



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNESP**



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA-BIOQUÍMICA**

***HELICOBACTER PYLORI*: PREPARAÇÃO DE LAPDES-F-IUNI E ENSAIO DE INIBIÇÃO DE UREASE  
(IC<sub>50</sub>) DE DERIVADOS DE TIOURÉIA E GUANIDÍNICOS**

**AUTOR: THALES DE OLIVEIRA SOUZA MONTAGNANI**

**ARARAQUARA**

**2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNESP**

**LAPDES F – LABORATÓRIO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS**

***HELICOBACTER PYLORI*: PREPARAÇÃO DE LAPDES F-IUNI E ENSAIO DE INIBIÇÃO DE UREASE**

**(IC<sub>50</sub>) DE DERIVADOS DE TIOURÉIA E GUANIDÍNICOS**

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

**AUTOR: THALES DE OLIVEIRA SOUZA MONTAGNANI**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. CHUNG MAN CHIN**

**CO-ORIENTADOR: DR. JEAN LEANDRO DOS SANTOS**

**SET/2011**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, acima de tudo, pela imensa oportunidade que me proporcionou ao permitir que cursasse uma faculdade de excelência, em todos os âmbitos, e por, ao longo dos cinco anos de faculdade, me orientar e guiar para que hoje, ao final do curso, conseguisse alcançar meus objetivos e estar em uma posição privilegiada.

Aos meus pais, exemplo de pessoas batalhadoras e vencedoras, pelo apoio incondicional que me deram durante toda a minha vida, mas principalmente no período de faculdade, pelos conselhos, incentivos, orientação, estímulo, carinho e educação, não permitindo que nada me faltasse para minha formação.

À minha orientadora, Dra. Chung Man Chin, com quem muito aprendi desde que entrei na faculdade, pela amizade, pelos conselhos e pelas palavras amigas, por me orientar para a vida e não somente para minha iniciação científica ou para meu trabalho de conclusão de curso. Agradeço ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, cuja trajetória de sucesso pude acompanhar, exemplo de determinação, dedicação e perseverança, por toda orientação e paciência de todos esses anos e pela confiança em mim depositada. Agradeço também ao Mateus Scontri, cujo suporte e amizade foram imprescindíveis ao sucesso de meus trabalhos no laboratório.

Aos pós-graduandos, Renato Farina Menegon, Lorena Blau, Ednir Vizioli e Priscila Longhin Bosquesi por toda a ajuda e orientação nos momentos em que precisei. Aos alunos de iniciação científica e grandes amigos Diego Chiba, João Pedro Fachin e Marcelo Davanço, pela forte amizade, colaboração e por todo o apoio dado.

A todos, enfim, que contribuíram para a conclusão deste trabalho. Obrigado!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE ESQUEMAS .....	7
LISTA DE TABELAS E QUADROS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	8
1. Introdução .....	9
1.1. Aspectos Epidemiológicos .....	9
1.2. Patogenicidade, diagnóstico e tratamento .....	11
ETAPA I .....	16
OBJETIVO .....	16
2. Materiais e Métodos .....	17
2.1. Materiais para síntese do IUNI .....	17
2.2. Métodos .....	17
2.2.1. Preparação de Lapdesf-IUNI (2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4- [(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato) (SILVA, ATA, 2008) .....	17
2.2.2. Síntese do monossuccinato de tiouréia (MST).....	17
2.2.3. Síntese do Tosilato de Metronidazol.....	19
2.2.4. Formação do IUNI.....	19
3. Resultados e Discussão .....	20
3.1. Preparação de Lapdesf-IUNI (2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4- [(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato) (SILVA, ATA, 2008). .....	20
4. Conclusão desta etapa .....	24
ETAPA 2 .....	26
OBJETIVO .....	26
2. Materiais e Métodos .....	27
2.1. Materiais para desenvolvimento dos testes para avaliação biológica <i>in vitro</i> da inibição da urease (Adaptado de “Journal of Enzyme Inhibition, 2001 e Analytical Chemistry, 1967). .....	27
2.1.1. Metodologia para avaliação da atividade inibitória da enzima urease para os compostos T-6, R-17 e R-21. ....	27
2.1.1.1. Curva de Calibração.....	27

2.1.1.2.	Preparo das Soluções para as próximas etapas .....	29
2.1.1.3.	Atividade Enzimática .....	30
2.1.1.4.	Atividade Inibitória .....	30
2.1.1.5.	Método Fenol-Hipoclorito para determinação de amônia .....	31
2.1.2.	Metodologia para determinação do IC <sub>50</sub> .....	31
3.1.	Avaliação da atividade inibitória de urease para os compostos T-6, R-17 e R-21. .	31
3.1.1.	Curva de Calibração .....	32
3.1.2.	Avaliação da Atividade Enzimática da Urease .....	33
3.1.3.	Avaliação da atividade enzimática na presença dos potenciais inibidores T-6, R-17 e R-21.	34
3.2.	Determinação de IC <sub>50</sub> .....	37
4.	Conclusão desta etapa .....	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

## RESUMO

O presente trabalho de conclusão de curso visou à otimização e preparação da síntese de Lapdesf-IUNI e avaliação do potencial de inibição de urease de três compostos previamente sintetizados, direcionados especificamente para o tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*, bactéria mundialmente reconhecida como uma das principais causadoras de infecções no mundo, responsável pelos casos de infecções gástricas, como gastrites crônicas, úlceras (gástricas e duodenais) e carcinomas.

Lapdesf-IUNI é um composto derivado de metronidazol, com atividade potencialmente inibidora de urease, enzima presente neste microrganismo e essencial a sua sobrevivência no ambiente gástrico. O produto foi obtido, porém com baixo rendimento, por isso sua metodologia ainda necessita ser aperfeiçoada, para que, em seguida este composto possa ser testado.

Outros três compostos, um derivado de tiouréia e dois derivados guanidínicos, com potencial atividade inibidora de urease, T-6, R-17 e R-21, sintetizados pela equipe do Prof. Eduardo Perez, foram avaliados com relação a sua atividade inibidora frente à enzima urease e IC50, apresentando bons resultados, que permitem a continuidade dos estudos, comparando inclusive com fármacos utilizados nos protocolos de tratamento padrões para o tratamento das infecções causadas por *H. pylori*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bastonete gram - <i>H. pylori</i> .....	099
Figura 2. Epitélio gástrico colonizado por <i>H. pylori</i> .....	09
Figura 3. Prevalência de infecção por <i>H. pylori</i> no mundo.....	100
Figura 4. Taxa de infecção de <i>H. pylori</i> por grupo etário.....	100
Figura 5. LAPDESF-IUNI.....	16
Figura 6. MST potássico (sal).....	188
Figura 7. Compostos potenciais inibidores de urease.....	25
Figura 8. Curva de Calibração para determinação da atividade da urease.....	332
Figuras 9. Atividade da urease na ausência e na presença dos inibidores.....	354
Figura 10. Porcentagem de inibição da urease para cada composto.....	365
Figura 11. Perfil de inibição de T-6 frente ao controle.....	386
Figura 12. Perfil de inibição de R-21 frente ao controle.....	387
Figura 13. Perfil de inibição de R-17 frente ao controle.....	387

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Reação de síntese do MST .....	17
Esquema 2. Reação de síntese do Tosilato de MDZ .....	19
Esquema 3. Reação de formação do IUNI .....	19

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de infravermelho do composto 2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato - (IUNI).....	23
--	----

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Alterações na metodologia de síntese de Lapdesf-IUNI.....	20
Tabela 2. Espectro de infravermelho do composto 2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato - (Lapdesf-IUNI).....	24
Tabela 3. Dados para elaboração da curva de calibração.....	27
Tabela 4. Valores utilizados para a construção da curva de calibração da urease e suas respectivas absorvâncias .....	32
Tabela 5. Atividade da enzima urease na ausência de inibidores .....	33
Tabela 6. Resultado da avaliação da atividade da urease na presença das três amostras: T-6, R-21 e R-17. ....	34
Tabela 7. Resultados obtidos no teste de IC50 das três amostras .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*H. pylori* = *Helicobacter pylori*

TGI = Trato gastro-intestinal

CMI<sub>90</sub> = Concentração Mínima Inibitória para 90% de determinada amostra

MDZ = Metronidazol

IUNI = composto 2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4-

[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

UV = Ultravioleta

IV = Infravermelho

MST = Monossuccinato de tiouréia

KOH = Hidróxido de Potássio

DMF = Dimetilformamida

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético

NaOH = Hidróxido de sódio

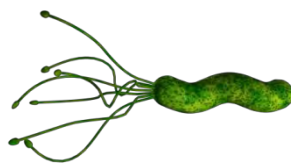
IC<sub>50</sub> = Concentração da substância que fornece inibição de 50% para certa reação.



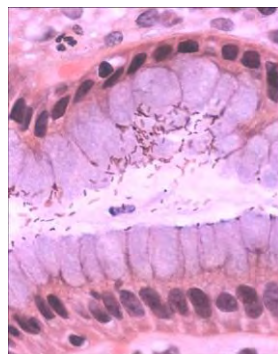
## 1. Introdução

### 1.1. Aspectos Epidemiológicos

A infecção por *Helicobacter pylori* acomete mais da metade da população mundial e é considerado um dos principais agentes causadores de gastrites, úlceras duodenais e gástricas (SENG-KEE CHUAH et al, 2011) Trata-se de uma bactéria micro-aerófila gram negativa, em forma de bastonete, flagelada, que pode colonizar a mucosa gástrica e que vem se destacando como um dos principais agentes causadores associados a tais patologias. (MURRAY, 2007; KUMAR et al, 2000). Foi descoberta em 1982 pelos australianos Barry J. Marshall e J. Robin Warren e até então (1982-83) acreditava-se que não havia bactérias que pudessem habitar o estômago humano, devido ao ambiente altamente ácido e que estresse e o estilo de vida eram então considerados as principais causas de úlceras e gastrites. Pela descoberta de tal bactéria e sua associação com as doenças gástricas, ambos os pesquisadores receberam em 2005 o Prêmio Nobel de Medicina. (Figuras 1 e 2).

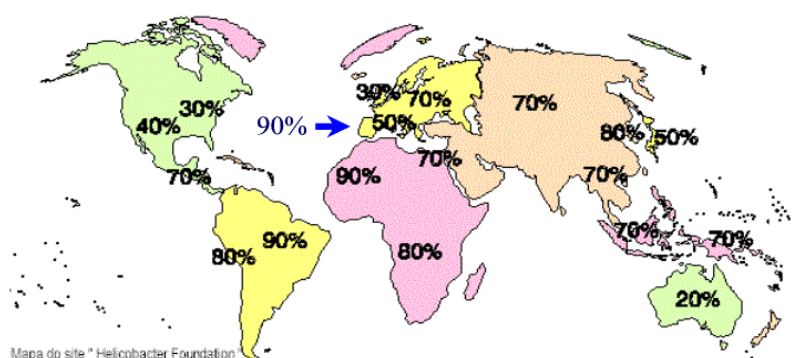


**Figura 1.** Bastonete gram - *H. pylori*.(Fonte: <http://i.rosaceans.com/archives/497>)

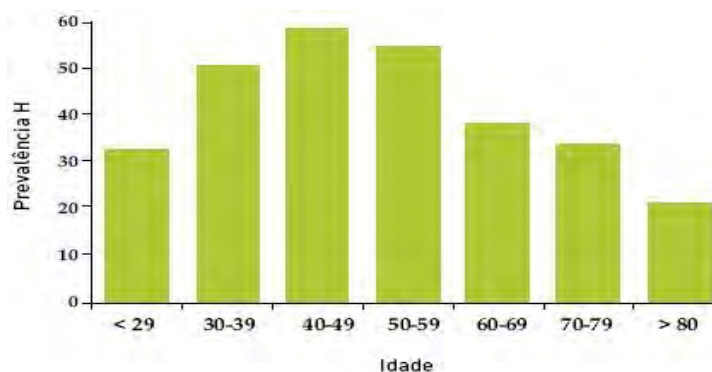


**Figura 2.** Epitélio gástrico colonizado por *H. pylori*. (Fonte: [www.gidisease.com/Hpylori.htm](http://www.gidisease.com/Hpylori.htm))

Ainda que descoberta há menos de 20 anos, *H. pylori* tem sido alvo de diversos estudos, sendo considerada uma das mais incidentes infecções bacterianas do mundo, com altas taxas de prevalência, as quais podem variar em função de fatores como região geográfica, idade, raça e características sócio-econômicas da população (BROWN, 2000). Estima-se que metade da população mundial está infectada por *H. pylori*, alcançando taxa de até 90% da população em países com baixo nível sócio-econômico e precárias condições sanitárias (HOPKINS et al, 1996; FISCHBACH et al, 2005). A prevalência do organismo na população brasileira alcança de 34% entre as crianças na zona urbana da região mas rica do país, a Sudeste, à mais de 82% entre adultos da região Nordeste, a mais pobre do país. (MITCHELL et al, 2003). (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Prevalência de infecção por *H. pylori* no mundo. (Fonte: Helicobacter Foundation, 2006).



**Figura 4.** Taxa de infecção de *H. pylori* por grupo etário (SANTOS, H. 2010)

Através da Figura 3 pode-se inferir o contraste existente entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. A prevalência de *H. pylori* está mais relacionada à condição sócio-econômica do que às diferentes etnias e diminui à medida que melhoram as condições sanitárias (HELICOBACTER FOUNDATION, 2006). Nos países desenvolvidos, a infecção é pouco freqüente na infância, sendo que a incidência aumenta conforme o avanço da idade na proporção de 0,5 a 1,0% por ano e em torno de 50% da população na terceira idade (acima dos 60 anos) apresenta a infecção. Nos países em desenvolvimento, por sua vez, a infecção ocorre desde cedo e com freqüência mais alta, podendo atingir 80% ou mais em adultos (TRABULSI et al, 2000).

## 1.2. Patogenicidade, diagnóstico e tratamento

*H. pylori* reside no interior do muco e na superfície apical das células epiteliais, onde se adere firmemente através de moléculas de adesinas, com muitas propriedades, incluindo hemaglutinação, junção a células epiteliais ou ligação a oligossacarídeos ou proteínas da matriz extracelular (DUBREUIL et al, 2002) . Todos os isolados de *H. pylori*, assim como outras espécies gástricas de *Helicobacter* já identificadas produzem grandes quantidades da enzima urease, que correspondem a cerca de 10-15% de toda a proteína bacteriana. A urease e o influxo de uréia endógena por meio de um canal ativado por diferenças de pH têm mostrado ser essenciais para a colonização da mucosa gástrica e sobrevivência ao ambiente ácido *in vivo* (SACHS et al, 2005).

O mecanismo exato pelo qual *H. pylori* contribui para o desenvolvimento das doenças gastroduodenais ainda não está claro. Estudos mostraram que a infecção por *H. pylori* não está diretamente relacionada com a secreção de ácido, levantando dúvidas sobre a importância da hipergastrinemia para patogenicidades na mucosa gástrica. Acredita-se que o papel principal da urease é a neutralização do microambiente ácido, pela produção de amônia, uma base que age como tampão para o ácido gástrico, contribuindo para com a sobrevivência da bactéria e, conseqüentemente sua ação patogênica para as células da mucosa gástrica. (MONTECUCCO et al, 1996; RIEDER et al, 2005).

Doenças gastroduodenais induzidas por *H. pylori* dependem da resposta inflamatória do seu hospedeiro bem como da produção dos principais fatores de virulência, como a citotoxina vacuolar VacA, a citotoxina associada CagA e a própria urease, todos causadores de danos às células epiteliais gástricas (COVACCI et al, 1999; RIEDER et al, 2005).

O diagnóstico pode ser feito por três maneiras: teste do sopro, para identificação de carbono radioativo presente no CO<sub>2</sub> expirado (resultante da quebra da uréia pela urease bacteriana) após administração de cápsula de uréia marcada radioativamente; teste sorológico, compreendendo a busca por anticorpos anti-*H. pylori*; e endoscopia, cujo objetivo é a retirada de pequena porção do tecido gástrico para análise da presença do microrganismo. Para decidir qual é o melhor tratamento para *H. pylori* pode ser necessário fazer uma endoscopia e tomar uma biópsia do revestimento do estômago, para permitir que se entenda e administre o antibiótico mais apropriado àquela cepa (HELICOBACTER FOUNDATION, 2006).

Embora seja sabido que o *H. pylori* está relacionado a patologias gástricas tais como gastrite crônica, úlcera péptica, carcinomas gástricos, deve-se também

notar, principalmente para fins de tratamento, que há cepas multiresistentes desta bactéria (SIQUEIRA et al, 2007).

A resistência bacteriana, incluindo a de *H. pylori*, podem ser de várias classes: natural (ou primária), que se define pela impossibilidade intrínseca de o antibacteriano erradicar a infecção, na maioria das vezes devido a um efeito barreira, que impede a penetração do antimicrobiano; resistência adquirida, quando inicialmente há susceptibilidade da bactéria ao antibiótico, mas adquire resistência por mutações genéticas na bactéria; resistência farmacológica, a qual pode ser aplicada a cepas *H. pylori*, que mostram susceptibilidade a um antibiótico *in vitro*, mas são resistentes ao mesmo antibiótico *in vivo*; a principal causa desta resistência é a dificuldade de o antibiótico chegar ao foco da infecção em concentrações suficientes para alcançar sua atividade farmacológica antibacteriana (REVISTA ESPANHOLA DE ENFERMIDADES DIGESTIVAS, 2007).

Já se tem relatadas resistências de *H. pylori* aos nitroimidazóis, macrolídeos, quinolonas, rifamicinas, entre outros. No caso de outros antibióticos bastante utilizados na terapia, como amoxicilina e tetraciclina, as taxas de resistência são mais baixas, por isso acabam sendo de escolha inicial para o tratamento das infecções (REVISTA ESPANHOLA DE ENFERMIDADES DIGESTIVAS, 2007).

Desde a descoberta de *H. pylori*, diferentes tipos de tratamento têm sido testados contra as infecções causadas por este microrganismo, com a combinação de regimes de combinação de fármacos antimicrobianos associados a potentes inibidores da bomba de prótons, os quais revelaram aumento na absorção de outros fármacos utilizados, como sais de bismuto, claritromicina e amoxicilina (MIYOSI et al, 2001). Entretanto, um tratamento ideal continua a ser pesquisado. A maior parte dos protocolos recomendam a chamada terapia tripla de Maastricht, incluindo um

inibidor da bomba de prótons, amoxicilina e claritromicina como tratamento de primeira linha. Todavia, estudos clínicos têm mostrado que pacientes tratados com este regime reportaram falha terapêutica em 20-30% dos pacientes, e que as taxas de falha na erradicação do microrganismo têm aumentado. A principal razão para esta perda de efetividade na utilização da clássica terapia tripla pode estar fundamentada na resistência a claritromicina, que tem crescido significativamente em muitas regiões geográficas do planeta. (VAKIL, 2007; MÉGRAUD, 2004). A resistência à amoxicilina é considerada rara na maioria dos países, no entanto trata-se do antibiótico mais administrado para crianças no Brasil e há relatos de que até 38% das cepas de *H. pylori* sejam resistentes a esse antibiótico no Brasil. Metronidazol apresenta elevada resistência secundária quando é utilizado como único antibiótico no tratamento, mas diminui quando associado a um segundo ou terceiro antibiótico, sendo considerado, logo, uma boa alternativa em países que possuam uma taxa de resistência a esse fármaco menor do que 40% (MACHADO et al, 2008).

Outros esquemas terapêuticos de primeira linha compreendem o tetraconjugado com inibidor da bomba de prótons, sal de bismuto, tetraciclina e metronidazol, sendo relatadas taxas de erradicação da ordem de 80%. O interessante neste regime é que pode ser administrado a pacientes alérgicos a penicilina ou com resistência a metronidazol e claritromicina. Um de seus inconvenientes é o número de comprimidos administrados por dia, podendo levar a um não cumprimento da terapia por parte do paciente. Recentemente foi desenvolvida uma cápsula contendo bismuto, metronidazol e tetraciclina, mas ainda não está disponível no mercado (CHEY, 2007).

A adoção da monoterapia não é uma recomendação terapêutica, pois é comprovadamente ineficaz *in vivo* devido justamente ao surgimento de linhagens fármaco-resistentes, resultantes de uma nitroredutase mutante presente nesses microrganismos. (HARDMAN et al, 2001; MURRAY et al, 1999; ROITT et al, 1999; TRABULSI et al, 2000).

Apesar de relativamente efetiva, a terapia múltipla ainda possui limitações terapêuticas que comprometem ainda mais sua efetividade, tais como: a adesão e colaboração do paciente no cumprimento terapêutico, com relação à correta administração das doses prescritas, intervalos de administração e período de tratamento; os mais diversos efeitos adversos dos fármacos, isolados ou combinados, além do alto custo dos medicamentos (MALFERTHEINER et al, 2003).

Os antimicrobianos que possuem espectro de ação contra *H. pylori* e, por isso, são utilizados nas combinações terapêuticas mais comuns, são: amoxicilina, azitromicina, claritromicina, furazolidona, metronidazol, tetraciclina e tinidazol (ADAMEK et al, 1996; GISBERT et al, 2001; HSU et al, 2001; HARDMAN et al, 2001; NISHIKAWA et al, 1999).

O trabalho experimental realizado foi dividido em duas etapas:

- I. Preparação de Lapdesf-IUNI;
- II. Ensaio de inibição de urease de derivados de tiouréia e guanidínicos.

# ETAPA I

“Preparação de Lapdesf-IUNI”

## OBJETIVO

Preparar o Lapdesf-IUNI, buscando otimizar sua síntese.

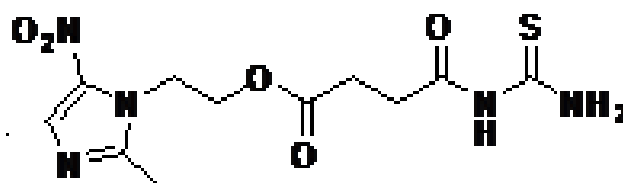


Figura 5. Lapdesf-IUNI



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Materiais para síntese do IUNI

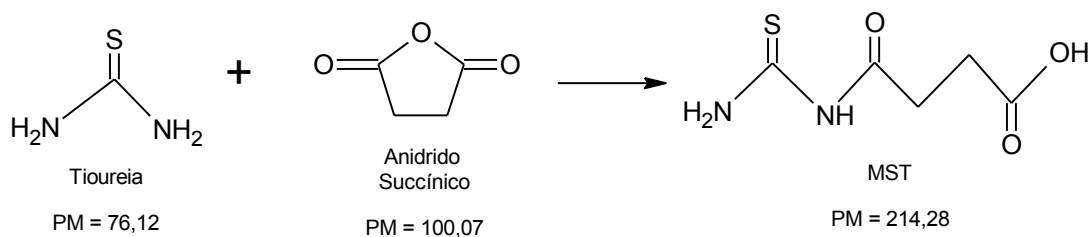
Para síntese do IUNI foram utilizados os seguintes materiais: tiouréia, anidrido succínico, hidróxido de potássio, metronidazol, cloreto de p-toluenossulfonila (cloreto de tosila), trietilamina, clorofórmio, acetona, diclorometano, acetato de etila, hexano, óleo mineral, água destilada, etanol, sílica gel 230-400.

### 2.2. Métodos

#### 2.2.1. Preparação de Lapdesf-IUNI (2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato) (SILVA, ATA, 2008)

A síntese do IUNI levou em conta três etapas: síntese do sal de MST (Hemissuccinato de tioureia), síntese do tosilato de metronidazol e, por fim, formação do IUNI.

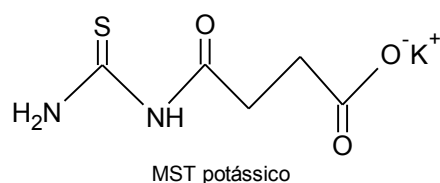
#### 2.2.2. Síntese do monossuccinato de tiouréia (MST)



**Esquema 1.** Reação de síntese do MST

Reagiu-se 1 equivalente de tioréia para 1,5 a 2,0 equivalentes de anidrido succínico para reação em banho de óleo a 120-130°C. Manteve-se a reação sob agitação manual (com espátula) por cerca de 50 minutos. Após esse período, resfriou-se, adicionou-se 25mL de água destilada e aqueceu-se o balão reacional a aproximadamente 80°C por cerca de 30 minutos. Tanto o resíduo quanto o que precipitou a partir da água resultou no produto, o MST.

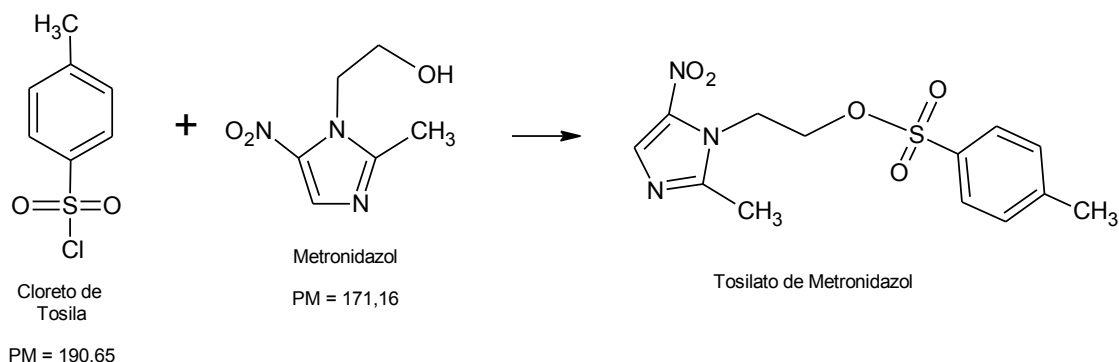
### 2.2.2.1. Sal Potássico do MST



**Figura 6.** MST potássico (sal).

O MST sintetizado na etapa anterior foi reagido com quantidade equimolar de KOH, em etanol quente por 5 minutos. Ocorreu precipitação do sal potássico. A formação do sal foi confirmada através da verificação por faixa de fusão: >210°C (MERCK INDEX)

### 2.2.3. Síntese do Tosilato de Metronidazol

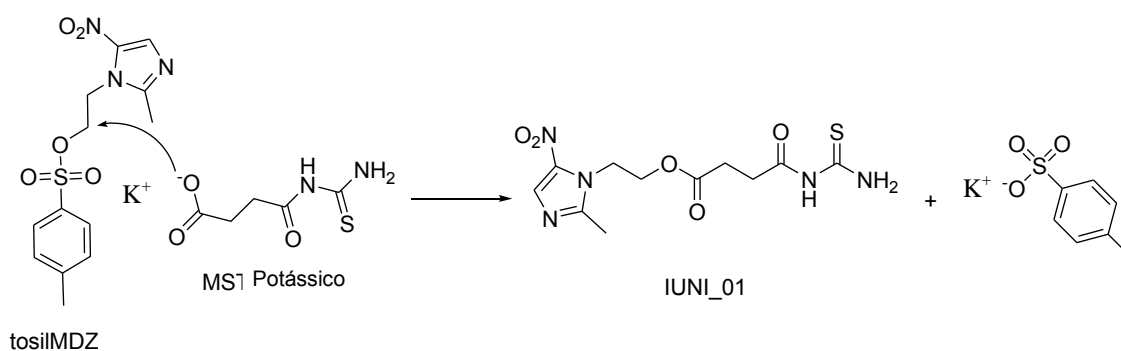


### Esquema 2. Reação de síntese do Tosilato de MDZ

Em um balão dissolveu-se o cloreto de tosila em 2mL de clorofórmio. Em um béquer foi feita a suspensão com o metronidazol, a trietilamina e 20mL de clorofórmio. A suspensão foi então adicionada gota-a-gota no balão, sob agitação constante. O pH da solução final deve ser em torno de 6. Após o término da adição, o balão foi coberto com papel alumínio, já que o metronidazol é sensível à luz, sofrendo deterioração química. A reação ocorreu overnight.

Para purificação do composto, foi feita uma Cromatografia Líquida, utilizando como fase móvel clorofórmio : acetona (2 : 1).

### 2.2.4. Formação do IUNI



### Esquema 3. Reação de formação do IUNI

Solubilizou-se o tosilato de MDZ em 5 a 10mL de DMF anidra. A partir disso, adicionou-se o sal potássico de MST aos poucos, observando alterações de cor. Todo o procedimento foi feito com a DMF aquecida a 60-70°C. A reação foi mantida por 24h nesta temperatura e acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando como fase móvel acetona : clorofórmio: hexano (4 : 4 : 2).

Para purificação, primeiramente foi evaporada a dimetilformamida (DMF). Após isso, repetiu-se por algumas vezes a trituração do resíduo com diclorometano e, em seguida, acetato de etila. Por fim, fez-se uma Cromatografia em Coluna cuidadosamente com a mesma fase móvel utilizada na CCD.

Outras metodologias alternativas foram testadas, alterando-se alguns parâmetros da metodologia original (Tabela 1).

**Tabela 1.** Alterações na metodologia de síntese de Lapdesf-IUNI

<b>Reação Alternativa</b>	<b>Solvente da reação</b>	<b>Temperatura da reação</b>	<b>Resultado</b>
1	DMF	25°C	Negativo
2	CHCl <sub>3</sub>	25°C	Negativo
3	CHCl <sub>3</sub>	60-70°C	Negativo
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60-70°C	Negativo

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Preparação de Lapdesf-IUNI (2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato) (SILVA, ATA, 2008).

A síntese do IUNI se processou por três diferentes etapas: a síntese de seus dois reagentes, o monossuccinato de tiouréia (MST) e o tosilato de metronidazol, e a etapa de reação entre ambos para formação do composto final, o IUNI.

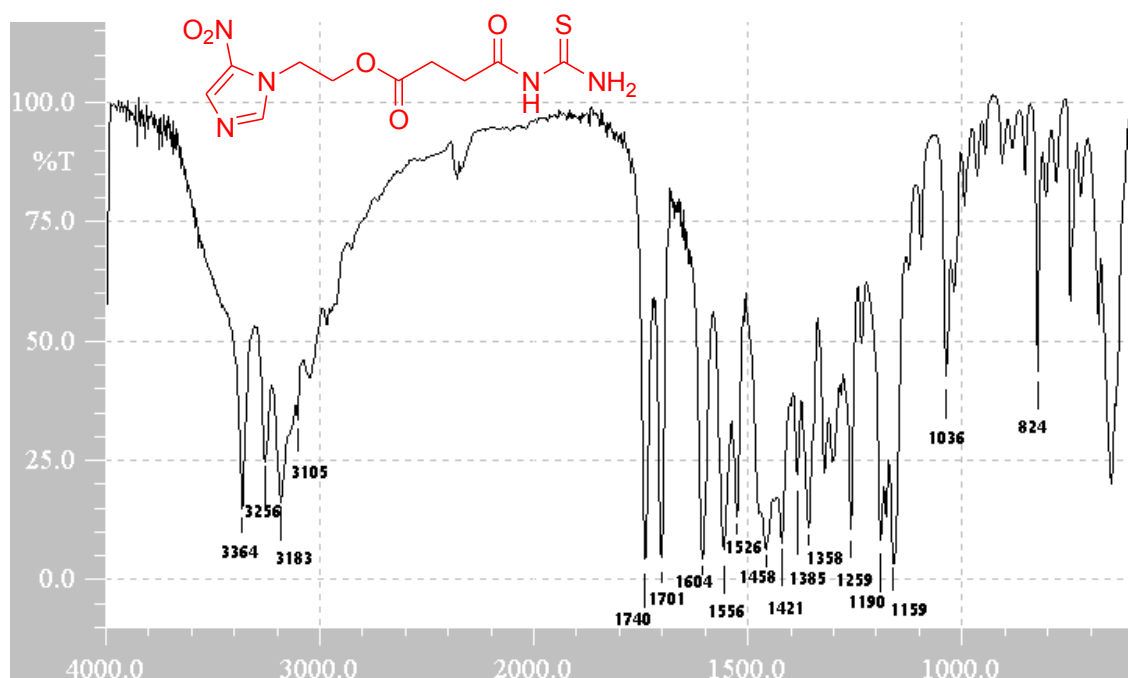
A síntese do MST é eficiente e com alto rendimento, na faixa dos 90%. A reação é realizada sem a utilização de solventes, apenas através da fusão de ambos os componentes sob agitação constante, a tiouréia e o anidrido succínico, que possuem faixas de fusão abaixo da faixa de temperatura na qual a reação se processou, entre 120-130°C. Foi de extrema importância manter a reação durante os 50 minutos sempre nesta faixa de temperatura, pois acima disso poderia apresentar degradação química dos reagentes, e abaixo, demonstrou favorecer a formação de outros produtos secundários. O mecanismo dessa reação ocorre através do ataque nucleofílico do nitrogênio de uma das aminas primárias da tiouréia sobre um dos carbonos carbonílicos do anidrido, resultando no rompimento do anel do anidrido e formação do hemissuccinato. A formação do MST pode ser verificada na medida em que após a fusão total dos reagentes, começa-se a precipitar o produto, de coloração levemente amarelada e com forte odor característico do enxofre. Após o término da reação e resfriamento desta, o produto foi purificado através de lavagem com água destilada e posterior filtração à vácuo, para solubilizar possíveis impurezas, como os próprios reagentes, já que o produto se mostrou praticamente insolúvel em água. Uma vez com o produto puro, procedeu-se a formação do sal de MST, por meio de uma reação com quantidade equimolar de hidróxido de potássio em etanol quente, que resultou na dissociação do próton do grupamento carboxila do MST para formação do sal potássico, uma reação ácido-base, catalisada pela temperatura. O rendimento para esta etapa também foi relativamente alto (em torno de 60%), sendo a etapa crítica a solubilização do MST no etanol.

A segunda etapa consistiu na síntese do tosilato de metronidazol. Esta reação foi dividida em duas etapas: houve a dissolução do cloreto de p-toluenossulfonila em clorofórmio no balão de vidro e a suspensão do metronidazol e da trietilamina em clorofórmio em um béquer a parte. A partir disso o conteúdo do béquer foi vertido gota-a-gota sobre o do balão, onde se processou a reação. O objetivo disso foi tornar a reação mais efetiva e com maior rendimento. Para isso foi utilizada a trietilamina como catalisadora da reação e o gotejamento foi feito para garantir que o máximo de metronidazol fosse reagido com o cloreto de tosilato, que estaria em excesso no meio reacional, fazendo com que a substituição do cloro pelo oxigênio alcoólico do metronidazol fosse rapidamente realizada. Houve liberação de gás ao adicionar o metronidazol ao cloreto de tosilato, muito provavelmente cloreto de hidrogênio. Ao final da reação, o solvente foi evaporado e a purificação do composto ocorreu por Cromatografia em Coluna, o que resultou em diminuição do rendimento final deste produto, para em torno de 50%.

A última etapa resultou na junção dos dois produtos sintetizados anteriormente, para formação do produto final, o IUNI. Esta reação se processou através da substituição nucleofílica do grupamento 4-tolueno sulfônico pelo (MST). A escolha de um solvente polar e aprótico se fez por ser favorável para a separação de cargas, e com baixa solvatação de ânions, favorecendo o ataque nucleofílico do ânion carboxilato sobre o carbono  $sp^3$  do derivado do metronidazol. Embora seja sabido que a influência do grupo abandonador não é tão imperativa numa reação do tipo  $SN_2$  quanto seria numa  $SN_1$ , reações semelhantes a esta foram realizadas anteriormente empregando-se o derivado cloreto de metronidazol sem obter sucesso, o que confere ao grupo tosilato a reatividade necessária para a reação.

O rendimento desta reação não foi apropriado (10% de rendimento), e como hipótese para aperfeiçoamento, acredita-se ser necessária a adequação da temperatura da reação, uma vez que este mesmo procedimento produziu apenas traços deste composto, além de também adequar as condições de purificação, pois com a Cromatografia em Coluna, houve perda significativa de produto.

O infravermelho realizado com a amostra pura sugere a obtenção do composto proposto (Espectro 1 e Tabela 2).



Espectro 1. Infravermelho de Lapdesf-IUNI sintetizado e purificado por Cromatografia em Coluna.

**Tabela 2.** Espectro de infravermelho do composto 2-(2-amino-5-nitro-1 H-imidazo-1-il)etil 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanoato - (Lapdesf-IUNI).

Grupo cromóforo	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )
<b>N-H</b>	<b>3364; 3256 e 3183</b>
<b>C-H aromático (imidazol)</b>	<b>3105</b>
<b>C=O éster</b>	<b>1740</b>
<b>C=O amida</b>	<b>1701</b>
<b>C=S</b>	<b>1604</b>
<b>Banda de amida II</b>	<b>1556</b>
<b>NO<sub>2</sub> def. axial assimétrica</b>	<b>1526</b>
<b>Deformação axial do anel imidazólico</b>	<b>1458 e 1421</b>
<b>C-N amida</b>	<b>1385</b>
<b>NO<sub>2</sub> def. axial simétrica</b>	<b>1358</b>
<b>C-N (arom)</b>	<b>1259</b>
<b>C-O éster</b>	<b>1190</b>
<b>C-S tiocarbonila</b>	<b>1159</b>
<b>C-N (nitro)</b>	<b>824</b>
<b>Faixa de fusão</b>	<b>150 °C</b>

Uma importante evidência da obtenção do composto desejado é o aparecimento de uma absorção característica de ésteres em 1740 cm<sup>-1</sup>, esta absorção só pode aparecer caso o ânion carboxilato tenha substituído de fato o grupo 4-toluenossulfônico. Esta mesma absorção sugere também que o enxofre, elemento bastante nucleofílico, não realizou a substituição, pois se assim fosse não teríamos o aparecimento de um éster mas sim de um grupo imina, a qual absorve fortemente entre 1630 e 1670 cm<sup>-1</sup>. (SILVERSTEIN, 2006). A presença de importantes absorções do anel nitroimidazólico e da porção aciltioureída, aliada a observação de uma única mancha na CCD diferente da dos reagentes é outro indício da formação do composto, o qual poderá ser confirmado através de RMN.



#### **4. Conclusão desta etapa**

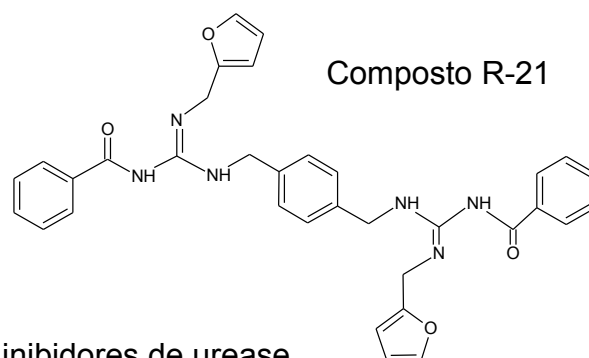
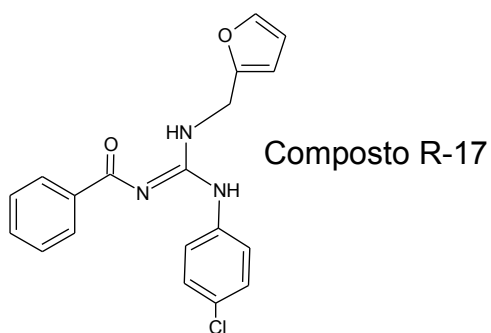
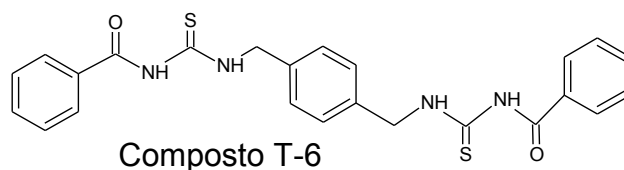
O hemissuccinato de tiouréia e o tosilato de metronidazol foram obtidos com sucesso (rendimentos superiores a 60%). Porém a última etapa, determinante para a obtenção de Lapdesf-IUNI produz baixos rendimentos (10%), necessitando ainda de novos estudos de otimização.

## ETAPA 2

“Ensaio de inibição de urease de derivados de tiouréia e guanidínicos”.

### OBJETIVO

Ensaar os derivados de tiouréia (T-6) e guanidínicos (R-17 e R-21), sintetizados pela equipe do Prof. Eduardo Perez, para verificação da potencial atividade inibidora de urease, a qual pode determinar a utilização destes como auxiliares no tratamento da infecção de *H. pylori*.



**Figura 7.** Compostos potenciais inibidores de urease

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Materiais para desenvolvimento dos testes para avaliação biológica *in vitro* da inibição da urease (Adaptado de “Journal of Enzyme Inhibition, 2001 e Analytical Chemistry, 1967).**

Para avaliar os derivados foram necessários os seguintes materiais: uréia, enzima urease de feijão, EDTA dissódico, fosfato monobásico de potássio, hidróxido de sódio, fenol, nitroprussiato de sódio, hipoclorito de sódio, água destilada.

#### **2.1.1. Metodologia para avaliação da atividade inibitória da enzima urease para os compostos T-6, R-17 e R-21.**

A metodologia para avaliação da inibição enzimática dos compostos sobre a urease obedece a três etapas: elaboração da curva de calibração para a urease, avaliação da atividade enzimática na ausência de inibidor e, por fim, avaliação da atividade enzimática na presença de cada inibidor.

##### **2.1.1.1. Curva de Calibração**

###### **2.1.1.1.1. Solução de Amônia**

Solução Estoque:

Solubilizou-se 140mg de sulfato de amônio  $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4^{2-}$  em 200mL de água deionizada.

Solução Padrão de Amônia:

Diluiu-se 10mL da solução estoque em 100mL de água deionizada.

#### 2.1.1.1.2. Solução Diluente

Adicionou-se 2mL de tampão fosfato\* pH 7,0, 2mL de solução de EDTA 20mM\* em um balão de 10mL e completou-se o volume para 10mL com água deionizada.

\*soluções preparadas de acordo com os itens 4.6.2.3. e 4.6.2.4., respectivamente.

#### 2.1.1.1.3. Procedimento

Em cada tubo adicionou-se a solução diluente, em seguida a solução de amônia, e por fim o reagente A. Agitar vigorosamente, adicionar o reagente B e agitar novamente. O equipamento de espectrofotometria, para leitura (em 625nm à temperatura ambiente) das amostras, foi calibrado com a solução do tubo “branco”. (Tabela 3).

**Tabela 3.** Dados para elaboração da curva de calibração.

Tubos	Sol. Diluente	Sol. Padrão de amônia	Reagente A	Reagente B	[NH <sub>3</sub> ]mM
<b>Branco</b>	120µL	---µL	1,0mL	1,0mL	---
<b>01</b>	100µL	20µL	1,0mL	1,0mL	0,188
<b>02</b>	80µL	40µL	1,0mL	1,0mL	0,376
<b>03</b>	60µL	60µL	1,0mL	1,0mL	0,564
<b>04</b>	40µL	80µL	1,0mL	1,0mL	0,752
<b>05</b>	20µL	100µL	1,0mL	1,0mL	0,940
<b>06</b>	---µL	120µL	1,0mL	1,0mL	1,128

**Reagente A:** Fenol + Nitroprussiato de Sódio (Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO])

**Reagente B:** Hipoclorito de sódio + Hidróxido de sódio

## **2.1.1.2. Preparo das Soluções para as próximas etapas**

### **2.1.1.2.1. Solução de Uréia (500mM)**

Foi dissolvido 1,5g (25mmol) de uréia em 50mL de água deionizada.

### **2.1.1.2.2. Solução de Urease (50µg/mL)**

Foram dissolvidos 100mg de urease em 200mL de água deionizada. Em seguida, diluiu-se 10mL para 100mL de água deionizada.

### **2.1.1.2.3. Solução de EDTA (20mM)**

Foi dissolvido 1,861g (5mmol) de EDTA dissódico em 250mL de água deionizada

### **2.1.1.2.4. Solução Tampão Fosfato, 0,5M, pH 7,0**

Foram dissolvidos 17,011g de fosfato monobásico de potássio (125mmols) em 200mL de água deionizada. Adicionou-se então hidróxido de sódio até pH 7,0 (aproximadamente 20mL de NaOH 20%), acompanhando-se por medição da solução em pHâmetro. Completou-se o volume então para 250mL com água deionizada.

### **2.1.1.2.5. Solução do Inibidor (5mM)**

Foi preparada solução 50µmol de cada um dos três compostos em 10mL de água deionizada.

#### **2.1.1.3. Atividade Enzimática**

Em balão volumétrico de 10mL foram adicionados 2mL de tampão fosfato, 2mL de EDTA e 2mL de urease.

Após isso, procedeu-se a reação: adicionou-se à mistura 200µL de uréia e completou-se o volume para 10mL com água deionizada. Iniciou-se a contagem do tempo. Foram recolhidas alíquotas de 100µL a cada 1 minuto, durante 10 minutos, contados a partir da adição da solução de uréia. Determinou-se o teor de amônia em cada alíquota de acordo com o método fenol-hipoclorito para atividade enzimática (item 3.1.1.5.).

#### **2.1.1.4. Atividade Inibitória**

Em balão volumétrico de 10mL foram adicionados 2mL de tampão, 2mL de EDTA, 2mL de urease e 2mL do inibidor a ser testado. Essa mistura foi mantida no mixer durante 20 minutos a 25°C.

Após isso, procedeu-se a reação: adicionou-se à mistura 200µL de uréia e completou-se o volume para 10mL com água deionizada. Iniciou-se a contagem do tempo. Foram recolhidas alíquotas de 100µL a cada 1 minuto, durante 10 minutos, contados a partir da adição da solução de uréia. Determinou-se o teor de amônia em cada alíquota de acordo com o método fenol-hipoclorito para atividade enzimática (item 3.1.1.5.).

### **2.1.1.5. Método Fenol-Hipoclorito para determinação de amônia**

#### **2.1.1.5.1. Preparo das soluções**

**Reagente A:** Fenol + Nitroprussiato de Sódio ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ )

Solubilizou-se 10g de fenol e 50mg de nitroprussiato de sódio em 1000mL de água deionizada. A solução foi armazenada em frasco âmbar na geladeira.

**Reagente B:** Hipoclorito alcalino

Solubilizou-se 5g de hidróxido de sódio e 20mL de solução de hipoclorito de sódio (2 a 2,5% de cloro ativo) em 1000mL de água deionizada. A solução foi armazenada em frasco âmbar na geladeira.

### **2.1.2. Metodologia para determinação do $\text{IC}_{50}$ .**

Para a determinação de  $\text{IC}_{50}$  foram testadas sob a mesma metodologia acima citada diferentes concentrações de cada uma das três amostras e elaborado um gráfico para determinação da concentração da respectiva amostra que inibe 50% da atividade enzimática.

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1. Avaliação da atividade inibitória de urease para os compostos T-6, R-17 e R-21.**

O objetivo principal destes testes foi avaliar a influência sobre a inibição da enzima urease destas três substâncias: T-6, R-17 e R-21, os quais representam

derivados guanidínicos. A urease é uma enzima produzida pelo *Helicobacter pylori* em grande escala, que converte uréia em amônia e CO<sub>2</sub>, que posteriormente é convertido a bicarbonato. A liberação da amônia é benéfica para a bactéria, já que neutraliza parcialmente o ambiente ácido do estômago. Pensa-se que a amônia, juntamente com proteínas de *H. Pylori* como proteases, catalases e fosfolipases, causem danos nas células epiteliais. Acredita-se, portanto, que fármacos que interfiram no mecanismo de inibição da urease possam ser úteis no tratamento de infecções por *H. pylori*.

Os testes para avaliação da atividade inibitória dos compostos frente à enzima urease consistem em três etapas: elaboração da curva de calibração, avaliação da atividade da enzima urease na ausência dos inibidores e, por fim, avaliação da atividade enzimática na presença de cada um dos inibidores.

### **3.1.1. Curva de Calibração**

Para as determinações enzimáticas foi necessário construir uma curva de calibração para que posteriormente fossem analisadas as amostras. Os resultados de métodos analíticos baseiam-se numa curva de calibração na qual uma medida quantitativa é plotada como função da concentração de uma série de padrões, neste caso, de amônia. A partir disso, deve-se determinar a equação de reta que melhor se ajusta aos pontos experimentais. Estes pontos experimentais são obtidos pela leitura da absorbância, que varia em função da concentração dos padrões.

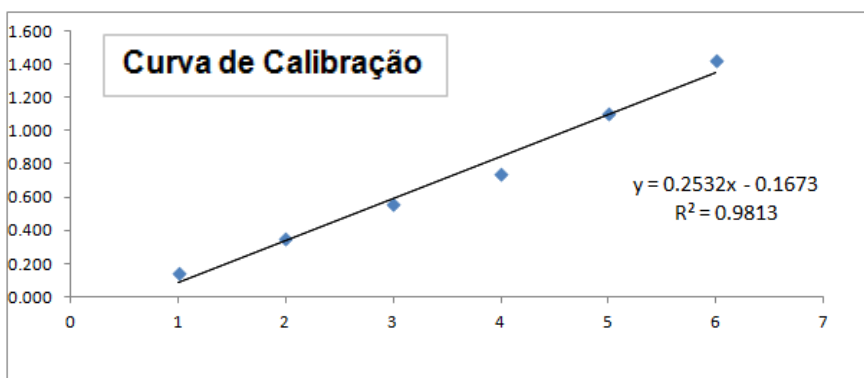
A linearidade de um método analítico se refere a sua característica de responder proporcionalmente à adição da substância em estudo em uma dada concentração. O chamado R<sup>2</sup> é o coeficiente de determinação do ensaio. Quanto



mais próximo de 1 estiver o valor de  $R^2$ , melhor será o ajuste do modelo às respostas observadas. Na Tabela 2 estão representados os pontos utilizados para a construção da curva de calibração da urease e suas respectivas absorvâncias. A figura 8 representa a curva de calibração da urease, bem como a equação da reta e o  $R^2$ .

**Tabela 4.** Valores utilizados para a construção da curva de calibração da urease e suas respectivas absorvâncias

Curva de Calibração		
Padrão	Conc. (mM)	Abs 625nm
1	0.188	0.140
2	0.376	0.352
3	0.564	0.555
4	0.752	0.739
5	0.94	1.101
6	1.128	1.426



**Figura 8.** Curva de Calibração para determinação da atividade da urease.

### 3.1.2. Avaliação da Atividade Enzimática da Urease

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos, tanto em absorvância, quanto calculados para concentração.

**Tabela 5.** Atividade da enzima urease na ausência dos compostos.

<b>Atividade da urease na ausência dos compostos</b>		
<b>Tempo (min)</b>	<b>Absorbância em 625nm</b>	<b>Concentração (mM)</b>
1	0.036	0.803
2	0.046	0.842
3	0.054	0.874
4	0.062	0.906
5	0.077	0.965
6	0.081	0.981
7	0.093	1.028
8	0.144	1.229
9	0.165	1.312
10	0.184	1.387
11	0.195	1.431

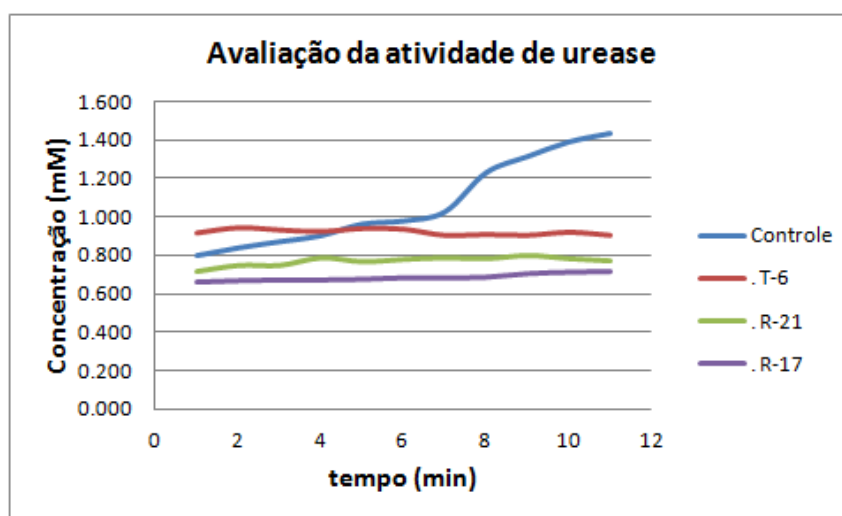
### **3.1.3. Avaliação da atividade enzimática na presença dos potenciais inibidores T-6, R-17 e R-21.**

Após a construção da curva de calibração e determinação da atividade enzimática na ausência dos inibidores, iniciaram-se os testes e as análises das amostras em estudo.

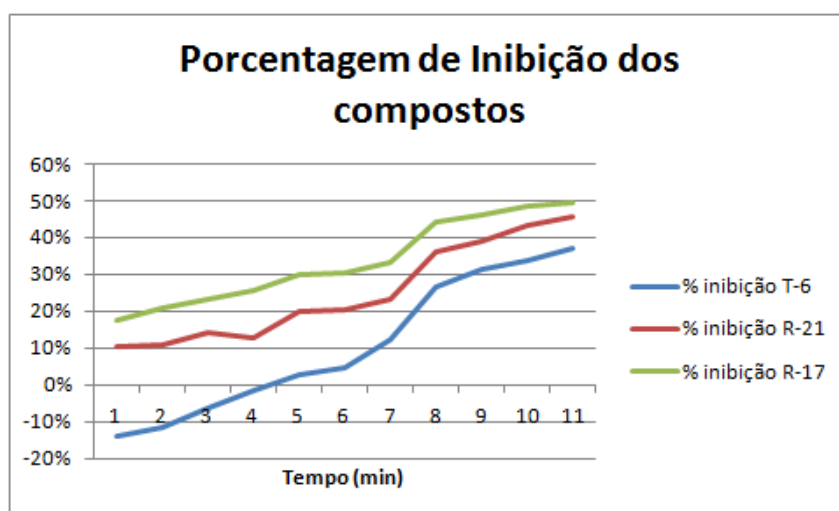
A Tabela 6 e as Figura 9 e 10 apresentam os resultados para os três potenciais inibidores, em comparação com os resultados obtidos na ausência destes.

**Tabela 6.** Resultado da avaliação da atividade da urease na presença das três amostras: T-6, R-21e R-17.

<b>Atividade Enzimática</b>				
Tempo	Ausência dos compostos	Presença do Composto (5mM)		
		T-6	R-21	R-17
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.803	0.914	0.720	0.661
2	0.842	0.941	0.752	0.669
3	0.874	0.929	0.752	0.673
4	0.906	0.921	0.791	0.673
5	0.965	0.937	0.771	0.677
6	0.981	0.933	0.783	0.684
7	1.028	0.902	0.791	0.684
8	1.229	0.906	0.787	0.688
9	1.312	0.902	0.803	0.708
10	1.387	0.917	0.787	0.716
11	1.431	0.902	0.775	0.720



**Figuras 9.** Atividade da urease na ausência e na presença dos inibidores.



**Figura 10.** Porcentagem de inibição da urease para cada composto.

Os resultados dos testes demonstraram que houve inibição parcial da atividade da enzima urease para as três amostras ensaiadas.

Em relação ao R-21, nota-se que houve diminuição da atividade enzimática, também mostrando uma tendência de patamar na atividade da urease.

R-17, por sua vez, foi a substância que mais apresentou atividade inibitória frente a urease. Contudo essa inibição é vista de maneira diferente, pois não acontece de maneira que os valores permaneçam em uma mesma faixa, mas sim seguindo o comportamento da atividade da enzima na ausência dos inibidores, em uma escala menor. Isso sugere que a interação da substância com a enzima ocorreu de forma reversível competitiva, pois houve competição.

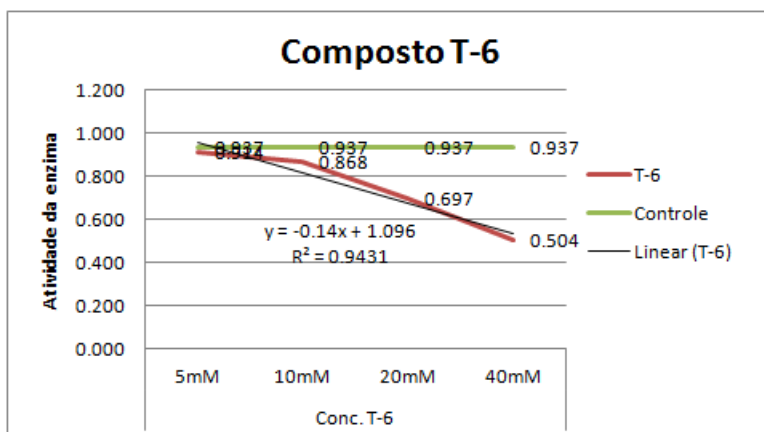
### 3.2. Determinação de IC<sub>50</sub>

O IC<sub>50</sub>, a concentração da substância que fornece inibição de 50% para certa reação, é mais comumente usado para representar o efeito inibitório de substâncias frente a determinada enzima. Em termos mais simples, mede o quanto de uma determinada substância é necessário para inibir algum processo biológico em 50%.

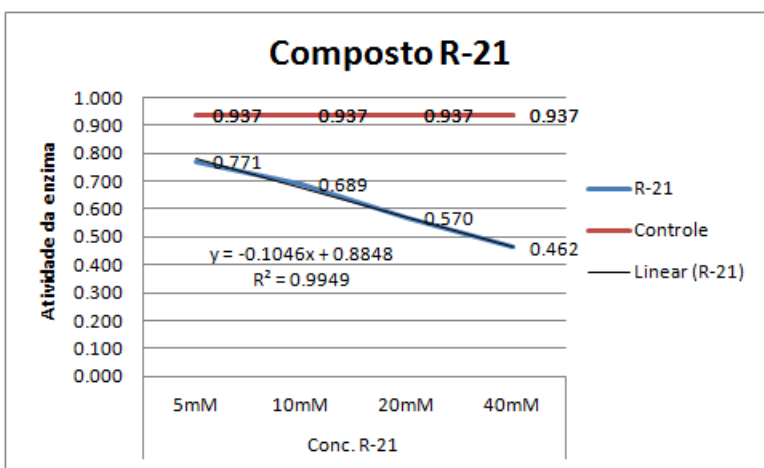
A Tabela 7 mostra os resultados encontrados para o teste de cada amostra em quatro diferentes concentrações: 5mM, 10mM, 20mM e 40mM. As Figuras 11, 12 e 13 ilustram os resultados obtidos.

**Tabela 7.** Resultados obtidos no teste de IC<sub>50</sub> das três amostras.

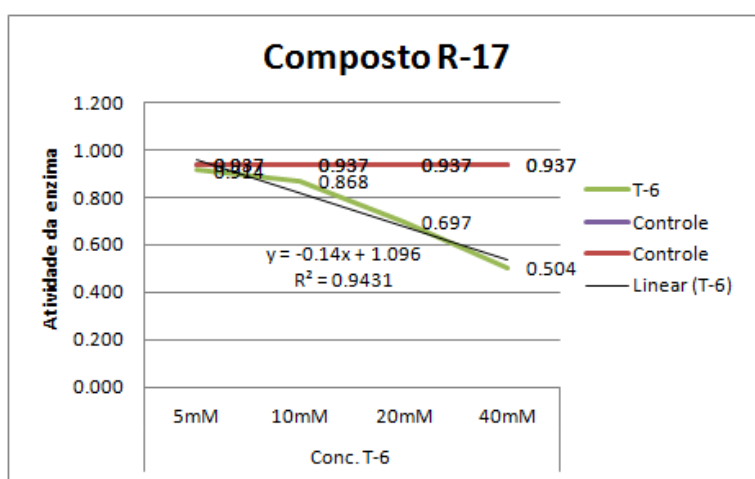
Composto	Concentração	Atividade COM inibidor	Atividade SEM inibidor	% Inibição
<b>T-6</b>	5mM	0.914	0.937	2%
	10mM	0.868	0.937	7%
	20mM	0.697	0.937	26%
	40mM	0.504	0.937	46%
<b>R-21</b>	5mM	0.771	0.937	18%
	10mM	0.689	0.937	26%
	20mM	0.570	0.937	39%
	40mM	0.462	0.937	51%
<b>R-17</b>	5mM	0.677	0.937	28%
	10mM	0.622	0.937	34%
	20mM	0.529	0.937	44%
	40mM	0.340	0.937	64%



**Figura 11.** Perfil de inibição de T-6 frente ao controle.



**Figura 12.** Perfil de inibição de R-21 frente ao controle.



**Figura 13.** Perfil de inibição de R-17 frente ao controle.

Através dos testes realizados e construção das curvas de inibição geradas pela análise em quatro diferentes concentrações, pode ser encontrada a  $IC_{50}$  para cada amostra, utilizando como base para o cálculo a equação de reta, cujo  $R^2$  é acima de 0,9.

Dessa forma determinou-se que para T-6, o valor de  $IC_{50}$  é 44,8mM; para R-21 é de 39,8mM e de R-17, de 31,7mM. Portanto, é possível concluir que a substância com maior perfil de inibição é a R-17, pois uma menor concentração em relação às outras é capaz de inibir em cinquenta por cento a atividade da urease.

#### **4. Conclusão desta etapa**

Os resultados da avaliação das substâncias T-6, R-17 e R-21 mostraram que tais compostos são promissores, apresentando real inibição *in vitro* para a urease, produzida por *H. pylori*. Novos testes, comparando estes compostos aos utilizados na prática clínica e ainda a utilizando culturas de *H. pylori*, poderiam ser o próximo passo para o avanço no estudo de tais moléculas, como possíveis candidatas a fármacos para o tratamento de *H. pylori*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEK et al, R.J. et al. Cure of *Helicobacter pylori* infection: role of duration of treatment with omeprazole and amoxicillin. Am. J. Gastroenterol. v.91, 1996.

ATHERTON JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut 1997;40:701-3.

BARRY, C.E. et al. Use of Genomics and Combinatorial Chemistry in the Development of New Antimycobacterial Drugs. Bioch. Pharmacol. v. 59, p. 224 e 228, 2000.

BROWN LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev 2000.

BRZOZOWSKI, T. et al. Mucosal irritation, adaptive cytoprotection, and adaptation to topical ammonia in the rat stomach. Scand. J. Gastroenterol. v.31, n.9, 1996.

CHEY WD, WHONG BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol 2007. 102: 1808-1825.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 280-285.



COVACCI A, TELFORD JL, DEL GIUDICE G, PARSONNET J, RAPPUOLI R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328-1333.

DUBREUIL JD, GIUDICE GD, RAPPUOLI R. *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66:617-629.

FERNANDEZ MC, ROMERO JV. Infection with *Helicobacter pylori*. Prevalence, research and impact of antibiotic resistance. *Rev Española de Enfermedades Digestivas (Madrid)*. 2009; Vol 101, Nº 11, p. 743-756.

FISCHBACH W, CHAN AO, WONG BC. *Helicobacter pylori* and gastric malignancy. *Helicobacter* 2005; 10 (Suppl 1): 34-39.

GISBERT, J.P. et al. High efficacy of ranitidine bismuth citrate, amoxicillin, clarithromycin and metronidazole twice daily for only five days in *Helicobacter pylori* Eradication. *Helicobacter*. v.6, 2001.

HARDMAN JG, LIMBIRD LL, GILMAN AG EDITORS. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

GARCÍA JMP, VILLAROYA RP, GISBERT JP. *Helicobacter pylori*. Resistencia a los antibióticos. *Rev Española de Enfermedades Digestivas (Madrid)*. 2007; Vol 99, Nº 2, p. 63-70.

HOPKINS RJ, GIRARD LS, TURNEY EA. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. *Gastroenterology* 1996; 110; 1244-1252.

HSU, C.C. et al. Famotidine Versus Omeprazole, in combination with Amoxicillin and Tinidazole, for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* v.13, 2001.

MACHADO RS, SILVA MR, VIRIATO A. Furazolidone, tetracycline and omeprazole: a low-cost alternative for *Helicobacter pylori* eradication in children. *Jornal de Pediatria.* 2008. Vol.84, N° 2, p.161.

MALFERTHEINER P, PEITZ U, TREIBER G. What constitutes failure for *Helicobacter pylori* eradication therapy? *Can J Gastroenterol* 2003; 17 (Supl. B): 53B-57B.

MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O'MORAIN C, BAZZOLI F, EL-OMAR E, GRAHAM D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781.

MEGRAUD F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384.

MITANI-EHARA, S. et al. Studies on gastric mucosal cell injury induced by *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Gastroenterol.* v.25, p. S164-8, 1997.

MIYOSI M, MIZUNO M, ISHIKI K, et al. A randomized open trial for comparison of proton pump inhibitors, omeprazole versus rabeprazole, in dual therapy for *Helicobacter pylori* infection in relation to CYP2C19 genetic polymorphism. J Gastroenterol Hepatol 2001; 16: 723-728.

MOBLEY, H.L.T; MENDZ, G.L; HAZELL, S.L. *Helicobacter pylori*: physiology and genetics. Washington: ASM Press, 2001.

MONTECUCCO C, PAPINI E, DE BERNARD M, ZORATTI M. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. FEBS Lett 1999; 452: 16-21.

MURRAY, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 9ed. v.1, 2007. p. 940-960.

NISHIKAWA, K. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* using 30 mg or 60 mg lansoprazole combined with amoxicillin and metronidazole: one and two weeks of a new triple therapy. J. Gastroenterol. v.34, 1999.

RIEDER G, FISCHER W, HAAS R. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. Cur Opin Microbiol 2005; 8: 67-73.

ROITT, I. et al. Microbiologia Médica. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999.

SMOOT, D.T. et al. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. Infect Immun. v.58, n.6, p.1992-4, 1990.

SACHS G, WEEKS DL, WEN Y, MARCUS EA, SCOTT DR, MELCHERS K. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology* 2005; 20: 429-438.

SANTOS, H., GUERREIRO, H., SOUSA, ESTEVENS, D. *Helicobacter pylori* numa população dispéptica no Algarve: prevalência e caracterização genética. *Jornal Português de Gastrenterologia*. J Port Gastrenterol. v.17 n.3 Lisboa maio 2010.

SEVERO DO, WASSERMANN GE, CARLINI CR. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006; 39: 851-861.

SILVA, ATA. Desenvolvimento de compostos ativos contra *Helicobacter pylori*. Araraquara, 2008.

SIQUEIRA, J.S.; et al. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* – Revisão. *RBAC*. v.39, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

TRABULSI et al, L.R. et al. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

VAKIL N, MEGRAUD F. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985-1001.