativados (Figura 14) evidenciam um efeito dose dependente dos ésteres sobre a inibição da produção desse potente oxidante e a relação entre os cafelatos também se manteve na seguinte ordem de potência: cafelato de heptila > cafelato de butila > cafelato de metila. O ácido cafeico apenas apresentou um pequeno grau de inibição na concentração mais alta (100 μ M).

Objetivando uma visualização mais completa morfológica dessa poderosa atividade antioxidante dos cafelatos de metila, butila e heptila, utilizamos o clássico teste de redução do NBT com contagem microscópica dos neutrófilos que reduzem o corante a grânulos de formazana no citoplasma.

A Tabela 6 mostra, mais uma vez, potente efeito protetor, principalmente, dos cafelatos de butila e heptila na ação redutora do radical ânion superóxido sobre o corante NBT e formação de grânulos de formazana no citoplasma. As fotomicrografias evidenciam de modo inequívoco a diminuição progressiva dos precipitados de formazana conforme o aumento da cadeia carbônica dos cafelatos (Figuras 15 a 21).

Devido à altíssima eficiência dos cafelatos avaliados, surgiu uma questão que necessitava ser esclarecida. Não estaria ocorrendo algum tipo de interação entre as sondas utilizadas e os ésteres em estudo? Não poderíamos estar na presença de um artefato metodológico?

Surgiu então a ideia de verificarmos o efeito do PMA, um poderoso estimulador do “burst” oxidativo, na morfologia dos neutrófilos, sem a presença de nenhum tipo de sonda. Esperávamos que o “burst” uma vez fortemente ativado promovesse alterações morfológicas nesses neutrófilos pela liberação maciça de ERO’s e consequentemente, dano das estruturas morfológicas dessas células. Esses eventos se confirmaram: no controle positivo (neutrófilos

+ PMA) os fagócitos se apresentavam extremamente vacuolizados e com visível degeneração nuclear (picnose). Uma pesquisa na literatura nos mostrou um único trabalho, onde a vacuolização de fagócitos (monócitos e neutrófilos) é observada experimentalmente após a exposição destas células ao estímulo solúvel PMA (HOLDAR et al, 1978). Todavia, nada é mencionado a respeito da degeneração nuclear. As fotomicrografias das Figuras 22 até a 27 mostram esses resultados e fica evidente, novamente, a proteção progressiva dos cafelatos nas alterações morfológicas promovidas pelo “burst” oxidativo.

O *H. pylori* pode colonizar o epitélio gástrico de seres humanos, levando à indução de uma intensa resposta inflamatória, com a infiltração maciça de neutrófilos polimorfonucleares. Essa resposta, no entanto, não consegue eliminar o agente etiológico e a grande produção de ERO's no local é um dos fatores preponderantes na gênese da úlcera péptica (BONACORSI et al, 2012).

Com o constante aumento de cepas resistentes aos antibióticos convencionais, a procura de novas moléculas ativas contra o *H. pylori* tem sido incrementada nos últimos anos. Compostos fenólicos têm se mostrado agentes promissores nesse contexto. (PASTENE et al, 2009). Dessa forma, também testamos os nossos compostos quanto aos seus possíveis efeito inibitórios sobre o crescimento do *H. pylori*.

Os métodos de diluição em caldo são aceitáveis para avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado microrganismo. A atividade anti- *H. pylori* do ácido cafeico e seus ésteres semi-sintéticos foi quantificada pela técnica de microdiluição em caldo. A CMI pode 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 e demonstrada como sendo aplicável na triagem do potencial antimicrobiano de substâncias e preparações vegetais

(TABAK et al., 1999; CHATTERJEE et al., 2004; VELURI et al., 2004; CASTILLO-JUAREZ et al., 2007).

Apesar de todos os anos de estudo em relação ao *H. pylori* e tratamentos para a erradicação da bactéria, um esquema totalmente eficaz ainda não foi identificado. Atualmente, o mais efetivo tratamento consiste na combinação de um inibidor de bomba de prótons com antibióticos, mas cerca de 10% a 20% dos pacientes não respondem ao tratamento. Tratamentos sem antibióticos, incluindo o emprego de fitoterápicos, antioxidantes, probióticos tem sido amplamente estudados como potencial tratamento para infecção por *H. pylori* (KAMIJI, OLIVEIRA appud BONACORSI et al, 2012).

O ácido cafeico é um dos ácidos fenólicos mais amplamente distribuídas em tecidos vegetais. A atividade antimicrobiana deste ácido e seus derivados tem atraído muita atenção e tem sido estudada por muitos grupos de pesquisa nos últimos anos (FU et al, 2010).

Alguns ésteres de ácido cafeico como o feniletil éster e outros conjugados como dicafeoilquínicos, entre outros, mostram ter uma maior atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (ALVES et al, 2003). Esterificação de ácidos polifenólicos apresentam vários efeitos sobre a oxidação em meio lípidico, dependendo tanto do ácido e da natureza do éster (WEI et al, 2007).

A CIM para os ésteres de ácido cafeico, cafelato de butila e cafelato de heptila foi definida em 250 µg/mL, enquanto que o éster cafelato de metila e o próprio ácido cafeico, não apresentaram inibição superior a 90% na maior concentração testada (Figura 28), mostrado de forma clara na Tabela 7.

Alguns trabalhos demonstram a atividade antibacteriana do composto fenólico éster fenético de ácido cafeico (CAPE), possivelmente explicada devido à sua interação com

componentes lipofílicos e alteração na permeabilidade seletiva de membranas celulares microbianas. Estudos sugerem que o dano em membrana é um dos mecanismos principais através do qual os polifenóis podem causar um efeito sobre o *H. pylori*, podem também agir como neutralizantes de proteínas do *H. pylori* e da enzima urease, um fator de virulência importante para a sua sobrevivência (PASTENE et al, 2009).

A MPO possui uma potente atividade pró-inflamatória e isso pode contribuir para um dano tecidual intenso (WANG et al, 2008). O *H. pylori* é uma bactéria produtora de catalase, enzima esta que hidrolisa o H_2O_2 em água, impedindo assim a formação de HOCl, um potente oxidante. A bactéria usaria esta atividade catalase como forma de evitar o processo bactericida causado pelos polimorfonucleares (RAMARAO, GRAY-OWEN, MEYER, 2000).

O mecanismo de ação das substâncias na eliminação do *H. pylori* ainda não está bem esclarecido. Todas as ações descritas acima, como inibição da enzima urease ou da atividade catalase da bactéria, descrevem um importante mecanismo em “*in vivo*” para a ação antibiótica das substâncias, no entanto, em um ensaio “*in vitro*” podemos avaliar e partir do pressuposto de que a lipofilicidade é um mecanismo importante na redução do estresse oxidativo causado pelos leucócitos, pode nos levar a crer que este poderia ser um caminho importante para ação anti-*H.pylori*, ao destruir ou desestabilizar a membrana do *H. pylori*, que por ser uma bactéria gram-negativa apresenta em sua constituição uma membrana externa de natureza lipídica (PASTENE et al, 2009).

7. Conclusão

Os resultados levam a crer que a estrutura molecular do ácido cafeico e os seus ésteres é altamente importante para a capacidade antioxidante e anti - *H. pylori* das substâncias.

- O ácido cafeico e seus ésteres possuem considerável poder na inibição do “burst” oxidativo dos neutrófilos demonstrados através dos ensaios de QLDLum e QLDLuc.
- O cafelato de heptila, em todos os ensaios apresentados no presente estudo, mostrou ser a melhor substância quanto ao potencial antioxidante e antimicrobiano.
- A inibição do “burst” oxidativo está ligada, possivelmente, ao tamanho da cadeia de carbono dos ésteres analisados: C.heptila > C. butila > C. metila > Ác. Cafeico.
- Cafelato de heptila e cafelato de butila demonstraram maior potencial inibitório sobre o crescimento de *H. pylori*.
- Uma boa perspectiva para um novo fármaco contra a gastrite crônica e úlcera péptica em seres humanos, seria uma droga capaz de eliminar o *H. pylori* e reduzir o estresse oxidativo induzido por esta bactéria não agindo somente como um bom sequestrador de radicais livres, mas especialmente como um inibidor de NADPH-oxidase.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5^a ed, Rio de Janeiro: Elsevier editora, 2005.

ALVES, C.M.O.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; CARVALHO, I.F.; VALIM, Y.M.L. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**. v.60, p.601-8, 2003.

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**. v.69, p. 4-9, 2004.

AUGUSTO, A.C.; MIGUEL, F.; MENDONÇA, S.; PEDRAZZOLI, J.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.

BABIOR, B.M. NADPH Oxidase: an Update. **Blood**. v. 93, p. 1464-76, 1999.

BARBIOR, B.M. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol**, v.16, p.42–47, 2004.

BALDRIDGE, C.W.; GERARD, R.W. The extra respiration of phagocytosis. **Am J Physiol**, v. 103, p. 235-9, 1993.

BONACORSI, C.; RADDI, M.S.G.; FONSECA, L.M.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic constituents on *Helicobacter pylori* – induced neutrophils oxidative burst. **Int J Mol Sci**, V.13, p.133-141, 2012.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the Human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**. v.89, n.10, p.3503-3521, 1997.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand J Clin Lab Invest**, Suppl 9: 77, 1968.

BRENNAN, M.L.; PENN, M.S.; LENTE, F.V.; NAMBI, V.; SHISHEHBOR, M.H.; AVILES, R.J.; GOORMASTIC, M.; PEPOY, M.L.; McERLEAN, E.S.; TOPOL, E.J.; NISSEN, S.E.; HAZEN, S.L. Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain. **N Engl J Med**, v. 349, p.1595-1604, 2003.

CASTILLO-JUAREZ, 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.

CIARLINI, P.C.; ANTONIO, D.B.A.; BARBIERE, F.; BONELLO, F.L.; FEITOSA, F.L.F. Efeito da vacina contra brucelose bovina sobre a capacidade neutrofílica de redução do NBT. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP. vol. 21, nº 2, p.251-256, 2005.

CHAO, P.C.; HSU, C.C.; YIN, M.C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutr Metab**, v.6, n.33, p.1-8, 2009.

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.

CHENG J.T.; LIU, I.M.; TZENG, T.F.; CHEN, W.C.; HAYAKAWA, S.; YAMAMOTO, T. Release of beta-endorphin by caffeic acid to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Horm Metab Res**, vol. 35. p. 251-258, 2003.

CHIANG, H.C.; LO, Y.J.; LU, F.J. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. **Jour Enzym Inhib** v.8, p. 61-71, 1994.

DAHLGREN, C.; STENDHAL, O. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun** v.39, p. 736-741, 1983.

DAHLGREN, C.; ANIANSSON, H.; MAGNUSSON, K.E. Pattern of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induced luminol and lucigenin-dependent chemiluminescence in human neutrophils. **Infect Immun** v.47, p.326-328, 1985.

DING, S.Z.; MINOHARA, Y.; FAN, X.J.; WANG, J.; REYES, V.E.; PATEL, J.; KRAMER, B.D.; BOLDOGH, I.; ERSNT, 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, p.720-741, 1997.

FONSECA, A.M. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Rev Bras Farmacogn** v.19, p.193-198, 2009.

FREIRE, B.F.A.; QUELUZ, T.H.A.T. Neutrófilo: morfologia, cinética e funções. **J Pneumol**, v.21, p.180-184, 1995.

FU, J.; CHENG, K.; ZHANG, Z.; FANG, R.; ZHU, H. Synthesis, structure and structure–activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. **Eur J Med Chem**, v. 45, p. 2638-2643, 2010.

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

GASBARRINI, A.; PASINI, P.; NARDO, B.; DE NOTARIIS, S.; SIMONCINI, M.; CAVALLARI, A.; BERNARDI, M.; RODA, A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. **Free Radic Biol Med**, v.15, p.211-16, 1998.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood**. v.92, p.3007-17, 1998.

HOLDAR, J.; REPINE, J.E.; BEALL, G.D.; RASP Jr, F.L.; WHITE, J.B. The effect of phorbol myristate acetate on the metabolism and ultrastructure of human alveolar macrophages. **Am J Pathol**, V.91, p.469-82, 1978.

HYNES, M.J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **J Inorg Biochem**, v. 98, p. 1457-1464, 2004.

ISAACSON, P.G., SPENCER, J. Gastric lymphoma and *Helicobacter pylori*. **Important Adv Oncol**, p.111, 1996.

JAGANATHAN, S.K.; MANDAL, M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. **J Biomed and Biotechnol**, p.1-13, 2009.

JOHNSON, D.K. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**. v.9, p.191-203, 2002.

JUNG, U.J.; LEE, M.K.; PARK, Y.B.; JEON, S.M.; CHOI, M.S. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.318, p.476-483, 2006.

KAMKAEN, N.; MATSUKI, Y.; ICHINO, C.; KYOHARA, H.; YAMADA, H. The isolation of the Anti-*Helicobacter pylori* compounds in seeds of *Arctium lappa* Linn. **Thai Pharm Health Sci J**, v.1, n.2, p. 12-18, 2006.

KANEGAE, M.P.P.; FONSECA, L.M.; BRUNETTI, I.L.; SILVA, S.O.; XIMENES, V.F. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: Contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochem Pharmacol**, v.74, p. 457-464, 2007.

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

KITAGAWA, R.R.; RADDI, M.S.G.; KHALIL, N.M.; VILEGAS, W.; 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.

KUENZIG, W.; CHAU, J.; NORKUS, E.; HOLOWASCHENKO, H.; NEWMARK, H.; MERGENS, W.; CONNEY, A.H. Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation **Carcinogenesis** v.5, 1984.

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.

MAURYA, D.K.; DEVASA-GAYAM, T.P. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic acid and caffeic acids. **Food Chem Toxicol** V.48, n.12, p.3369-73, 2010.

METCHNIKOFF, E. Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. **Ann Inst Pasteur Microbiol**, v.1, p. 321, 1887.

NAKAMURA, S.; YAO, T.; AOYAGI, K.; IIDA, M.; FUJISHIMA, M.; TSUNEYOSHI, M. *Helicobacter pylori* and primary gastric lymphoma: histopathologia and immunohistochemical analysis of 237 patients. **Cancer**. v.79, p.3-15, 1997.

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.

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

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. **Quim Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

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.

PANDEY, R.; MISRA, V.; MISRA, S.P.; DWIVEDI, M.; KUMAR, A.; TIWARI, K.B. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.11, p. 583-588, 2010.

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

PASTENE, E., SPEISKY, H., TRONCOSO, M., ALARCON, J., FIGUEROA, G. In Vitro Inhibitory Effect of Apple Peel Extract on the Growth of *Helicobacter pylori* and Respiratory Burst Induced on Human Neutrophils. **J Agric Food Chem**, v.57, p.7743–7749, 2009.

PLUYM, E.D. *Helicobacter pylori*. Disponível em:
<http://biowebwax.edu/bio203/s2008/pluym_evan/life%20history.htm> Acesso em: 21 de agosto de 2010.

PRASAD, N.R.; KARTHIKEYAN, A.; KARTHIKEYAN, S.; REDDY, B.V. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. **Mol Cell Biochem**, 2010.

RAMARAO, N.; GRAY-OWEN, S.D.; MEYER, T.F. *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. **Mol Microbiol**, v.38, n.1, p.103-113, 2000.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.S.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and antimicrobial Activity. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.5, n.3, p. 317-324, 2008.

SÁNCHEZ-ZAUCO, N.A.; GIONO-CEREZO, S.; MALDONADO-BERNAL, C. Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. **Salud publica Mex.** v.52, p.447-454, 2010.

SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F.; COSTA, M.F.D. Quimioluminescência e bioluminescência. **Quim Nova**, v.16, n.3, p.200-209, 1993.

SCHEPETKIN, I.A. Lucigenin as a Substrate of Microsomal NAD(P)H- Oxidoreductases. **Biochemistry (Moscow)**, v.64, n.1, p.25-32, 1999.

SPASOJEVIC, I.; LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. Lucigenin: Redox potencial in aqueous media and redox cycling O₂ production. **Archiv Biochem Biophys**, v.373, p. 447-50, 2000.

STYRT, B.; KIEMPHER, M.S. Inhibition of neutrophil oxidative metabolism by lysosomotropic weak bases. **Blood**. v.67, p.334-342, 1986.

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

THE GENKYOTEX. Disponível em: <<http://www.genkyotex.com/index.php?rubID=5>> Acesso em: 19 dezembro 2010.

THE *HELICOBACTER* FOUNDATION. Disponível em: <<http://www.helico.com/?q=Epidemiology>>. Acesso em: 17 novembro 2011.

THE OSTTEOBELL. Disponível em: <<http://www.ostteobell.com/Teste-Helicobacter-Pylori.php>> Acesso em: 19 de dezembro 2010.

TOYODA, T.; TSUKAMOTO, T.; TAKASU, S.; SHI, L.; HIRANO, N.; BAN, H.; KUMAGAI, T.; TATEMATSU, M. Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor- κ B inhibitor, on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. **Int J Cancer**, v.125, p.1786-1795, 2009.

XIMENES, V.F.; LOPES, M.G.; PETRONIO, M.S.; REGASINI, L.O., SILVA DHS, FONSECA, L.M. Inhibitory Effect of Gallic Acid and Its Esters on 2,20-Azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-Induced Hemolysis and Depletion of Intracellular Glutathione in Erythrocytes. **J Agric Food Chem**, v.58, p.5355–5362, 2010.

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.

WEI, H.A.; LIAN, T.W.; TU, Y.C.; HONG, J.T.; KOU, M.C.; WU, M.J. Inhibition of Low-Density Lipoprotein Oxidation and Oxidative Burst in polymorphonuclear Neutrophils by Caffeic Acid and Hispidin Derivatives Isolated from Sword Brake Fern (*Pteris ensiformis* Burm.) **J Agric Food Chem**, v.55, p.10579–10584, 2007.

Anexo 1

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 08/2011

Interessado: LUANA CHIQUETTO PARACATU

Orientador: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

Projeto: Ácido cafeico e seus ésteres: inibição do burst oxidativo de neutrófilos e seu efeito anti-*Helicobacter pylori*

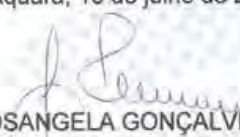
Parecer nº 22/2011 – Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto "Ácido cafeico e seus ésteres: inibição do burst oxidativo de neutrófilos e seu efeito anti-*Helicobacter pylori*", encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o referido projeto estruturado dentro de padrões éticos manifestando-se FAVORAVELMENTE à sua execução.

O relatório final do projeto de pesquisa e os Termos de Consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em janeiro de 2012.

Araraquara, 15 de julho de 2011.



Profa. Dra. ROSANGELA GONÇALVES PECCININI
Vice-Coordenadora do CEP