



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Larissa Spósito

**Caracterização biológica e prospecção terapêutica de
Casearia sylvestris Swartz não incorporada e incorporada
em sistema nanoestruturado na atividade anti-
*Helicobacter pylori***

Araraquara

2017

LARISSA SPÓSITO

**Caracterização biológica e prospecção terapêutica de
Casearia sylvestris Swartz não incorporada e incorporada
em sistema nanoestruturado com enfoque na atividade
anti-*Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Taís Maria Bauab

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Spósito, Larissa
S764c Caracterização biológica e prospecção terapêutica de *Casearia sylvestris* Swartz não incorporada e incorporada em sistema nanoestruturado com enfoque na atividade anti-*Helicobacter pylori* / Larissa Spósito. – Araraquara, 2017.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Taís Maria Bauab.

1. *Helicobacter pylori*. 2. *Casearia sylvestris* Swartz. 3. Produtos naturais. 4. Microdiluição.
5. Microbiológico. 6. Atividade antibacteriana. 6. Atividade *in vivo*. I. Bauab, Taís Maria, orient.
II. Título.

CAPES: 40300005

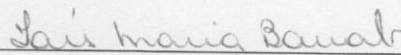
LARISSA SPÓSITO

Caracterização biológica e prospecção terapêutica de *Casearia sylvestris* Swartz não incorporada e incorporada em sistema nanoestruturado na atividade anti *Helicobacter pylori*

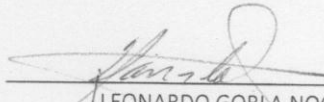
Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 02 de junho de 2017

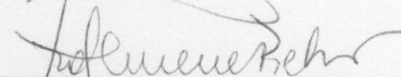
BANCA EXAMINADORA



TAIS MARIA BAUAB



LEONARDO GORLA NOGUEIRA



ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO

Dedicatória

Gostaria de dedicar esse trabalho a minha família, meus pais e ao meu irmão, pois se não fosse por eles eu não teria conseguido, eles são a base da nossa família e a minha força. O apoio dos meus pais e a crença que eles têm em mim é o que me move todos os dias. Sou muito sortuda pois tenho vocês, que são os únicos que nunca me abandonam. Vocês são um espelho pra mim, mostrando que independente dos problemas o amor sempre estará em primeiro lugar. Obrigado por tudo que vocês fizeram e sempre fazem por mim. Vocês me ensinaram o que o significado perfeito do AMOR. Amo muito vocês!! O meu querido irmão que sempre muito presente também, cuidando da nossa família, mesmo nos momentos de minha ausência. Muito obrigado por cuidar da nossa família, isso me tranquiliza e fez com que eu conseguisse finalizar esse trabalho. Amo muito você e você sempre será o meu melhor amigo!!

Muito obrigado!

Amo vocês☺

Agradecimentos

Inicio meus agradecimentos, agradecendo a DEUS, que me colocou nesse mundo com muita saúde. Se não fosse por ele hoje eu não estaria aqui!!

Agradeço primeiramente aos meus pais Waldecy Antonio Spósito e Eloisa da Silva Spósito, por me criarem com tanto amor e carinho, transferindo muita paz e amor a nossa família. Geneticamente sou a junção desse amor, com personalidade forte da minha mãe, mais ou mesmo tempo com muita compaixão do meu pai. Tenho muito a aprender nessa vida, mais amor e caráter vocês me deram de sobra!! Vocês são meus heróis. Amo vocês!!

Ao meu irmão Diogo Spósito, que eu tanto amo!! Apesar de todas as nossas brigas quando criança, você me ensinou que quando há um problema é a união que nos faz forte, mesmo que fosse pra gente não apanhar... rrsrrsrs!! Obrigado por tudo, desde as broncas ate os conselhos, saiba que você é um ótimo irmão mais velho!! Sempre me protegeu. Amo você!!

A minha avó Adezir Passarini Spósito, que até hoje mesmo com as suas limitações me da amor e carinho incondicionalmente. Obrigada por suas orações que está sempre me guiando e me dando paz. A senhora é guerreira, te amo. E ao meu avô Waldecy Spósito (falecido), que sempre com todas as dificuldades dessa vida, nunca se entregou e abandonou minha avó e meu pai. O senhor é muito guerreiro!! Sei que você esta olhando por nós. Saudades, amo você!

A minha avó Maria Ferreira (falecida), que infelizmente nos abandonou sem mesmo dizer adeus. Saudades e obrigada por tudo. Te amo !!

Aos meus tios, Rita de Cassia Sambugari e Alberto Sambugari, que fizeram parte da minha criação, sempre cuidando e ajudando meus pais nos momentos bons e ruins. Amo vocês!!

A minha priminha linda Brisa Eloá Sambugari, que eu vi nascer e trouxe muita felicidade a nossa família. Amo você!

Ao meu príncipe, Gessynger Morais Silva, que nesses dois anos me mostrou o que é um relacionamento baseado em companheirismo, amor, caráter, amizade, família, compreensão e confiança. Nunca imaginei encontrar alguém que me aceitasse e me entendesse do jeitinho que eu sou... mas você apareceu!! Obrigada amor por toda a sua ajuda física e mental nesse trabalho. Você tem um dedo muito grande aqui e você sabe o quanto eu sou grata.

Agradeço com todo carinho e amor a pessoa que abriu a porta do laboratório sem nem ao menos, me conhecer Professora Taís Maria Bauab. A quem devo não somente a oportunidade de conduzir esse trabalho, mais também a todos os ensinamentos dados. Obrigada professora, a senhora foi uma grande amiga e grande orientadora. Minha eterna gratidão.

Também tenho muito a agradecer a Professora Margarete Gottardo de Almeida, que foi a pessoa que me apresentou a pós-graduação e sempre contribuiu com o meu crescimento profissional. Obrigada!!

A minha amiga Luciani Gaspar de Toledo, que tanto nos anos de Famerp, como agora sempre esta de braços abertos pra mim, seja em questões pessoais ou profissionais. Obrigada, aprendi muito com você.

Ao meu querido amigo Matheus Aparecido dos Santos Ramos, que mesmo brilhando na Holanda e não poderá ver a finalização desse trabalho, me ajudou com tanto amor a inicializar esse projeto, me ensinando e aconselhando. Obrigada amigo, você foi essencial na minha vida nesses dois anos. Sempre me motivando e me guiando. Eu te amo!!

As meninas do Lab, Bruna Vidal Bonifácio e Patrícia Bento da Silva, que me acolheram com tanto carinho e hoje são pessoas essenciais na minha vida. Obrigada pelas ajudas e pelas risadas. Vocês deixam meu dia mais engraçado e harmonioso.

Ao Anderson Noronha (Andie) que mesmo em pouco tempo já me ajudou muito. Desejo todo sucesso pra você.

Aos alunos de iniciação científica que sempre estiveram dispostos a me ajudar. Obrigado Beatriz, Caetano, Erina, Jessica, Marina, Laura e Veridiana. Em especial quero agradecer a Julia Hunger Vieira (JÚ) que tem me acompanhado desde o início do trabalho 24 horas por dia, fim de semanas e tudo mais. Sem você Jú eu não teria conseguido, você foi minha fiel escudeira, muito obrigada. A Isa (Isadora Masiero) também que me ajudou absurdos no meu *in vivo* vindo até de final de semana. Vocês são sensacionais. Amigas de verdade. Obrigada meninas!!

Um grande obrigado a todos os funcionários do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, em especial à equipe técnica da disciplina microbiologia, Ednéia, Débora e Silvia, por sempre estarem dispostas a ajudar e dar todo suporte necessário.

A Margarete Rossi, que sempre muito disposta a ajudar e facilitar nossa vida.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP. Natália Seron, Eduardo Carvalho, Mayra Arroyo, Luceli Ferreira e Luis Paulo Teixeira. Onde aprendi um pouco de muito que ainda tenho que aprender.

Ao professor André Gonzaga dos Santos, que gentilmente deixou as portas do laboratório de Farmacognosia abertas pra mim e sempre disposto a ajudar e tirar dúvidas, obrigada.

O meu companheiro de mestrado Fernando Bombarda Oda, que me aguentou esses dois anos perguntando coisas básicas e sempre com muita paciência me ajudava. Valeu Fer por essa parceria, sem você estava fazendo extrato até hoje hahahaha!!

Ao aluno de doutorado Flávio Alexandre, que sempre esteve disponível e solícito a me ajudar!!

Quero agradecer imensamente as queridas Giovana Calixto e a Tatiani Sorregotti que foram a minha primeira casa aqui em Araraquara, abriram casa delas para uma completa desconhecida e sempre foram muito gentis comigo. Em especial a Tati que virou minha melhor amiga aqui,

sempre me ajudando e me escutando. Tatinha nunca imaginei encontrar uma pessoa assim tão maravilhosa. Você é sensacional!! Um grande presente que Araraquara me deu. Love you!!

A outro ser humano maravilhoso que essa cidade me proporcionou conhecer, Lucas Gomes de Souza. Luquinha sou muito sortuda de ter você na minha vida... você é sensacional. Você é o típico amigo de verdade, que está presente em todos os momentos. Obrigada por sempre estar cuidando de mim e do Gessy. Você é o máximo. Te amo amigo!!

Ao Willian Costa Ferreria, que também tive a oportunidade de conhecer e descobri ser um menino com coração imenso. Will valeu por tudo que você faz pela gente, sempre preocupado e proativo.

A todo pessoal do laboratório de farmacologia que também sempre me receberam com tanto carinho e me tratam como parte do grupo.

Aos meus amigos rio-pretenses Luis Paulo Texeira e Eduardo Carvalho, que mesmo longe sempre estiveram muito presentes com palavras amigas e animadoras.

A minha cunhada Paola Lodi, que mesmo de longe sempre muito presente e muito prestativa.

Às meninas da seção técnica de Pós-graduação, Claudia e Daniela agradeço por toda a prestatividade de sempre.

A todos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP/FCFAR.

A biblioteca da FCFAR pela disponibilidade de ajuda nas correções das referências bibliográficas desta dissertação.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

RESUMO

O uso de produtos naturais na terapêutica convencional vem ganhando destaque nos últimos anos com relação a atividade antimicrobiana devido à alta taxa de efeitos tóxicos e ao excessivo crescimento do número de cepas multirresistentes aos antimicrobianos convencionais empregados na prática. Entre as novas triagens terapêuticas frente às afecções bacterianas, as infecções causadas pelo *Helicobacter pylori* merecem atenção especial, uma vez que estão diretamente relacionadas com quadros clínicos severos, como a gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico. A *Casearia sylvestris* Swartz é uma planta popularmente conhecida como guaçatonga ou erva-de-bugre, utilizada na medicina popular no tratamento de transtornos gástricos que nos últimos anos vem despertando interesse na comunidade científica, por suas importantes propriedades com potencial terapêutico como atividade anti-inflamatório, antiofídico, cicatrizante, citotóxica em linhagens de células tumorais e principalmente antiulcerogênica. Neste contexto, uma excelente alternativa para o aprimoramento dos parâmetros biodisponíveis dos extratos vegetais muito utilizada na atualidade é a incorporação destes em sistemas nanotecnológicos de liberação de fármaco para que o produto ativo tenha uma melhor ação. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial biológico antibacteriano *in vitro* do extrato etanólico, extrato aquoso, fração e subfrações das folhas de *Casearia sylvestris* Swartz, incorporar em um sistema de liberação de fármacos os derivados mais ativos e a partir dos resultados realizar o experimento *in vivo* contra a cepa ATCC 43504 de *H. pylori*. Os extratos foram preparados por infusão e maceração. Para as análises biológicas utilizamos a técnica de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima e o biofilme formado. O estudo foi desenvolvido aplicando-se metodologias *in vitro* e *in vivo* para elucidar o perfil antibacteriano pretendido, obtendo-se resultados satisfatórios, deixando esse estudo mais interessante, já que a literatura mostra que a *C. sylvestris* tem perfil anti-ulcerogênico. A partir desses resultados pudemos concluir que os derivados de *C. sylvestris* apresentaram estatisticamente atividades antibacterianas tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo que a maioria dos derivados vegetais com exceção dos extratos aquosos, fração 1 e 3 e a subfração 17, tiveram alguma atividade frente ao micro-organismo. Essa atividade provavelmente esta relacionada aos diterpenos clerodânicos que estão em abundância nos derivados da *C. sylvestris*. A incorporação no sistema nanoestruturado não potencializou a atividade dos derivados vegetais como esperado na maioria dos teste, isto talvez seja pelo fato de a composição dos derivados vegetais e do sistema não serem compatíveis quimicamente. Desde que a literatura mostrou a atividade antiulcerogênica dos derivados vegetais da *C. sylvestris*, eles podem ser utilizados tanto na cicatrização das lesões como também para a erradicação do *H. pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*. *Casearia sylvestris* Swartz. Produtos naturais. Microdiluição. Atividade antibacteriana. Atividade *in vivo*.

ABSTRACT

The use of natural products in conventional therapeutics has been gaining highlight in recent years relative to the antimicrobial activity due to the high rate of toxic effects and the excessive growth of the number of multiresistant strains to the conventional antimicrobials used in practice. Among the new therapeutic screenings for bacterial diseases, infections caused by *Helicobacter pylori* deserve special attention, since they are directly related to severe clinical conditions, such as chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. *Casearia sylvestris* Swartz is a plant popularly known as guaçatonga or erva-de-bugre, used in popular medicine to the treatment of gastric disorders that in recent years has gained the interest of the scientific community due to its important properties with therapeutic potential as an anti-inflammatory, antifidic, healing, cytotoxicity against tumor cells and mainly antiulcerogenic. In this context, an excellent alternative for the improvement of the bioavailability parameters of the vegetal extracts that is used today is the incorporation of these in nanotechnological systems of drug release so that the active product has a better action. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial potential of the ethanolic extract, aqueous extract, fraction and subfractions of the leaves of *Casearia sylvestris* Swartz, and incorporate into a drug delivery system the most active derivatives and from these results carry out the *in vivo* experiment against the *H. pylori* ATCC strain. The extracts were prepared by infusion and maceration. For the biological analyzes we use the microdilution technique to determine the minimum inhibitory concentration and the formed biofilm. The study was developed applying *in vitro* and *in vivo* methodologies to elucidate the antibacterial profile. From the results, we can conclude that the *C. sylvestris* derivatives showed statistically antibacterial activities both *in vitro* and *in vivo*. Most of the vegetal derivatives with the exception of aqueous extracts, fractions 1 and 3 and subfraction 17, had some activity against to the microorganism. This activity is probably related to clerodan diterpenes that are abundant in *C. sylvestris* derivatives. The incorporation into the nanostructured system did not potentiate the activity of the vegetable derivatives as expected in most tests, this is perhaps due to the fact that the composition of the plant derivatives and the system are not chemically compatible. Since the literature shows an antiulcerogenic activity of *C. sylvestris* derivatives, they could be used both for wound healing and for *H. pylori* eradication.

Keywords: *Helicobacter pylori*. *Casearia sylvestris* Swartz. Natural products. Microdilution. Antibacterial activity. *In vivo* activity.

Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Helicobacter pylori</i>	19
Figura 2 – Microfotografia do <i>H.pylori</i>	20
Figura 3 - Mecanismo do controle do pH interno e externo pela urease no <i>H. pylori</i>	21
Figura 4 – Fotografia ilustrando infecção por <i>H. pylori</i>	24
Figura 5 - Fotografia da <i>Casearia sylvestris</i> do horto de plantas medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP	32
Figura 6 - Estrutura química geral de diterpenos clerodânicos da <i>C. sylvestris</i> . R ₁ a R ₅ são substituintes oxigenados, tais como ésteres, éteres e hidroxilas.....	33
Figura 7 - Microemulsões: O/A e A/O.....	37
Figura 8 – Fármaco incorporado em uma ME óleo em água.....	38
Figura 9 - Extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i>	44
Figura 10 - Fotografia do sistema de fracionamento por EFS do extrato etanólico.....	45
Figura 11 - Microplaca de Microdiluição. Esquema de utilização da microplaca de 96 poços na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	50
Figura 12 - Reação de óxido-redução da resazurina.....	51
Figura 13 - Reação de redução do XTT.....	53
Figura 14 - Representação esquemática do ensaio <i>in vivo</i> de atividade anti – <i>H. pylori</i>	55
Figura 15 - Cromatoplaça obtida por CCD (sílica gel) do extrato (Ext), frações EFS F 1-3 (5,0 mg/mL em metanol) utilizando a FM composta por hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:02 (v/v). O revelador utilizado foi o anisaldeído sulfúrico, permanecendo em estufa à 110° C por 10 min.....	58
Figura 16 - Cromatoplaças obtidas por CCD (sílica gel) das subfrações obtidas por CC utilizando como FM: 1. hexano: acetato de etila: isopropanol. SF 1-15 (75:23:02, v/v); SF 16-46: (70:28:02, v/v); SF 46-62 (50:47:03, v/v). As frações foram solubilizadas em AcOEt (5,0 mg/mL). O revelador foi o anisaldeído sulfúrico, permanecendo em estufa à 110° C por 10 min.....	60
Figura 17 - Cromatograma analítico da SF 13.....	61
Figura 18 - Cromatograma analítico SF 17.....	62
Figura 19 - Cromatograma analítico SF 20.....	62
Figura 20 - Cromatograma analítico SF 46.....	63
Figura 21 - Atividade anti biofilme: A - amoxicilina, B - extrato etanólico não incorporado e incorporado, C- fração 2 não incorporados e incorporados em uma microemulsão.....	67
Figura 22 - Time kill do extrato etanólico contra <i>H. pylori</i>	69
Figura 23 - Time kill do extrato etanólico incorporado contra <i>H. pylori</i>	69
Figura 24 Time kill da fração 2 contra <i>H. pylori</i>	70
Figura 25 - Time kill da fração 2 incorporado contra <i>H. pylori</i>	70
Figura 26 - Efeito do extrato não incorporado e incorporado em um sistema nanoestruturado e da fração 2 de <i>C. sylvestris</i> sobre o tamanho de lesão ulcerativa em um modelo de infecção por <i>H. pylori</i>	71
Figura 27 - Fotografia dos estômagos.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tratamentos experimento <i>in vivo</i>	54
Tabela 2 - Diterpenos clerodânicos (casearinas) identificados nas subfrações da <i>C.sylvestris</i>	63
Tabela 3 - Determinação da Concentração Inibitória mínima dos extratos aquoso 1 e 2, extrato etanólico, frações e subfrações das folhas de <i>C. sylvestris</i> pela técnica de diluição em microplaca frente a cepa de <i>H. pylori</i>	65
Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória mínima do extrato etanólico e fração 2 incorporados em uma microemulsão das frente a cepa de <i>H. pylori</i>	65

Lista de Abreviaturas e siglas

a.C- antes de Cristo
A/O- Água em Óleo
AMH- Ágar Muller Hinton
AS- Ágar Sangue
CBM- Concentração Bactericida Mínima
CC- Cromatografia em Coluna
CCD- Cromatografia em Camada Delgada
CIM- Concentração Inibitória Mínima
CLAE-DAD- Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector de arranjos de diodos
CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH- Caldo Muller Hinton
DRGE- Doença de Refluxo Gastroesofágico
EFS- Extração em Fase Sólida
F/A- Fase aquosa
F/O- Fase oleosa
FN- Fase Normal
IL- Interleucina
INCA- Instituto Nacional do Câncer
MALT- Tecido Linfóide associado a Mucosa
ME- Microemulsão
MS- Ministério da Saúde
O/A- Óleo em água
OMS- Organização Mundial da Saúde
PBPs- Proteínas Receptoras de Penicilina
PNPIC- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
SF- Subfração
SFB- Soro Fetal Bovino
SFs- Subfrações
SUS- Sistema Único de Saúde
T- Tensoativo
UFC- Unidade Formadora de Colônia
XTT-2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido.

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	DOENÇAS INFECCIOSAS	17
1.2	<i>HELICOBACTER PYLORI</i>	18
1.2.1	Aspectos gerais.....	18
1.2.2	Principais patologias relacionadas a presença do <i>H. pylori</i>	23
1.2.3	Principais tratamentos utilizados na erradicação do <i>Helicobacter pylori</i>	26
1.3	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	27
1.4	<i>FAMÍLIA SALICACEAE</i>	30
1.4.1	<i>Casearia sylvestris</i> Swartz.....	31
1.5	NANOTECNOLOGIA: BUSCA DE NOVOS ANTIMICROBIANOS.....	34
1.5.1	Microemulsão (ME).....	36
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	GERAL.....	39
2.2	ESPECÍFICOS.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	MATERIAL.....	41
3.2	EQUIPAMENTOS.....	41
3.3	MATERIAL VEGETAL E SEUS DERIVADOS	42
3.3.1	Obtenção do Material vegetal.....	42
3.3.2	Desenvolvimento do extrato aquoso	43
3.3.2.1	<i>Extrato aquoso 1</i>	43
3.3.2.2	<i>Extrato aquoso 2</i>	43
3.3.3	Extrato etanólico	44
3.3.3.1	<i>Fracionamento do extrato etanólico por extração em fase sólida (EFS)</i> ...44	
3.3.3.2	<i>Fracionamento da fração mais ativa por Cromatografia em Coluna (CC) em fase normal (FN)</i>	45
3.3.4	<i>Análises cromatográficas dos derivados vegetais de C. sylvestris</i>	46
3.3.4.1	<i>Cromatografia de camada delgada (CCD)</i>	46
3.3.4.2	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE - DAD)</i>	46
3.3.4.3	<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	46
3.3.4.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas</i> 47	
3.4	PREPARAÇÃO DO SISTEMA LIPÍDICO NANOESTRUTURADO.....	47

3.4.1	Incorporação dos derivados vegetais nos sistemas nanoestruturados	48
3.5	ANÁLISES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	48
3.5.1	Cepa bacteriana.....	48
3.5.2	Padronização da suspensão bacteriana.....	48
3.5.3	Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)	49
3.5.3.1	<i>Leitura com revelador</i>	50
3.5.4	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	51
3.5.5	Ensaio de Biofilme	51
3.5.5.1	<i>Padronização do Inóculo bacteriano</i>	51
3.5.5.2	<i>Pré-adesão</i>	51
3.5.5.3	<i>Formação do Biofilme</i>	51
3.5.5.4	<i>Revelação</i>	52
3.5.5.5	<i>Interpretação dos resultados</i>	53
3.5.6	Cinética de crescimento.....	53
3.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	54
3.6.1	Animais	54
3.6.2	Determinação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori in vivo</i>	54
3.6.2.1	<i>Determinação da produção de urease</i>	56
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4	RESULTADOS	57
4.1	MATERIAL VEGETAL E SEUS DERIVADOS	57
4.1.1	Obtenção do Material Vegetal	57
4.1.2	Desenvolvimento do extrato aquoso 1 e 2	57
4.1.3	Extrato etanólico	57
4.1.4	Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i> por extração em fase sólida (EFS).....	57
4.1.5	Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato etanólico	58
4.1.6	Fracionamento da fração da EFS mais ativa por CC em fase normal e análises cromatográficas por CCD e CLAE -DAD	59
4.1.7	Ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM).....	61
4.2	ANÁLISES BIOLÓGICAS.....	63
4.2.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	63
4.2.2	Determinação da Concentração bactericida mínima (CBM)	66

4.2.3	Ensaio de Biofilme	66
4.2.4	Cinética de crescimento.....	68
4.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VIVO.....	71
4.3.1	Determinação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori in vivo</i>	71
5.	DISCUSSÃO	73
	REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS INFECCIOSAS

Doença infecciosa é aquela onde o patógeno invade o hospedeiro suscetível (homem ou animal) e efetua pelo menos uma parte do seu ciclo de vida dentro do hospedeiro, resultando em uma doença (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Essas são conhecidas a milênios, antes mesmo da descoberta dos agentes infecciosos causadores. Informações históricas, bem como o sequenciamento do genoma microbiano e construções filogenéticas deixam claro que as doenças infecciosas têm sido emergentes e reemergentes, e que estas são movidas por inúmeros fatores tais como adaptação e mudanças genéticas e doenças polimicrobianas. Cerca de 20 a 40 por cento das novas infecções humanas são originadas em humanos, adaptados geneticamente, adquirindo uma transmissão elevada e ou características patogênicas (MORENS; FAUCI, 2013; 2016).

As doenças infecciosas vêm sendo um problema de saúde pública, associadas com alta morbidade e mortalidade (FAUCI; MORENS, 2012). Os diversos contatos com os patógenos, a evolução rápida e constante desses em resposta a mutação, resistência aos antibióticos, bem como intervenções médicas complicam o controle dessas doenças (LEVENTHAL *et al.*, 2015).

Micro-organismos patogênicos e ou oportunistas como bactérias, parasitas, fungos e vírus são os causadores de diversas doenças infecciosas, transmitidas diretamente ou indiretamente de pessoa pra pessoa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Mesmo com os recentes avanços no desenvolvimento da terapêutica, tais como diagnósticos mais precisos e vacinas, cerca de nove milhões de pessoas morrem por ano no mundo de doenças infecciosas (MORENS; FAUCI, 2013). Em países menos desenvolvidos de baixa renda e escolaridade, as mortes por doenças infecciosas incluindo as manifestações procedentes de infecções respiratórias, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doenças diarreicas, malária, tuberculose e infecções gástricas, são mais frequentes e responsáveis por quase um terço dos óbitos (ABAT *et al.*, 2016; MORENS; FAUCI, 2016).

As infecções gástricas atualmente são motivo de preocupação para áreas como a microbiologia, gastroenterologia e principalmente a oncologia, uma vez que frequentemente a presença da bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está diretamente relacionada com quadros clínicos severos de infecção, podendo evoluir para o desenvolvimento do câncer gástrico (BONIFÁCIO *et al.*, 2014; CAMARGO, *et al.*, 2014; HAJIMAHMOODI *et al.*, 2011; PROCTOR; DEANS, 2014).

1.2 HELICOBACTER PYLORI

1.2.1 Aspectos gerais

H. pylori representado na Figura 1 é uma bactéria bacilo Gram – negativo, fastidioso, heterotrófico e microaerófilo, não esporulado, espiralada em forma de S, com parede celular externa lisa, cuja extensão varia de 0,5 a 1 µm de largura e 2,5 a 5 µm de comprimento, uma membrana plasmática externa e outra interna separadas por um espaço periplasmático e de 5 a 7 flagelos revestidos partindo de um único polo e com bulbo terminais em suas extremidades distais. Inicialmente foi classificada como do gênero *Campylobacter*, recebendo a nomenclatura de *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori*. Entretanto após análises da sequência de ácidos nucleicos e estudos ultraestruturais, essa nomenclatura foi modificada, sendo agora pertencente ao gênero *Helicobacter*. O nome “pylori” da espécie foi pelo fato de esta ser encontrada normalmente na parte do antro gástrico, próxima ao piloro (COSTA, *et al.*, 2009).

O gênero *Helicobacter* é composto de mais de 20 espécies que podem ser encontrados na mucosa gástrica e ou intestinal (O'TOOLE; LANE; PORWOLLIK, 2000). Na mucosa gástrica podemos observar as espécies: *H. pylori*, *H. nemestrinae*, *H. acinonyx*, *H. mustalae*, *H. felis* e *H. heilmanni*. Dentre todas essas espécies, a que é a mais importante do ponto de vista da medicina humana é o *H. pylori*.

Figura 1 - *Helicobacter pylori*



Fonte: Sociedade Catarinense de Gastrologia, 2016.

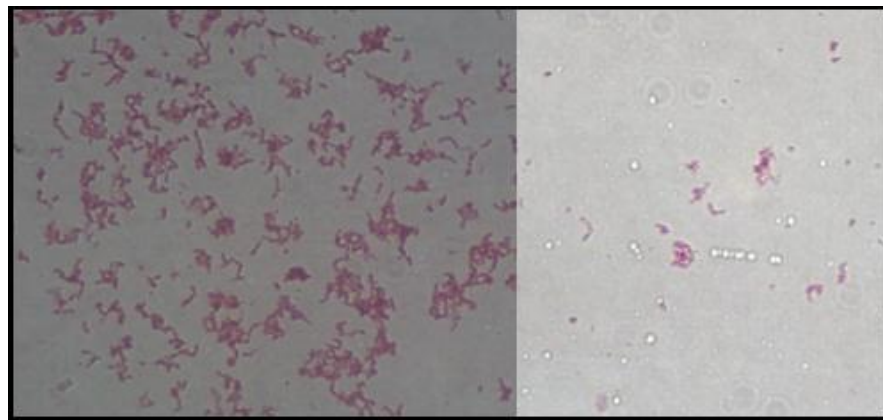
H. pylori foi isolada pela primeira vez por Barry Marshall e J. Robin Warren em 1983 a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica (MARSHALL; WARREN, 1984; SIQUEIRA *et al.*, 2007; WARREN, 1983). Seu isolamento e descoberta da relação com a úlcera gástrica rendeu a estes pesquisadores, no ano de 2005, o prêmio Nobel de fisiologia e medicina (NOBELPRIZE.ORG, 2014).

O *H. pylori* esta presente na mucosa gástrica de forma comensal, sendo o antro gástrico o local preferencial para a colonização. Entretanto, em situações de desequilíbrio da homeostase do hospedeiro, este pode assumir um perfil virulento. Sua forma helicoidal favorece a movimentação impulsionada pelos flagelos, causando um rompimento na proteção da mucosa estomacal, que em associação com a liberação de citocinas e ao processo inflamatório crônico contribui diretamente na destruição da célula gástrica levando a evolução de doenças tais como gastrite crônica, úlcera péptica, tecido linfóide associado à mucosa (MALT) e câncer gástrico, classificada como carcinógeno de classe I pela Organização Mundial da Saúde (DANDLEN *et al.*, 2011; FIORENTINO *et al.*, 2013; HAJIMAHMOODI *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2007).

A presença do *H. pylori* demonstrou ser determinante etiológicamente nas infecções gástricas mais comuns em todo o mundo, sendo que este infecta cerca de

metade da população geral. Na maioria dos casos é adquirido na infância e, quando não tratado, pode persistir até a vida adulta. Entretanto, apenas uma pequena parte de indivíduos infectados desenvolve a neoplasia, e o risco da doença envolve a interação entre o patógeno e o hospedeiro. Neste sentido o *H. pylori* tem vários fatores de virulência e propriedades que facilitam sua adaptação no ambiente estomacal (HAJIMAHMOODI *et al.*, 2011). A Figura 2 representa um esfregaço obtido a partir da cultura de *H. pylori*.

Figura 2 – Microfotografia do *H.pylori*

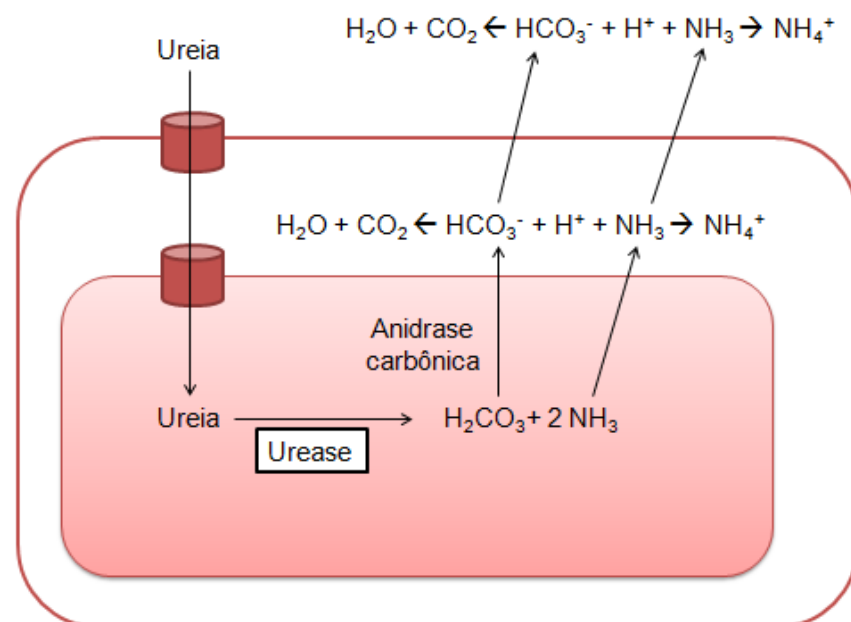


As principais propriedades ligadas ao *H. pylori* que facilitam a colonização e são considerados como os principais fatores de virulência são: sua motilidade, a produção de urease, citotoxina vacuolizante, ilhas de patogenicidade no DNA (cagPAI – *cag pathogenicity island*) e capacidade de formar biofilme.

A sobrevivência em meio ácido é de extrema importância, já que seu habitat usual é a mucosa gástrica. A enzima urease garante que isso aconteça, promovendo a hidrólise da ureia presente em condições fisiológicas no suco gástrico. Através dessa hidrólise, ocorre a produção de amônia e ácido carbônico que atuam como receptor de íons H^+ e na produção de íons bicarbonato, respectivamente, gerando pH neutro no meio intracelular e no entorno do micro-organismo (Figura 3). Aproximadamente 6% do total de proteínas sintetizadas pela bactéria são da enzima urease, o que representa grande investimento energético motivado pela sua ação essencial como fator de colonização. Além disso, a

presença de pH ácido promove um aumento de mais de duas vezes na atividade de genes relacionados a produção de urease (AYALA; ESCOBEDO-HINOJOSA; de la CRUZ-HERRERA; ROMERO, 2014; SCOTT *et al.*, 2007). A urease e a amônia promovem desestabilização da camada de muco e conseqüentemente levam a formação de lesões sobre as células de revestimento. Além disso, a urease também pode estar envolvida na ativação de neutrófilos, monócitos e do sistema imune, gerando uma lesão inflamatória local (BONIFÁCIO *et al.*, 2014; LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; MOBLEY; MENDZ; HAZELL, 2001).

Figura 3 - Mecanismo do controle do pH interno e externo pela urease no *H. pylori*



A forma espiralada e os flagelos da *H. pylori* facilitam a sua movimentação e aderência ao epitélio gástrico, permitindo assim penetração na mucosa e sobrevivência do organismo no estômago humano (PARREIRA *et al.*, 2014).

O genoma do *H. pylori* tem alta plasticidade. As variações genômicas das cepas de *H. pylori* podem ser responsáveis pela codificação de diferentes fatores de virulência, capazes de determinar diversos tipos de lesão no hospedeiro. O gene *cagA* está localizado na parte final de 40 kb DNA, nomeado de ilha de patogenicidade (PAI). A presença da PAI aumenta a patogenicidade desta bactéria;

sendo classificado em cag^+ ou cag^- , que codifica uma citotoxina que atua como antígeno de superfície imunodominante da *H. pylori*. A ilha *cag*-PAI é um componente do genoma do *H. pylori* que contém genes homólogos aos de outras bactérias que codificam componentes do sistema de secreção, que atua como agulha e serve para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira. As cepas $cagA^+$ tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como as interleucinas (IL-1b e IL-8). O tipo I expressa $cagA^+$ associada a citotoxina *vacA*, enquanto que o tipo II não expressa *cagA* associada ao *vacA*, a qual possui a capacidade de induzir grandes vacúolos citoplasmáticos em células eucarióticas, os quais podem levar a morte celular (BELTRÁN-ANAYA *et al.*, 2014; BONIFÁCIO, *et al.*, 2014; FALSAFI; MAHBOUBI, 2013; PROCTOR; DEANS, 2014).

O *H. pylori* interage estreitamente com as células epiteliais, isto causa uma variedade de respostas, através de interações moleculares distintas. A liberação de citocinas é uma destas, sendo capazes de ativar as células inflamatórias. O sistema de secreção tipo IV (T4SS) transfere a oncoproteína *cagA* no citoplasma da célula hospedeira, onde se torna fosforilada e influencia diversos processos celulares distintos. Esse é o contato direto do T4SS com a membrana da célula epitelial, entretanto, acredita-se ser o principal responsável pela indução da secreção de IL-8 e outras respostas imunes do hospedeiro. A integrina epitelial $\alpha 5\beta 1$ tem sido implicada como um dos receptores do hospedeiro para essa atividade. A expressão dessas integrinas, entretanto, é limitada às membranas basolaterais. Em um modelo *in vitro* de monocamada de células epiteliais com integridade de junção estreita e função de barreira mensurável iria facilitar o estudo das interações celulares *H. pylori*-hospedeiro e, permitir exames detalhados dos eventos moleculares que ocorrem apical e basolateralmente durante a infecção pelo patógeno (FIORENTINO *et al.*, 2013).

Outro fator de extrema importância é a citotoxina vacuolizante (*VacA*), que tem o papel de induzir a formação de vacúolos em células epiteliais gástricas, todas as cepas de *H. pylori* possuem o gene *vacA*, todavia, há uma variação considerável entre as linhagens, na atividade vacuolizante da toxina, podendo ser um fator

determinante nas variações das doenças entre pacientes infectados por *H. pylori*. (UBERTI, 2014; WU; XU; ZHU, 2013).

O gene VacA contém duas regiões que são responsáveis pela variáveis, a *s* e a *m*. As diferentes combinações dessas (*s* e *m*) determina a produção e a especificidade da atividade da citotoxina, sendo responsável pela patogenicidade bacteriana (MOURA, 2015).

Embora haja uma forte correlação entre a atividade da citotoxina vacuolizante e a presença de *cagA*, os dois genes, *cagA* e *vacA*, localizam-se em loci distintos no genoma do *H. pylori* e mutações de *cagA* que resultem na perda da expressão da proteína CagA, não afetará a produção da toxina, sugerindo que a expressão das duas proteínas seja independente (MOURA, 2015).

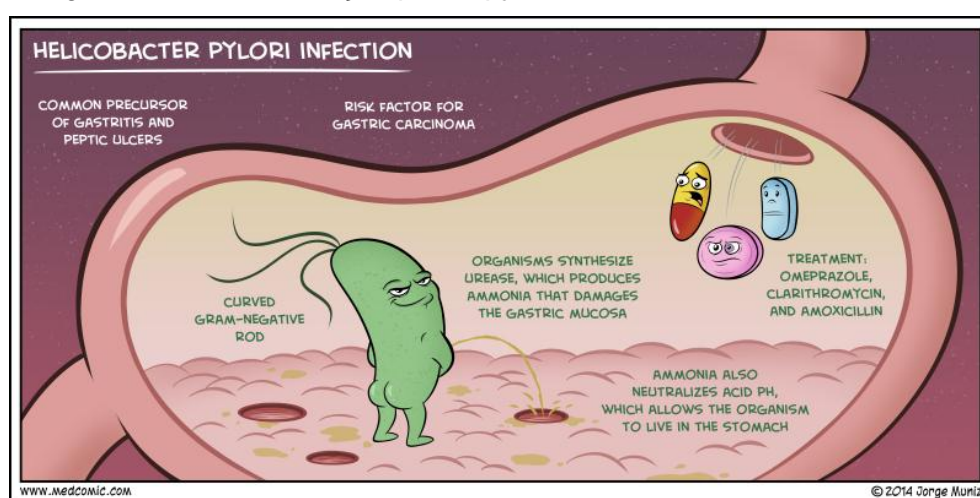
A capacidade dos micro-organismos em formar biofilmes também tem sido considerada um fator de virulência muito importante. Os biofilmes microbianos são sistemas biológicos formados por comunidades homogêneas ou heterogêneas (diversidade de espécies, ex. bactérias e fungos vivendo em simbiose) de células microbianas agregadas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas produzidas pelas próprias células, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas. Além disso, algumas propriedades importantes devem ser consideradas, como a taxa de crescimento microbiano alterada e o fato de que os microrganismos em biofilme transcrevem genes com padrão diferenciado daqueles observado em células planctônicas, dificultando muitas vezes os tratamentos (BJARNSHOLT, 2013; BURMØLLE *et al.*, 2014).

O real mecanismo que garanta o entendimento completo sobre a formação de biofilmes ainda é desconhecido e será tema de investigação na área científica por muitos anos. O que se sabe é que sua composição e os mecanismos envolvidos estão diretamente ligados ao índice de resistência e virulência por parte dos micro-organismos.

1.2.2 Principais patologias relacionadas a presença do *H. pylori*

Já se sabe que a colonização por *H. pylori* pode evoluir para patologias sérias como gastrite crônica ativa, úlcera péptica, atrofia gástrica e linfoma de MALT. Além disso, sua presença é considerada o principal fator causador de adenocarcinoma gástrico (PARREIRA *et al.*, 2014). Por apresentar perfil de sobrevivência em ambientes ácidos, a bactéria mantém-se íntegra em ambiente estomacal, promovendo a destruição da mucosa gástrica e tornando o órgão sensível e vulnerável ao desencadeamento de lesões ulcerativas (Figura 4).

Figura 4 – Fotografia ilustrando infecção por *H. pylori*



Fonte: Peron, 2016.

A infecção por *H. pylori* é a causa mais frequente de gastrite, sendo o curso típico de infecção em pacientes, a qual afeta dois terços da população mundial. Parte desses pacientes tem grandes chances de desenvolver gastrite crônica, úlcera péptica e carcinomas (FERNANDES, 2016).

A *H. pylori* quando em gastrite na fase aguda, consegue induzir hipocloridria (inibidor de secreção ácida) logo no início da infecção, isto facilita a colonização inicial e ativa as vias pró-inflamatórias, colonizando preferencialmente o antro gástrico, esta quando não tratada adequadamente pode evoluir pra gastrite crônica (BARBOSA; SCHINONNI, 2011; FERNANDES, 2016).

Na gastrite crônica, o *H. pylori* abrange parte do corpo gástrico também, além do antro. Um dos tipos de gastrite é a atrófica multifocal, que é de natureza autoimune (anticorpos atacam o revestimento mucoso do estômago) provocando o

seu estreitamento e perda de muitas células produtoras de ácido e de enzimas (BONIFÁCIO, *et al.*, 2014).

A gastrite atrófica geralmente pode provocar anemia nos indivíduos, pois ela interfere na absorção da vitamina B12 presente nos alimentos. Os sintomas da gastrite no geral são: dores abdominais, perda do apetite, queimação, sensação de saciedade náuseas, podendo levar a vômitos e sangramento digestivo também. Devido a deficiência na absorção de nutrientes e vitaminas muitas vezes ocorrem episódios de fraqueza e diarreia (BONIFÁCIO, *et al.*, 2014; DAS *et al.*, 2016).

A síndrome dispéptica, ou dispepsia funcional é caracterizada como um problema atual comum e universal, sendo uma manifestação de diferentes doenças, mas principalmente das doenças pépticas, ou seja, das doenças determinadas pela disfunção cloridropéptica: a doença de refluxo gastresofágico (DRGE) e a úlcera péptica gastroduodenal. Embora ocorra em menor intensidade, a infecção por *H. pylori* encontra-se diretamente ligada no desenvolvimento desta patologia, sendo observada significativa diminuição ou total eliminação da mesma quando o paciente é submetido ao tratamento medicamentoso no combate a bactéria (BONIFÁCIO, *et al.*, 2014)

Diante de todas as doenças relacionadas com o *H. pylori* há uma atenção maior ao câncer gástrico. Classificado como quarto no ranking mundial de neoplasias, este tipo de patologia encontra-se diretamente relacionado ao progresso da ação maligna do micro-organismo aliado a pré-disposições genéticas (BONIFÁCIO, *et al.*, 2014).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2016), a incidência de câncer do estômago é mais prevalente em homens, com idade média de 70 anos, sendo cerca de 65% dos pacientes diagnosticados com mais de 50 anos. No Brasil, esses tumores aparecem em terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto, entre as mulheres.

Um estudo feito por Antunes *et al.*, 2010, mostrou que a infecção por *H. pylori* é tida como o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico no mundo. Esses avanços ainda não foram suficientes para levarem ao declínio e a diminuição da taxa de prevalência do micro-organismo no hospedeiro. Com prevalência mundial calculada entre 50 e 90%, este tipo de neoplasia é mais comum

em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, tendo uma menor taxa nos Estados Unidos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016). Em países como a China, que apresentam altas taxas de incidência para *H. pylori*, nota-se um intenso paralelismo com o câncer gástrico (ARAÚJO JÚNIOR, *et al.*, 2011).

O câncer gástrico está relacionado com a presença de *H. pylori* com perfil positivo para o gene *CagA*⁺, no entanto, outros fatores também devem ser considerados como a alimentação e o polimorfismo genético, que possivelmente tem uma relação direta com o desencadeamento e intensidade da mesma, sendo que a combinação dos polimorfismos das citocinas pró-inflamatórias e a infecção oriundas de cepas com perfil elevado de virulência, condicionam ambiente para o processo de desenvolvimento de carcinogênese maligna (ARGENT *et al.*, 2004).

O estômago é considerado o reservatório principal da bactéria no homem, todavia, atualmente a cavidade bucal vem chamando a atenção, já que a halitose esta associada com a presença do *H. pylori*, devido a diminuição do fluxo salivar ou pela presença da doença periodontal, sendo possível o isolamento do *H. pylori* no biofilme dental, saliva e sulco gengival (DAS *et al.*, 2016; SILVA; TEREZAN; FISCHER, 2012).

1.2.3 Principais tratamentos utilizados na erradicação do *Helicobacter pylori*

A descoberta de *H. pylori* e o seu papel nas doenças gastrointestinais levou a um avanço na terapêutica utilizada para a erradicação desta bactéria. Os principais tratamentos consistem na terapia tripla e na quadrupla.

A terapia tripla considerada de primeira linha consiste de um inibidor da bomba de prótons como o omeprazol, que agem por meio da inibição da atividade das H⁺,K⁺ ATPases, as quais são essenciais para a produção ácida no estômago; e a combinação de dois antibióticos, normalmente a amoxicilina seguida de claritromicina. A amoxicilina é um antibiótico β-lactâmico, que se caracterizam por apresentar um anel beta-lactâmico essencial para a sua atividade antibacteriana. São antibióticos bactericidas, que inibem a síntese da parede celular através da interrupção do processo de transpeptidação. Esse mecanismo baseia-se na união de beta-lactâmicos a receptores específicos localizados na superfície interior da

membrana celular bacteriana, denominados “proteínas receptoras de penicilina” (PBPs). As PBPs possuem um papel chave nas fases finais da síntese de peptidoglicanos. Para a sua atuação, os beta-lactâmicos devem primeiramente penetrar na parede celular bacteriana (MACEDO *et al.*, 2005). A claritromicina é um antibiótico da família dos macrolídeos, os quais são agentes bacteriostáticos, que atuam pela ligação com o RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, interferindo na elongação da cadeia peptídica durante a tradução e bloqueando a biossíntese de proteínas bacterianas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Todavia como uma alternativa atualmente também pode ser utilizada a terapia quadrupla, de segunda linha, que consiste na adição de um fármaco que contém bismuto (age por meio da diminuição da acidez estomacal, além de inibir a secreção enzimática de *H. pylori*) ou na troca da claritromicina pela levofloxacina (antibiótico que age por meio da inibição da enzima girase, importante na replicação do DNA), a qual também pode ser nomeada como uma terapia de resgate, levando a uma diminuição das doenças relacionadas a esta bactéria e na prevalência da infecção no mundo. (BONIFÁCIO, *et al.*, 2014; DAS *et al.*, 2016).

Entretanto, o sucesso destes tratamentos está agora comprometido devido as imensa taxas de resistência antimicrobiana do patógeno a esses antibióticos, tornando se um motivo de preocupação mundial (MÉGRAUD; BESSÈDE; LEHOURS, 2014; PROCTOR; DEANS, 2014).

Além do mais, a terapêutica convencional é de alto custo, toxicidade elevada, interações medicamentosas indesejáveis, biodisponibilidade insuficiente do fármaco, aspectos estes que levam ao abandono do tratamento juntamente com as baixas taxas de cura que são de 50 a 70% e principalmente pela decorrência de efeitos colaterais ou até mesmo pela recidiva da infecção (DAS *et al.*, 2016; SARDI *et al.*, 2013).

1.3 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

A biodiversidade compõe um dos bens naturais mais importantes e valiosos do mundo, sendo o Brasil um país privilegiado, de grandeza litorânea, flora e dono da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta. Isso nos coloca entre os três

países de maior diversidade biológica do mundo, afinal, 20% das espécies conhecidas do mundo são encontradas aqui (HENRIQUE *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2002).

As plantas medicinais foram, durante muito tempo, o único e principal recurso terapêutico no tratamento de enfermidades. Entretanto devido a modernização no meio técnico-científico, e propagandas e incentivos das indústrias farmacêuticas gradativamente os medicamentos alopáticos industrializados foram tomando a frente e sendo introduzidos no cotidiano da população, principalmente em países desenvolvidos (BADKE *et al.*, 2011). Entretanto, diversos países ainda utilizam de plantas medicinais e fitoterápicos em grande parte da população.

A fitoterapia é conhecida a muitos anos, sendo ela uma prática antiga, conhecida por volta de 1.500 a.C. Etimologicamente, vem das palavras gregas *phyton* (plantas) e *therapeia* (tratamento), sendo assim, o uso de plantas e ou suas partes, com o intuito de prevenir, aliviar ou curar doenças. Os medicamentos fitoterápicos são os produtos obtidos de matérias-primas ativas vegetais, exceto substâncias isoladas, com finalidade de profilática, curativa ou paliativa, podendo ser simples, que é quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BETTEGA *et al.*, 2011; BRASIL, RESOLUÇÃO RDC N° 26, 2014).

A partir de 1980, houve um crescimento no interesse das indústrias médica e farmacêutica pelos fármacos de fontes naturais e extratos vegetais. Isto levou ao um aumento expressivo de novas pesquisas, que tem mostrado eficácia desses compostos para tratamento de diversas doenças, sendo capazes de fornecer fármacos dificilmente obtidos por síntese química, possíveis de modificação, tendendo a terem menor potencial tóxico, mais eficaz e efeitos semelhantes aos fármacos sintéticos (BETTEGA *et al.*, 2011). Segundo dados da Organização mundial da Saúde (OMS) 80% da população mundial utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária a saúde, e desse total, 85% usa plantas medicinais ou preparações destas (SOUZA; LIMA; VALE, 2015).

As indústrias farmacêuticas faturam cerca de 25% a partir da venda de derivados de plantas medicinais, observando-se um aumento substancial a cada ano (FERREIRA, *et al.*, 2014). Sendo assim, a fim de garantir à população o acesso

seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, diversos países criaram seus próprios regulamentos. No Brasil, os critérios sociais, médicos, antropológicos, econômicos e botânicos são coordenados pela Comissão de Seleção de Plantas, contendo todos os parâmetros necessários para o desenvolvimento de pesquisas e para normatização dos medicamentos fitoterápicos para implementação no Sistema Único de Saúde (SUS), com o intuito de implementar o uso destes medicamentos na rede de saúde pública brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O crescente interesse em produtos de fontes naturais possibilitou o surgimento de diversas estratégias tecnológicas que variam desde o *screening* biológico, isolamento, até as triagens clínicas, métodos considerados essenciais na descoberta de valores terapêuticos de uma ampla variedade de plantas (BONIFÁCIO, 2014). Diversos podem ser os potenciais terapêuticos apresentados por determinados extratos vegetais, destacando-se a atividade antimicrobiana contra uma série de agentes infecciosos (BONIFÁCIO, 2014; DIAZ *et al.*, 2010).

Durante séculos uma ampla variedade de plantas e substâncias derivadas de fontes alternativas vem sendo utilizadas no tratamento de doenças gastrointestinais. Neste contexto, há dados que demonstram expressivos resultados obtidos por meio de extratos vegetais e óleos essenciais frente ao *H. pylori* (COGO *et al.*, 2010). Isto se deve à presença de compostos bioativos dentre os quais se destacam os, flavonoides, as chalconas e os terpenos.

Dados da literatura mostram que os flavonoides e as chalconas contribuem para a atividade anti-*H. pylori* de derivados vegetais inibindo a enzima urease, a qual é secretada pela bactéria durante a infecção para garantir sua sobrevivência no pH ácido do estômago. Outros pesquisadores mostraram que a neutralização da VacA e a interferência com o receptor de sinalização *tool* 4 (TLR4), também podem ter outros mecanismos pelos quais esses compostos inibem a colonização desta bactéria (BONIFÁCIO, *et al.*, 2014; CUSHNIE; LAMB, 2011). Outra possibilidade é de que estes podem ter uma atividade direta contra o microrganismos, ou até mesmo haver um sinergismo destes com os antibióticos utilizados na terapia convencional (BONIFÁCIO, *et al.*, 2014).

No entanto, é preciso uma investigação fitoquímica para a afirmação destas descobertas, pois, nem sempre o conhecimento popular sobre o uso de plantas se relaciona com curas reais, tendo algumas vezes efeito placebo ou até mesmo tóxicos. Apesar dos efeitos benéficos das plantas, devemos levar em consideração a sua ação tóxica, visto que há uma linha tênue entre a dosagem terapêutica e a tóxica. Todavia, quando usado de forma correta, o princípio ativo de uma planta medicinal pode curar e/ou melhorar um desequilíbrio fisiológico no organismo (RAMOS, 2015).

No Brasil, a criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), instituída pela Portaria no Ministério da Saúde (MS) nº 971, de 03 de maio de 2006, permitiu que os usuários do SUS tivessem maior facilidade no acesso as opções terapêuticas, garantindo o acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, de forma segura, eficaz e com qualidade, e dessa maneira possibilitando a integralidade da atenção à saúde (BADKE *et al.*, 2011).

O Ministério da Saúde selecionou 71 plantas medicinais para pesquisa por serem consideradas plantas de interesse do SUS. A escolha foi baseada nas doenças que mais afetam a saúde da população, tais como as doenças crônicas: úlceras, diabetes, inflamações, artrites e hipertensão. Dentre os produtos naturais desta lista, esta espécie vegetal *Casearia*.

1.4 FAMÍLIA SALICACEAE

Numerosas são as famílias de plantas com representação medicinal, dentre elas, destaca-se a Flacourtiaceae. Todavia essa família, de acordo com o sistema filogenético de classificação mais recente, não existe mais, tendo seus representantes sido incluídos em duas outras famílias já existentes: Salicaceae e Achariaceae (THADEO *et al.*, 2009).

Diversas espécies com representação medicinal são pertencentes a família Salicaceae. Membros dessa família são encontrados em diferentes localizações do globo, pelos mais diversos biomas do mundo. É composta por 43 gêneros e aproximadamente 1300 espécies. No Brasil, podem ser encontrados 19 gêneros e

cerca de 80 espécies. Esta é conhecida pela presença de salicilatos, que são glicosídeos fenólicos. Suas principais substâncias demonstradas por estudos químicos de espécies de Salicaceae são: salicina, salicortina, 2'-cinamoilsalicortina, salicina di-glicosilada, salicilol, 2'-O-acetilsalicina, 2'-O-acetilsalicortina e m-hidroxibenzil- β -D-glicosídeo. Dentre os salicilatos, destaca-se o ácido salicílico, precursor químico do ácido acetilsalicílico, importante anti-inflamatório (FERNANDES, *et al.*, 2009).

Foram descritas diversas atividades farmacológicas para estas substâncias, destacando-se de anti-inflamatória, antioxidante e analgésica (FERNANDES, *et al.*, 2009).

1.4.1 *Casearia sylvestris* Swartz

Casearia sylvestris Swartz possui diversos nomes populares como guaçatonga, erva-de-bugre e café-bravo (CLAUDINO *et al.*, 2013), sendo pertencente à família Salicaceae. Seu gênero *Casearia* possui quase 180 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e temperadas, muito encontrada em todo território da América do sul, ocorrendo em 22 estados do Brasil, especialmente dentro da Mata Atlântica brasileira, da floresta Amazônica e nos biomas do Cerrado e em alguns outros países como México, Argentina e Uruguai (FERREIRA, *et al.*, 2011).

Figura 5 - Fotografia da *Casearia sylvestris* do horto de plantas medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

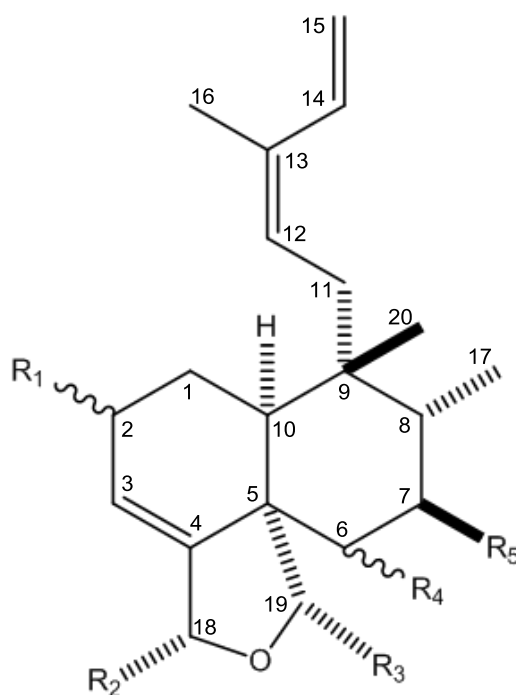


C. sylvestris possui em média 4-6 m de altura com tronco de 20-30 cm de diâmetro (Figura 5). As folhas (6-12 cm de comprimento por 3-5 cm de largura) caracterizam-se por serem glabras ou ásperas, assimétricas, serradas, pecioladas, alternas, brilhantes, com glândulas visíveis por transparência em todo o limbo. As flores são numerosas, pequenas, actinomorfas, esverdeadas, hipóginas e diclamídeas. A época que floresce é de junho a agosto (CARVALHO, 2015; TININIS, *et al.*, 2006). Esta espécie vegetal é usada por diferentes comunidades indígenas principalmente na forma de extrato aquoso, tanto no Brasil como na América Latina (FERREIRA, *et al.*, 2011). Popularmente é utilizada no tratamento de mordidas de cobra e cicatrização de feridas, sendo empregada também como medicamento antisséptico e no tratamento de úlceras e gastrites (TRECCO *et al.*, 2014).

Além de compostos fenólicos (flavonoides e derivados do ácido gálico) e dos sesquiterpenos componentes do óleo essencial já identificados em folhas de *C. sylvestris*, foram isolados mais de 30 diterpenos clerodânicos (Figura 6), 28 dos quais típicos de *Casearia*, incluindo as casearinas A-X e a caseargrewiina F, isoladas de folhas. A estrutura destes diterpenos cis-clerodânicos é formada por um sistema decalínico (anéis A e B) com metilas em C8 (C17) e C9 (C20), uma ligação

dupla em C3, uma cadeia lateral em C9 (C11-C16) com um dieno conjugado terminal, um terceiro anel (C) di-hidrofurânico/diacetálico formado a partir de C18 e C19, além de substituintes oxigenados (funções éster, éter, álcool ou cetona) presentes nos carbonos 2, 6, 7, 18 e 19 (FERREIRA, *et al.*, 2011; SANTOS, *et al.*, 2010).

Figura 6 - Estrutura química geral de diterpenos clerodânicos da *C. sylvestris*. R₁ a R₅ são substituintes oxigenados, tais como ésteres, éteres e hidroxilas.



Diterpenos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Casearina A	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina B	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina C	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₉ H ₁₉ CO ₂
Casearina D	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina E	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina F	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina G	OH (α)	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina H	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina I	OH (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina J	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂

Casearina K	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina L	OCH ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
Casearina M	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	OH
Casearina N	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina O	OCH ₃ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina P	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂
Casearina Q	OH (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina R	=O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina S	OCH ₃ (α)	=O	CH ₃ CO ₂	H	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina T	OCH ₃ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂ (β)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina U	OCH ₃ (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina V	OH (α)	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	OH (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina X	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	n-C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina A	(CH ₃) ₂ CHCO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina B	CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Casearvestrina C	n-C ₅ H ₁₁ CO ₂ (β)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H
Caseargrewiina F	n-C ₃ H ₇ CO ₂ (α)	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	OH (α)	H

Estudos mostram que o extrato etanólico de suas folhas apresenta atividades farmacológicas relacionadas com potenciais anti-inflamatórios, cicatrizante, citotóxica em linhagens de células tumorais, antiofídico e principalmente no tratamento de úlceras gástricas relacionadas com o desenvolvimento do câncer (CARVALHO; SANTOS; CAVALHEIRO, 2009).

Atualmente esta planta esta sendo utilizada como matéria-prima em diversos estudos e fonte de inspirações na busca de novos fármacos. De acordo com o ministério da saúde a *C. sylvestris* está entre as 71 plantas medicinais de interesse ao SUS. (ARAÚJO, *et al.*, 2014).

1.5 NANOTECNOLOGIA: BUSCA DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

Atualmente a nanotecnologia está entre os maiores avanços, sendo esta uma das principais atividades de pesquisa e desenvolvimento em diversos países. Em termos gerais a nanotecnologia é o desenvolvimento, a obtenção e a caracterização de sistemas (RAJ *et al.*, 2012).

As aplicações da nanotecnologia em várias áreas, especificamente na área de saúde, está cada vez mais comum e intensa. Principalmente com a elevada toxicidade, problemas de absorção, degradação, meia vida curta e diversos efeitos adversos dos fármacos utilizados (NEGRI, 2015; RAJ *et al.*, 2012).

Sendo assim, a busca por novas alternativas que sanem esses problemas é intensa e tem despertado grande interesse de pesquisadores. Nessa direção a liberação controlada de drogas é um campo intrigante, já que a liberação destes em seu local de ação terapêutica específico é uma das limitações das indústrias de biotecnologia e farmacêutica, visando maximizar a atividade do fármaco e reduzir os efeitos adversos (RAJ *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos científicos vêm demonstrando os benefícios da nanotecnologia na terapêutica, um dos alvos tem sido o tratamento do câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurológicas (DIMER *et al.*, 2013).

Os produtos naturais veem apresentando expressivo potencial biológico em diversos testes *in vitro*, no entanto muitas vezes quando testados em *in vivo* não correspondem a atividade *in vitro*, tendo pouca ou nenhuma atividade. Fato este se da devido ao tamanho das moléculas e ou sua baixa solubilidade lipídica, não ocorrendo uma absorção desejada (KESARWANI; GUPTA, 2013).

Deste modo, bases nanotecnológicas, tais como sistemas de liberação de fármacos, vêm demonstrando melhorar a biodisponibilidade de extrato vegetais, estabilidade, potencializar a atividade farmacológica entre outros (SAINI *et al.*, 2014).

Novos veículos estão sendo desenvolvidos e utilizados não somente para aumentar a seletividade e eficácia de princípios ativos, como, também, permitindo a redução da dose total necessária (diminuição de efeitos adversos e tóxicos) e proporcionando uma ação prolongada e direta em determinados órgãos do organismo (NEGRI, 2015).

As vantagens proporcionadas pela utilização dos sistemas nanoestruturados são tantas, que quando em conjunto com as propriedades dos produtos naturais estão sendo favoráveis no tratamento de doenças, chamando a atenção da sociedade científica, aumentando os estudos relacionados (BIDONE *et al.*, 2014; RAJENDRAN *et al.*, 2013).

O tratamento das doenças gastrointestinais não tem sido efetivos, isto devido ao fato de que estes estão causando muitos efeitos adversos, degradação em pH ácido, baixa solubilidade, resultando em biodisponibilidade limitada. A fim de melhorar tais fatos, os sistemas nanoestruturados vêm sendo utilizados com sucesso (PLAPIED *et al.*, 2011).

As diferentes bases nanotecnológicas utilizadas como sistema de liberação de fármacos, tais como: lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, cristal líquido, nanomicelas, nanopartículas metálicas (nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata e nanopartículas de óxido de ferro) e microemulsões, é uma interessante abordagem para melhorar as propriedades mais desejáveis de uma formulação. Além disso, as nanométricas partículas representam um futuro onde a atividade é assegurada e os problemas associados aos tratamentos de doenças podem ser superados (SILVA, *et al.*, 2016).

1.5.1 Microemulsão (ME)

O termo microemulsão foi descrita na década de 1940 por Hoar e Schulman quando eles perceberam que uma emulsão turva e instável podia ser convertida em um líquido opticamente transparente e termodinamicamente estável por adição de um álcool como hexanol ou pentanol. No entanto, somente depois do ano de 1959 que as ME foram definidas como sendo transparente, de baixa viscosidade, opticamente isotrópicos, termodinamicamente estáveis, composta normalmente por uma mistura lipídica + água, estabilizados por um filme interfacial de emulsificantes. Através de microscopia eletrônica, pesquisadores observaram que as dispersões transparentes formadas eram constituídas de microglóbulos de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), cercados por um filme interfacial de emulsificantes e ou co-emulsificantes. (DAMASCENO *et al.*, 2011; GODOY *et al.*, 2003; SANTOS, 2015).

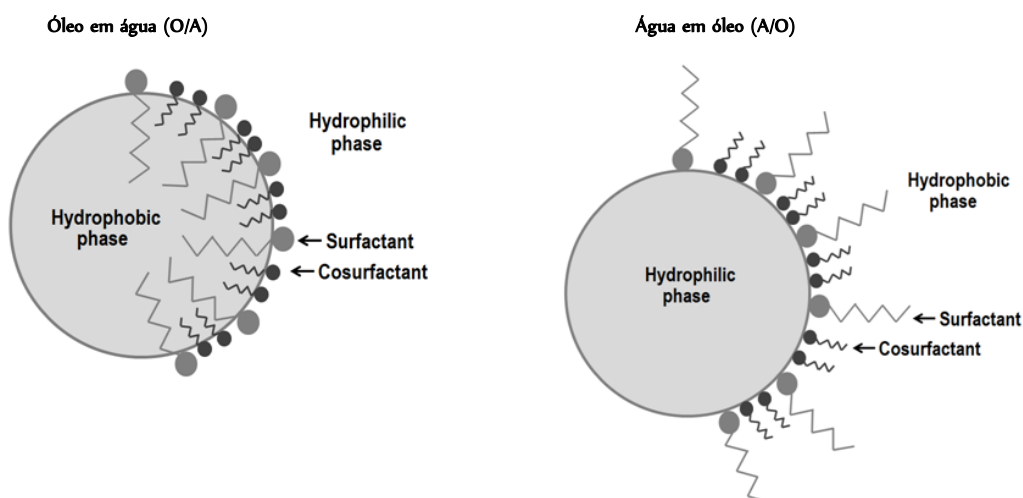
Uma ME usualmente está relacionada à combinação de três a cinco compostos, sendo esses: emulsificantes, fase oleosa, fase aquosa, e muitas vezes co-emulsificantes. Todavia, isto depende do equilíbrio entre as propriedades do emulsificante (hidrofílicas e lipofílicas), que esta relacionada com a estrutura

química, entretanto fatores como temperatura, força iônica e a presença de emulsificantes também são importantes (FORMARIZ *et al.*, 2005).

A estabilidade termodinâmica das ME são vantajosas sobre as dispersões instáveis, permanecendo um longo período estáveis. Outras vantagens também são sua ótima capacidade de solubilização devido aos emulsificantes juntamente com as gotículas de óleo e água e a melhora na biodisponibilidade de fármacos devido a facilidade de incorporação de compostos (OLIVEIRA, *et al.*, 2004).

Dentre os tipos de microemulsões existentes os mais facilmente encontrados são a de óleo em água (O/A), onde um óleo é solubilizado em uma solução aquosa contendo um emulsificante; a de água em óleo (A/O), onde uma solução não aquosa de um emulsificante é solubilizada em água; e a contínua, que são sistemas que tem uma transição contínua entre a solução aquosa e solução não aquosa (Figura 7) (SILVA, *et al.*, 2015).

Figura 7 - Microemulsões: O/A e A/O



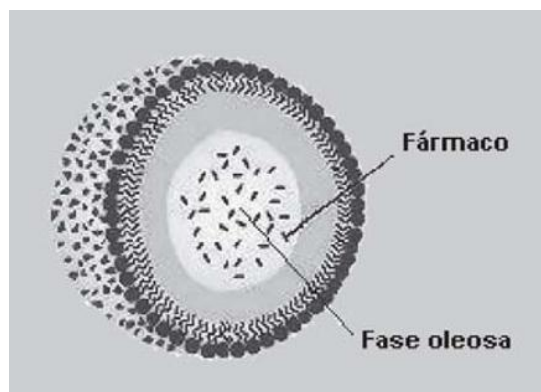
Fonte: Silva, *et al.*, 2014

Estudos descritos na literatura mostram o aumento no interesse em microemulsões por sua utilização em sistema de liberação de fármaco (Figura 8), sendo esses sistemas reservatórios o qual permitem que o fármaco seja liberado lentamente, fazendo com que não atinja uma concentração plasmática maior que a

necessária, proporcionando efeito prolongado. As ME O/A são muito utilizadas como sistemas de liberação de fármacos, pois ela solubiliza uma grande quantidade de fármacos lipossolúveis na sua fase oleosa (hidrofóbica), desta maneira estes tem expressivo potencial de aplicação terapêutica na utilização para fármacos lipossolúveis. Sendo muito vantajosa a utilização como sistema de liberação de medicamentos (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Estas vantagens estão relacionadas à melhora na solubilização de fármacos lipofílicos, possibilitando o uso parenteral fator esse que permite a homogeneização sem o uso de energia facilitando a produção em larga escala. De acordo com estudos experimentais, há a melhora na absorção oral também, devido ao aumento da área superficial fazendo com que haja um contato maior das gotículas que os fármacos foram incorporados com o trato gastrointestinal (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Figura 8 – Fármaco incorporado em uma ME óleo em água



Fonte: FORMARIZ *et al.*, 2005

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* de derivados vegetais das folhas de *C. sylvestris* quimicamente caracterizados, incluindo extratos e suas frações, não incorporados e incorporados em um sistema lipídico nanoestruturado frente a cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori*.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolvimento e obtenção de dois extratos aquosos e do extrato etanólico das folhas de *Casearia sylvestris*;
- ✓ Fracionamento bioguiado do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* e subfracionamento da fração mais ativa;
- ✓ Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro*, dos extratos aquosos, extrato etanólico, das suas frações e de quatro subfrações da fração com maior potencial das folhas de *Casearia sylvestris* frente a cepa de *H. pylori* ATCC 43504;
- ✓ Incorporar os derivados vegetais que deram melhor atividade anti- *H. pylori* em um sistema nanoestruturado;
- ✓ Avaliar a atividade anti- *H. pylori in vitro* dos derivados vegetais incorporados;
- ✓ Avaliar a influência dos compostos com melhores atividades não incorporados e incorporados sobre o biofilme formado por *H. pylori*;

- ✓ Avaliar a cinética de crescimento *H. pylori* frente aos derivados vegetais com melhor potencial anti- *H.pylori*;

- ✓ Determinação da atividade anti- *H. pylori in vivo* a partir dos derivados vegetais com maior potencial anti- *H. pylori in vitro* não incorporado e incorporado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Agar Müeller Hinton + 5% de sangue de carneiro (AS) - Biomérieux®

Amoxicilina - Sigma-Aldrich®

Caldo Müeller-Hinton (CMH) - Difco®

Cloreto de sódio - J.T.Baker®

Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) - Sigma®

Colesterol 94% - Sigma®

Dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma Aldrich®

Fosfatidilcolina de soja (FS) - Epikuron®

Fosfato de sódio dibásico - J.T.Baker®

Fosfato de sódio monobásico - Reagen®

Glicerol - Sigma-Aldrich®

Glicose - Reagen®

Hidróxido de sódio - Atena®

Polioxietileno 20 oleil éter (Brij® 98)

Resazurina - Sigma-Aldrich®

Soro fetal bovino (SFB) - Vitrocell®

3.2 EQUIPAMENTOS

Autoclave vertical - Phoenix®

Balança analítica - Shimadzu®

Banho-maria 100 - Fanem®

Banho termostatizado: Tecnal®, modelo TE- 184

Bomba de vácuo - Millipore®

Câmara de fluxo laminar - Veco®

Câmara de Neubauer - Boeco® Germany

Centrífuga Excelsa 206BL - Fanem®

Coluna cromatográfica de bancada: colunas de vidro com d.i de 1,4;2,0;5,0 e 10cm;

Equipadas com torneira teflon com d.i de 1,4; 2,0; 5,0 e 10cm.

Coluna cromatográfica para CLAE: Hypersil Gold[®] C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm); Phenomenex[®] Luna C-18 (150 x 21,20 mm x 5 µm, 100 Å); Phenomenex[®] Luna C-18 (250 x 21,20 mm x 10 µm, 100 Å); Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm x 7 µm, Zorbax)

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Perkin Elmer[®] Flexar[®], modo analítico): bomba quartanária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne[®] de 6 porticos com loop de 20µL, detector UV/VIS de comprimento variavel, detector - DAD, programa gerenciador de cromatógrafo e de dados Chromera[®].

Espectrofotômetro de microplacas Epoch - Biotek[®]

Estufa incubadora com atmosfera de CO₂ (3110 Forma Series II water Jacketed CO₂ Incubator) - Thermo Electron Corporation[®]

Estufa de incubação bacteriológica - Fanem[®]

Estufa de incubação bacteriológica com CO₂ - Forma Scientific[®]

Microscópio ótico comum - Olympus CH20[®]

Peagômetro - Marconi[®]

Purificador de água destilada - Millipore[®]

Purificador de água mili-Q - Millipore[®]

Sonicador de haste Q700 - QSonica[®]

Ultrassom - Thornton[®]

Vortex mixer SA8 - Stuart[®]

Zetasizer Nano NS - Malvern Instruments[®]

3.3 MATERIAL VEGETAL E SEUS DERIVADOS

3.3.1 Obtenção do Material vegetal

Neste estudo foram utilizadas folhas de *Casearia sylvestris* Swartz coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. A exsicata do espécime coletado está depositada no Herbário Científico do Estado "Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo" do Instituto de Botânica do Governo do Estado de São Paulo, sob o número AGS 102 (21°81'46,6"

Sul, 48°20'21,5 Oeste). O material vegetal foi coletado no dia 10 de outubro de 2013 e seco em estufa com circulação de ar a 40° C por sete dias.

3.3.2 Desenvolvimento do extrato aquoso

Foram realizados dois tipos de extração aquosa para obtenção dos extratos aquosos das folhas de *C. sylvestris*. Os extratos aquosos e etanólico foram obtidos no laboratório de Farmacognosia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, UNESP – Araraquara, com supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

3.3.2.1 Extrato aquoso 1

O extrato aquoso 1 foi obtido por infusão com as folhas secas de *C. sylvestris* conforme descrito no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). Quatro gramas de folhas foram rasuradas e colocadas em um béquer no qual foram adicionados 150 mL de água deionizada fervente. Em seguida o béquer foi tampado com vidro de relógio. Após 15 min, a solução extrativa (infuso) foi filtrada em papel de filtro, resfriada e, posteriormente, liofilizada. O extrato seco obtido foi armazenado em frasco âmbar tampado e guardado a temperatura de -7°C.

3.3.2.2 Extrato aquoso 2

O extrato aquoso 2 foi obtido com as folhas secas de *C. sylvestris* pulverizadas em moinho de facas. A droga vegetal pulverizada (50 g) foi extraída em um erlenmeyer com 500 mL de água deionizada em um banho a 50 °C por 4 h. A cada 30 min esse erlenmeyer foi agitado manualmente. Após as 4 h a solução extrativa foi filtrada em papel de filtro, resfriada e liofilizada. O extrato seco obtido foi armazenado em frasco âmbar tampado e guardado a temperatura de -7°C.

3.3.3 Extrato etanólico

O extrato etanólico foi obtido com as folhas secas de *C. sylvestris* pulverizadas em moinho de facas. Obteve-se o extrato através do método de maceração com agitação ocasional à 40° C, utilizando o etanol absoluto como líquido extrator na proporção 1:5 (g/mL) em cada uma das 3 etapas de extração com duração de 24, 48 e 72 h. A solução extrativa foi filtrada em papel de filtro, concentrada em evaporador rotativo, seca por exposição ao ar em capela e, finalmente, em dessecador com sílica gel sob vácuo e, posteriormente, liofilizada (Figura 9). O extrato seco foi armazenado em frasco de vidro âmbar fechado a temperatura de -7°C.

Figura 9 - Extrato etanólico de *C. sylvestris*



3.3.3.1 Fracionamento do extrato etanólico por extração em fase sólida (EFS)

O fracionamento foi adaptado do método descrito por de Santos et al 2010, onde foram utilizados 65,0 g do extrato etanólico seco das folhas de *C. sylvestris*, que foram homogeneizados com a fase estacionária (1:1, m/m). A coluna de vidro (20 x 10 cm) foi preenchida com sílica gel (63-200 µm, 60 Å) e carvão ativo em pó (1:1, m/m) (Figura 10). A eluição foi realizada sob pressão reduzida e com 3.200 mL de cada eluente: 1) hexano: acetato de etila 95:05 (v/v) (frações F1.1 e F1.2); 2) acetato de etila (frações F2.1 e F2.2); 3) metanol (frações F3.1 e F3.2). As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em

capela e em dessecador com sílica gel sob vácuo até aferição de massa constante. (SANTOS et al., 2010).

Figura 10 - Fotografia do sistema de fracionamento por EFS do extrato etanólico.



3.3.3.2 *Fracionamento da fração mais ativa por Cromatografia em Coluna (CC) em fase normal (FN)*

Os derivados vegetais (extratos e frações) foram testados previamente de acordo com o item 3.5.3 e a fração mais ativa foi fracionada com o intuito de encontrar o composto ou os compostos responsáveis por esta atividade. 11,5 g da fração F2 (frações F2.1 e F2.2 agrupadas) foram solubilizados no eluente inicial (60,0 mL) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (20 x 7,0 cm; 40-63 μm /poro: 60 Å). A eluição ($V_{\text{eluente}} = 1600,0 \text{ mL}$) foi realizada sob pressão como segue: 1) hexano: acetato de etila: isopropanol 85:14:01 (subfrações SFs1+2 e SFs3-9); 2) 78:20,5:1,5 (subfrações SFs 10-18); 3) (76:22,4:1,6) (subfrações SFs 19-27); 4) (73:25,2:1,8) (subfrações SFs 28-36); 5) (68:29,9:2,1) (subfrações SFs 37-45); 6) (60:37,2:2,7) (subfrações SFs 46-54); 7) acetato de etila: metanol 1:1 (subfrações 55-63). Volume de coleta das subfrações foi de 180,0 mL.

3.3.4 Análises cromatográficas dos derivados vegetais de *C. sylvestris*

3.3.4.1 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Todos os derivados vegetais foram submetidos à análise por CCD. As análises pelo CCD foram realizadas em placas de vidro cobertas com sílica gel Sigma Aldrich® (20 x 20 cm, 15-40 µm, 0,25 mm), com indicador de fluorescência (254 nm); a fase móvel foi constituída de hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:02 (v/v); o volume de aplicação foi de 20 µL, o revelador utilizado foi o anisaldeído sulfúrico (110° C, 10 min); a distância de eluição (D) foi de 18 cm.

3.3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE - DAD)

Todos os derivados vegetais foram analisadas por CLAE. O preparo das amostras foi realizado utilizando EFS (10 mg de amostra; cartucho C18 Phenomenex® Strata™; 15 x 10 mm, 55 µm; eluente: 5,0 mL metanol: água 98:2) seguida de filtração em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®). As análises foram feitas utilizando o cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® dotado de desgasificador, bomba quaternária, injetor de seis pórticos Rheodyne® com alça de amostragem de 20 µL, detector de arranjo de diodos e o programa de gerenciamento do sistema cromatográfico e de aquisição e tratamento de dados *Chromera*® 4.1.0.6386. Condições de análises: coluna de Hypersil Gold® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); gradiente linear de metanol: acetonitrila: água 22:44:34 para 47:53:00 (v/v) em 42 min, mantendo isocraticamente em 47:53:00 por 5 min; vazão de 0,8 mL/min.

3.3.4.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Todas as SFs foram analisadas por RMN para identificação dos compostos presentes. Foi utilizado o espectrômetro Spectra Bruker® 7.0 T com gradiente

pulsado operando a 300 MHz para ^1H e 75MHz para ^{13}C . Como solvente foi utilizada piridina-d5.

3.3.4.4 *Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas*

As análises das amostras foram realizadas utilizando um sistema ACQUITY UPLC *H-Class* acoplado aos detectores de arranjo de diodos (do inglês, Diode Array Detector – DAD) e ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização Z-spray operando em modo positivo de análise. Um volume de 5 μL de amostra foi injetada em uma coluna Ascentis® Express C_{18} (100 x 4,6 mm, 2,7 μm o diâmetro da partícula) da Supelco. A temperatura da coluna foi de 35°C. A fase móvel consistiu de uma solução aquosa contendo 0.1% de Ácido Fórmico (solvente A) e Acetonitrila + 0.1% de Ácido Fórmico (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente de 30 a 90% de Acetonitrila a uma taxa de fluxo de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar = 3.2 kV, voltagem do cone = 40 V, temperatura da fonte Z-spray = 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N_2 = 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 600 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise Full-scan foi de 200 a 1000 unidades de massa (u). Os experimentos de espectrometria de massas sequencial foram realizados por dissociação induzida por colisão (DIC) usando argônio como gás de colisão para os íons precursores de interesse ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

3.4 PREPARAÇÃO DO SISTEMA LIPÍDICO NANOESTRUTURADO

O sistema foi preparado utilizando uma mistura de polioxietileno 20-oleil éter (Brij® 98) e fosfatidilcolina de soja (2:1) como tensoativo (T), colesterol como fase oleosa (FO) e tampão fosfato 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4 como a fase aquosa (FA), baseado no diagrama de fases realizado por (NEGRI, Kamila Maria Silveira, 2015), onde fixou as proporções do tensoativo e fase oleosa, e procede a titulação com a fase aquosa,

utilizando um sonicador de haste (Q700 da QSonica[®]) a mistura foi sonicada, com potência de 700 watts, operando de modo descontinuo, amplitude de 20%, por 20 minutos com intervalos de 59 segundos a cada 2 minutos, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação. O ponto escolhido para o presente estudo foi o 1 do diagrama que é constituído de 10 % de fase oleosa, 10 % de tensoativo e 80 % de fase aquosa.

3.4.1 Incorporação dos derivados vegetais nos sistemas nanoestruturados

Para a incorporação do extrato etanólico e a fração 2 que foram as com melhores atividades *in vitro*, adicionou-se 0,012g dos respectivos derivados em 6 mL do sistema. A mistura foi sonicada por 3 minutos, amplitude de 20% em modo descontinuo, com banho de gelo, havendo assim a incorporação no sistema na concentração de 2000 µg/mL.

3.5 ANÁLISES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

3.5.1 Cepa bacteriana

Foi utilizada a cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, da bacterioteca do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara.

3.5.2 Padronização da suspensão bacteriana

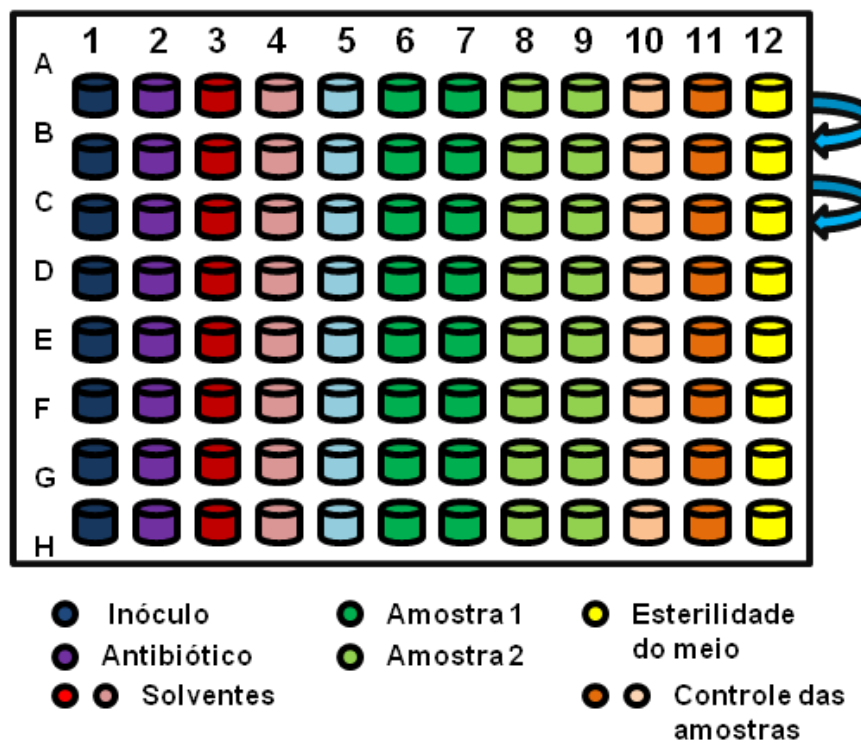
A partir de uma cultura em ágar sangue de carneiro (AS) de 72 h de incubação a 37 °C com 10 % de CO₂, colônias bacterianas foram adicionadas a Caldo Müeller Hinton (CMH) acrescido de 50 % de soro fetal bovino (SFB) até atingir-se uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala McFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica a 570 nm para confirmação da concentração bacteriana.

Posteriormente, foi realizado uma diluição 1:10 em CMH acrescido de 50 % de SFB, obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

3.5.3 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)

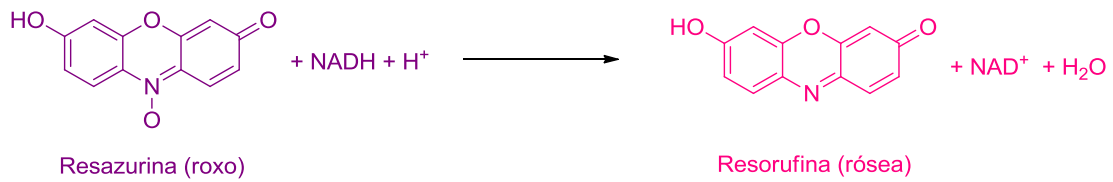
A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (Figura 11) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2006) adaptada para microrganismos fastidiosos, com modificações. Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com CMH acrescido de 50 % de SFB e foi realizada a diluição seriada do extrato vegetal, fração ou subfrações (1000 a 7,8 µg). Como controle positivo foi utilizado a amoxicilina (100 µg/mL). Também foi realizado o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extratos vegetais e o controle negativo (solventes). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 72 h sob condição de microaerofilia. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 11 - Microplaca de Microdiluição. Esquema de utilização da microplaca de 96 poços na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).



3.5.3.1 Leitura com revelador

As leituras foram realizadas com o revelador resazurina (100 µg/mL) do qual 30 µL foi adicionado em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 h a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (RAMOS, *et al.*, 2015). A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA; WEIMER; KUNZ, 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea) (Figura 12). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN *et al.*, 2000).

Figura 12- Reação de redução da resazurina

3.5.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Após a leitura espectrofotométrica, foram realizadas as determinações da CBM. Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de AS para *H. pylori*. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas sob condição de microaerofilia para *H. pylori*. Após incubação as placas foram analisadas para o crescimento ou não das bactérias.

3.5.5 Ensaio de Biofilme

3.5.5.1 Padronização do Inóculo bacteriano

O inóculo bacteriano foi obtido a partir de uma cultura de 72 horas em Agar Müeller Hinton acrescido de 5 % de sangue de carneiro na escala 4 de Mcfarland.

3.5.5.2 Pré-adesão

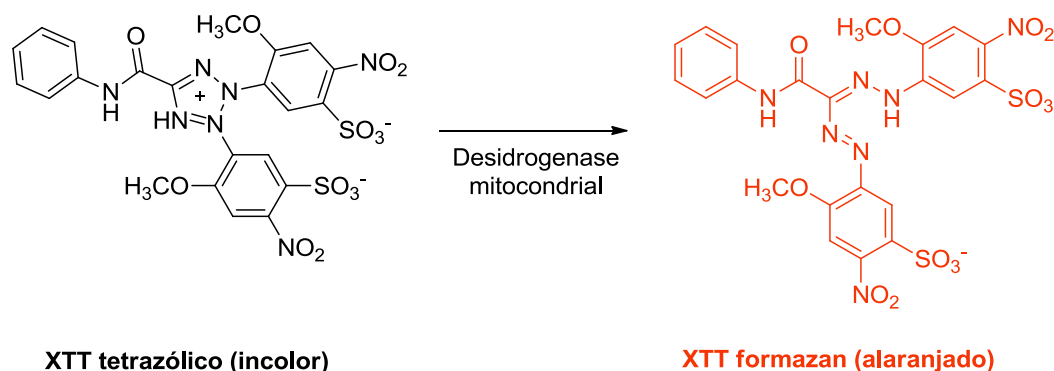
Foi depositado pérolas de vidro estéreis em todos os poços da microplaca de 96 poços, posteriormente adicionou-se 200 µL do inóculo previamente padronizado e incubado por 3 horas a 37 °C com 10 % de CO₂ e umidade.

3.5.5.3 Formação do Biofilme

Após o período de pré-adesão, foi retirado o inóculo totalmente, mantendo as pérolas e adicionou-se 200 µL de meio de cultura (50% de CMH + 50% de soro fetal bovino) incubando-se novamente por 24 horas. Após as 24 horas de incubação o meio foi retirado, os poços foram lavados com solução salina estéril e adicionou-se novamente o meio de cultura. Isso foi repetido nos tempos de 48 e 72 horas também. Posteriormente a lavagem de 72 horas, as amostras foram preparadas na concentração de 100x o CIM para a fração e de 20x o CIM para o extrato e 100 µL foi adicionado em cada poço, com mais 100 µL de meio de cultura. Foram realizados os controles de esterilidade do meio, de crescimento, com antibióticos, solventes e dos compostos avaliados. Após a adição dos compostos que foram testados e os respectivos controles a microplaca foi incubada por 24 horas a 36°C com 10 % de CO₂ e umidade (CLSI, com modificações).

3.5.5.4 Revelação

Após 24 horas de incubação dos compostos testados, todo o conteúdo da microplaca foi retirado (mantendo a pérola), lavado com salina estéril (0,9%) e adicionou-se 100µL de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT) (Figura 13) e incubou-se por 3 horas nas mesmas condições anteriormente ditas. Este teste parte do princípio de que quando o XTT entra em contato com as células vivas é reduzido por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas o que gera o desenvolvimento da coloração laranja, característica da substância (RAMOS, 2015).

Figura 13 - Reação de redução do XTT

3.5.5.5 Interpretação dos resultados

Os poços laranja mostram viabilidade das células e os que não ficaram laranja mostram não viabilidade celular. O 100 % da viabilidade celular é calculado pelos poços controle de crescimento, com isso é possível utilizar uma regra de três para encontrar a viabilidade dos poços testados.

3.5.6 Cinética de crescimento

Para a realização do ensaio do tempo de morte, utilizamos a concentração de 2 vezes a CIM para as substâncias testadas. Inicialmente foi preparado um inóculo na escala 2 de McFarland com aproximadamente 6×10^8 UFC/mL. As substâncias nas concentrações ditas a cima foram adicionada em cada tudo preparado do inóculo e incubadas a 37 °C com 10 % de CO₂. Nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 4;8; 12; 24; horas cada suspensão foi plaqueada em Agar Müller Hinton acrescido de sangue de carneiro e incubadas por 37 °C com 10 % de CO₂ por 72 horas. Realizou-se os controles: positivo, com antibiótico e negativo. Posteriormente foram contadas as colônias e construiu-se um gráfico (SANTOS-FILHO *et al.*, 2015).

3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO*

3.6.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando de 180-200g obtidos no Biotério Central da Unesp de Botucatu – Universidade Estadual Paulista. Estes foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP em condições controladas (25°C, 12/12 h ciclo claro/escuro) com comida e água disponíveis *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA 28/2015).

3.6.2 Determinação da atividade anti-*Helicobacter pylori* *in vivo*

A atividade anti- *Helicobacter pylori* *in vivo* foi determinada por Souza *et al.*, 2009 com modificações.

Tabela 1 – Tratamentos experimento *in vivo*

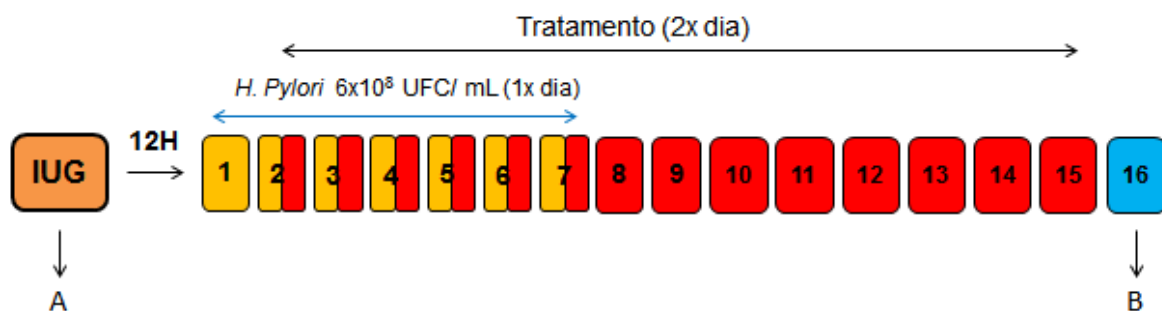
GRUPOS	TRATAMENTOS
1	Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
2	Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal);
3	Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
4	Tríade (amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg) + Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
5	Extrato de <i>C. sylvestris</i> (100 mg/kg de peso corporal) + Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
6	Extrato de <i>C. sylvestris</i> incorporado (100 mg/kg de peso corporal) + Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
7	Fração de <i>C. sylvestris</i> (100 mg/kg de peso corporal) + Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
8	Fração de <i>C. sylvestris</i> incorporado (100 mg/kg de peso corporal) + Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)

9	Base da incorporação (100 mg/kg de peso corporal) + Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
10	Óleo Vegetal (100 mg/kg de peso corporal) + Indometacina (controle positivo - 20mg/kg de peso corporal) + Suspensão de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
11	Salina 0,9 %

Os animais utilizados foram distribuídos em onze grupos aleatoriamente (n=10), conforme descrito na Tabela 1. Todos os animais foram submetidos a 12 horas de jejum, após esse período todos os grupos, exceto, o grupo salina e solução de *H. pylori* receberam indometacina (indutor de úlcera) na dose de 20 mg/Kg. Após 24 horas da indução da úlcera começou a administração da solução de *H. pylori* 6×10^8 UFC/mL uma vez ao dia (preferencialmente 9:00) exceto no grupo salina, por 7 dias seguidos. Vinte e quatro horas após iniciar a solução de *H. pylori*, os grupos começaram a receber seus devidos tratamentos. Para a realização desse ensaio foi utilizado o extrato etanólico e a fração 2 não incorporados e incorporados no sistema lipídico nanoestruturado.

Após 14 dias da administração dos tratamentos, os ratos foram eutanasiados por CO₂, tendo seus estômagos removidos, abertos ao longo da maior curvatura e lavados com solução salina como esquematizado na figura 14. Para analisar as lesões utilizou-se o programa ImageJ®.

Figura 14- Representação esquemática do ensaio *in vivo* de atividade anti – *H. pylori*



A- Indução da úlcera com Indometacina (IUG); B- sacrifício de todos os animais com retirada do estômago e confirmação de lesões ulcerativas e presença de *H. pylori*.

3.6.2.1 Determinação da produção de urease

Fragmentos do estômago foram utilizados para a determinação da atividade anti-*H. pylori* através do gel de urease que visa avaliar a presença ou ausência dessa bactéria. O fragmento de tecido gástrico foi inserido no centro de um tubo contendo gel de urease (NEWPROV[®], Pinhais - PR, Brasil) com o auxílio de uma pinça. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente e a mudança de cor foi avaliada depois de 1 h. Quando o resultado era negativo, uma leitura final foi realizada depois de 24 h. Na presença de *H. pylori* (teste positivo) há desenvolvimento de reação alcalina (coloração vermelha ou rosa forte) e na ausência (teste negativo) não há alteração de coloração do gel (amarelo ou alaranjado claro).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para determinar significância estatística, seguida pelo teste de Tukey considerando-se $p < 0,05$. Todos os testes *in vitro* foram feitos em triplicata e os resultados foram expressos em média + erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 MATERIAL VEGETAL E SEUS DERIVADOS

4.1.1 Obtenção do Material Vegetal

4.1.2 Desenvolvimento do extrato aquoso 1 e 2

Para o extrato aquoso 1 foram utilizados 4 g de folhas secas fragmentadas (droga vegetal rasurada) e obteve-se 0,4 g de extrato seco ou 10 % (m/m) de rendimento do extrato seco em relação à massa da droga vegetal. Para o extrato aquoso 2 foram utilizados 50 g de folhas secas e moídas (droga vegetal pulverizada) e obtivemos 4 g do extrato seco, com rendimento de 8 % (m/m).

4.1.3 Extrato etanólico

Para o extrato etanólico foram utilizados 1,5 kg de folhas secas e moídas (droga vegetal pulverizada) e obtivemos 200 g de massa de extrato concentrado 12% (m/m).

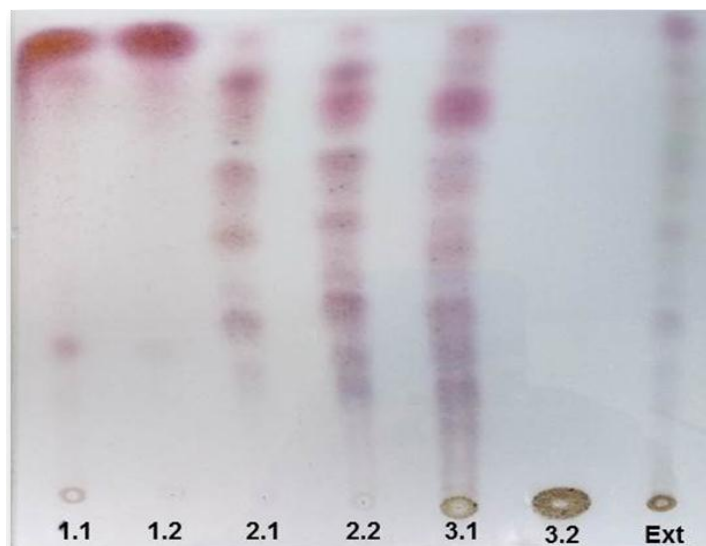
4.1.4 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* por extração em fase sólida (EFS)

O método de fracionamento utilizado para fracionar extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* foi uma adaptação de Santos (2008) e Santos et al. (2010), utilizando o método de extração em fase sólida. A massa seca obtida ao término do processo foi de: fração 1.1 = 3,56 g (5,47%), fração 1.2 = 2,96g (4,55%), fração 2.1 = 5,01g (7,70%), fração 2.2 = 7,21g (11,0%), fração 3.1 = 2,48 g (3,81%) e fração 3.2 = 3,57g (5,49%) em relação à massa inicial de amostra que foi de 65,0 g. O rendimento total da EFS foi de 38,02 % (m/m).

4.1.5 Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato etanólico

O CCD é utilizado para identificar substâncias através da comparação dos perfis cromatográficos (bandas cromatográficas das amostras e do padrão). Visto que as frações 1.1 e 1.2; 2.1, 2.2 tem perfis cromatográficos praticamente idênticos (Figura 15), foram reunidas formando fração 1 (F1.1+F1.2), fração 2 (F2.1+F2.2), já a fração 3 por não ter perfil parecido não foi reunida ficando somente 3.2. Esta análise concluiu que houve separação cromatográfica, pois as frações 1, 2 e 3.2 têm perfis químicos distintos. As frações 2 e 3.1 tem perfis químicos semelhantes, porém F3.1 tem substâncias retidas no ponto de aplicação, o que não foi observado para F2 e, por esta razão tais frações não foram reunidas. Além disso, nesta condição de análise segundo comparação com Santos (2008) é possível sugerir que as casearinas estão presentes apenas nas frações 2 e 3.1. Os extratos aquosos e etanólico e suas 3 frações foram testados para atividade anti- *H. pylori*.

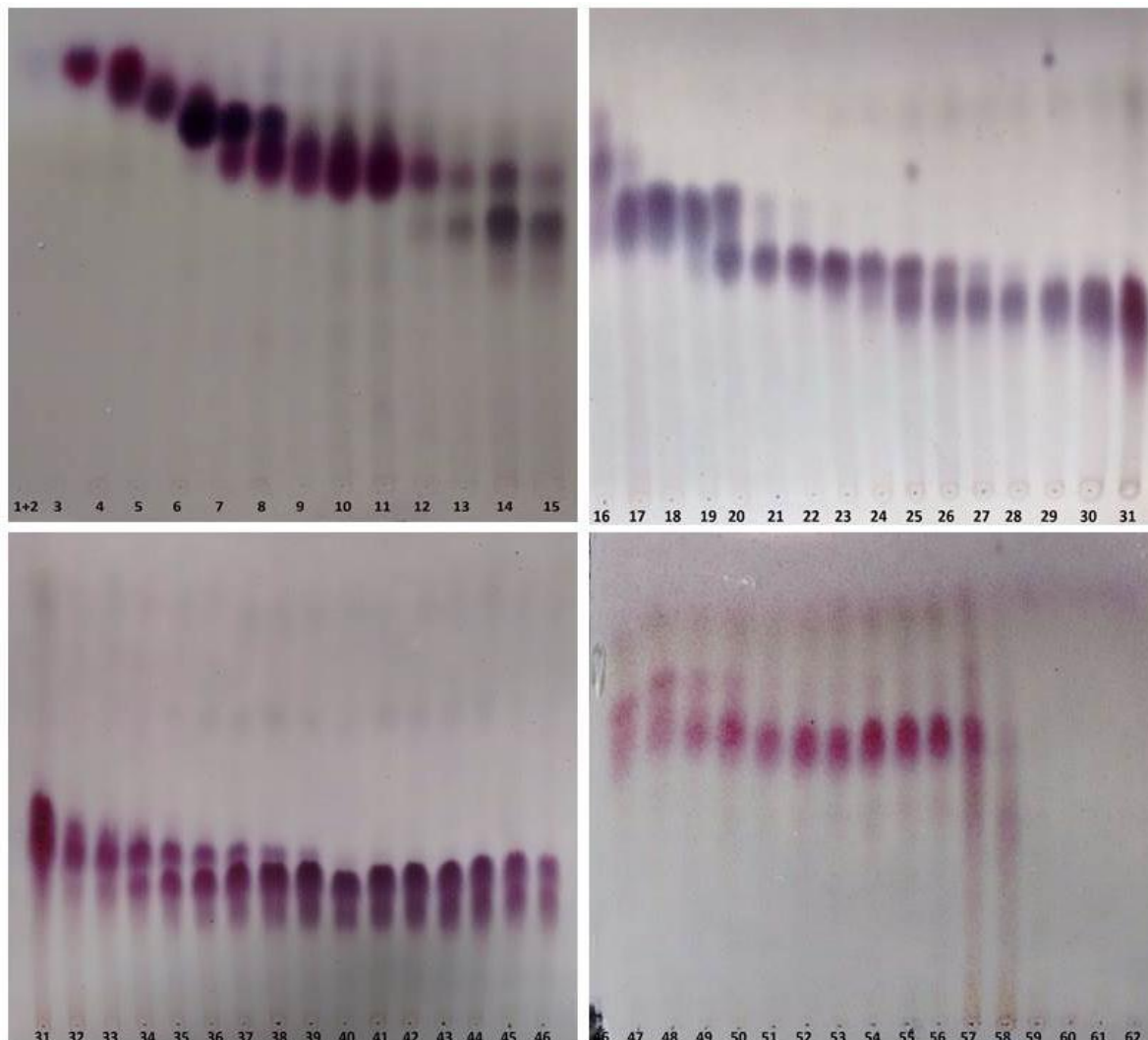
Figura 15 - Cromatoplaça obtida por CCD (sílica gel) do extrato (Ext), frações EFS F 1-3 (5,0 mg/mL em metanol) utilizando a FM composta por hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:02 (v/v). O revelador utilizado foi o anisaldeído sulfúrico, permanecendo em estufa à 110° C por 10 min.



4.1.6 Fracionamento da fração da EFS mais ativa por CC em fase normal e análises cromatográficas por CCD e CLAE -DAD

Após a realização dos testes biológicos com os extratos aquosos, etanólico e suas 3 frações, seguimos o fracionamento com a fração que teve o melhor potencial frente a cepa de *H. pylori*. Através das análises feitas por CCD, as subfrações foram agrupadas conforme a similaridade de seus perfis cromatográficos (bandas com cores e fatores de retenções iguais) (Figura 16), para serem selecionadas aquelas que estão mais purificadas e que contem massa suficiente para serem testadas.

Figura 16 - Cromatoplasmas obtidas por CCD (sílica gel) das subfrações obtidas por CC utilizando como FM: 1. hexano: acetato de etila: isopropanol. SF 1-15 (75:23:02, v/v); SF 16-46: (70:28:02, v/v); SF 46-62 (50:47:03, v/v). As frações foram solubilizadas em AcOEt (5,0 mg/mL). O revelador foi o anisaldeído sulfúrico, permanecendo em estufa à 110° C por 10 min.



A partir dos resultados dessa análise as SFs 1-2, 7-8, 9-11, 12-13, 17-19, 22-23, 25-26, 28-30, 31-33, 34-36, 37-40, 40-46, 47-50, 51-56 e 57-63 foram agrupadas. Posteriormente, as SFs foram analisadas por CLAE-DAD, confirmando os resultados das análises por CCD com relação a semelhança dos perfis químicos. Foram selecionadas 4 SFs com perfis favoráveis (menor complexidade e massa suficiente) para serem testadas.

4.1.7 Ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM)

As SFs selecionadas para os ensaios microbiológicos foram submetidas a análises por RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas (MS^2). Através dessas análises, foi possível identificar os diterpenos clerodânicos majoritários (Figuras 17 a 20) presentes em cada subfração, conforme apresentado na Tabela 2. Além disso, as casearinas O e J foram identificadas por meio de análise por CLAE-DAD utilizando padrões cromatográficos e comparando-se os t_R e espectros no UV obtidos. Estas análises espectrométricas e cromatográficas bem como a identificação dos diterpenos clerodânicos foram realizadas pelo estudante de mestrado Fernando Bombarda Oda (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) sob a orientação do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF-UNESP).

Figura 17- Cromatograma analítico da SF 13

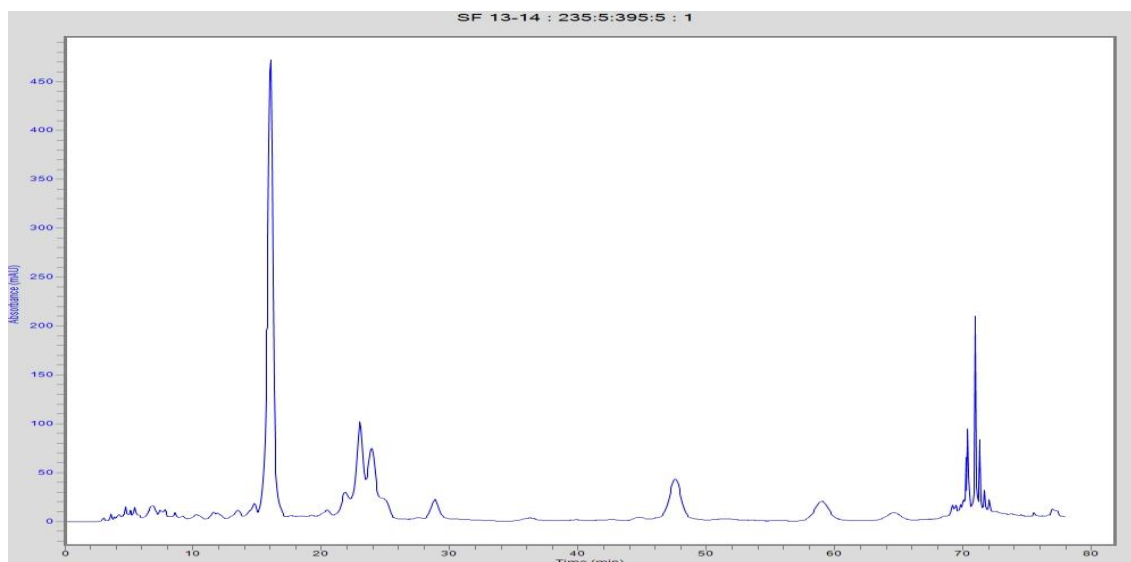


Figura 18- Cromatograma analítico SF 17

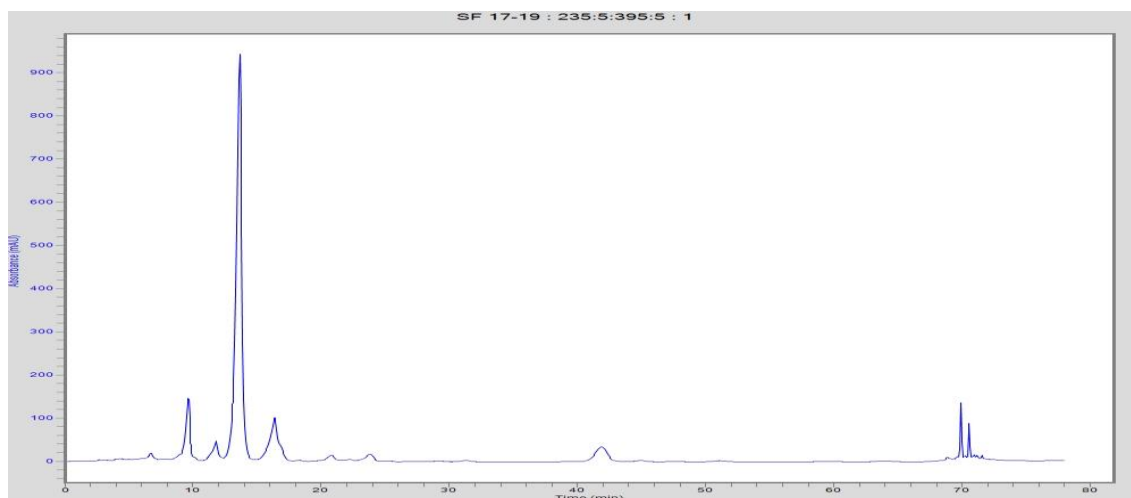


Figura 19- Cromatograma analítico SF 20

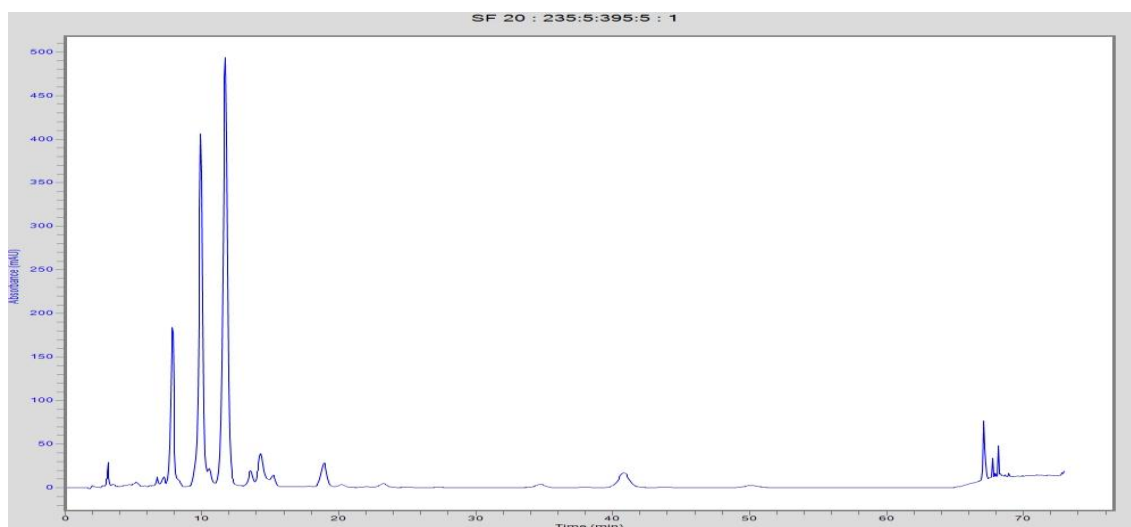
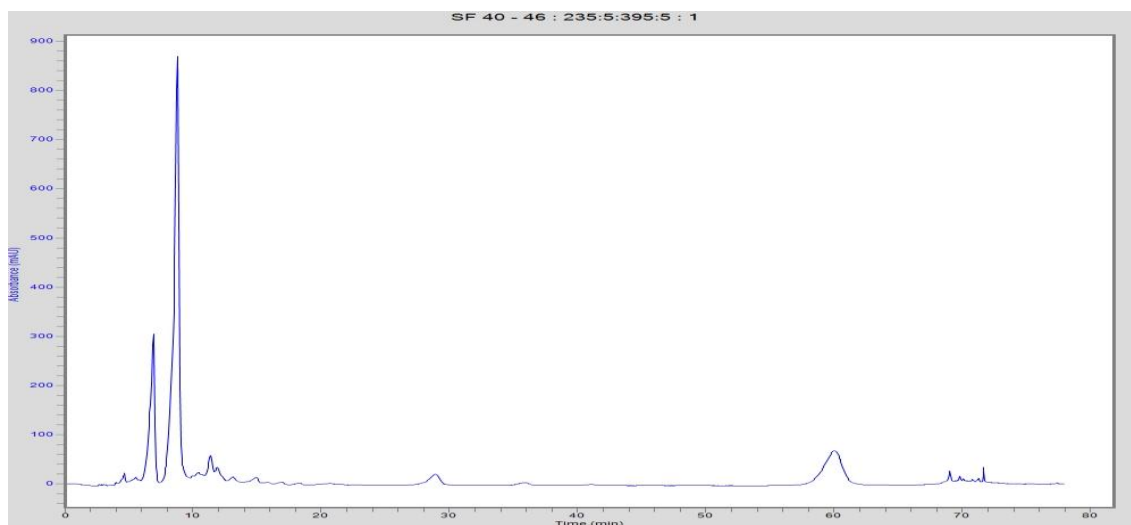


Figura 20- Cromatograma analítico SF 46**Tabela 2-** Diterpenos clerodânicos (casearinas) identificados nas subfrações da *C.sylvestris*.

Subfrações	Diterpenos clerodânicos	RMN	EM	CLAE-DAD ¹
SF 13	casearina O	sim	sim	sim
SF 17	casearina J	sim	sim	sim
SF 20	casearina B	----	sim	----
	casearina J	---	sim	sim
SF 46	casearina D, M, P, X ou I	sim	sim	----
	casearina C	sim	sim	----
	casearina H ou caseargrewiin F	sim	sim	----

Nas análises por CLAE-DAD foram utilizados os padrões cromatográficos casearinas J e O do Laboratório de Farmacognosia da FCF-UNESP.

4.2 ANÁLISES BIOLÓGICAS

4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana das amostras foi avaliada a partir da sua capacidade de inibirem o crescimento bacteriano, utilizando a técnica de microdiluição em microplaca. As amostras testadas foram os extratos aquosos 1 e 2 das folhas de *C. sylvestris*, o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, fração 1, fração 2, fração 3 e quatro subfrações da fração mais ativa selecionadas a partir das análises

cromatográficas, onde escolhemos aquelas que estavam melhor isoladas (menos picos e manchas) e que possuíam a composições químicas distintas.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos na microdiluição realizados com os derivados vegetais (extrato aquoso 1 e 2, extrato etanólico, frações e 4 subfrações selecionadas) frente a cepa *H. pylori*. Podemos observar que os extratos aquosos da folha de *C. sylvestris* 1 e 2 não apresentaram atividade menor ou igual a 1000 µg/mL, demonstrando que não são ativos frente *H. pylori* nas concentrações testadas. Todavia o extrato etanólico, a fração 2 (mais ativa) e as subfrações apresentaram atividade significativa contra o *H. pylori*. A concentração inibitória mínima do extrato etanólico foi de 1000 µg/mL, após o fracionamento obtivemos 3 frações, destas somente a fração 2 apresentou atividade, 62,5 µg/mL, as demais frações não apresentam atividade anti- *H. pylori*. Os resultados de CIM com a fração 2 nos levaram a fraciona-la com o objetivo de isolar o “composto” associado a esta atividade. Posteriormente ao fraccionando da F2, obtivemos 63 SFs que foram submetidas a análises cromatográficas, onde foram agrupadas as SFs que tinham perfil cromatográfico iguais e selecionamos aquelas que seriam mais purificadas e com maior quantidade de massa a serem testadas. Selecionamos 4 SFs favoráveis para nossos experimentos, foram as SFs 13, 17, 20 e 46. Dentre essas somente a SF 17 não apresentou atividade relevante frente ao *H. pylori* (>1000 µg/mL), as demais, SF 46 apresentou atividade de 1000 µg/MI; a SF13 atividade de 500 µg/mL e a SF 20 foi de 250 µg/mL. No entanto nenhuma das frações apresentou atividade melhor que a F 2 (62,5 µg/mL).

A partir desses resultados, onde a F 2 apresentou uma atividade destacavelmente melhor que os demais derivados vegetais da *C. sylvestris* e o extrato etanólico pela facilidade para adquirir quando comparada com os fraccionados e isolado, e também pelo uso popular, foram incorporados no sistema lipídico nanoestruturado e a concentração inibitória mínima destes compostos foi reavaliada (Tabela 4).

Tabela 3 - Determinação da Concentração Inibitória mínima dos extratos aquoso 1 e 2, extrato etanólico, frações e subfrações das folhas de *C. sylvestris* pela técnica de diluição em microplaca frente a cepa de *H. pylori*.

Material Vegetal	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato aquoso 1	>1000
Extrato aquoso 2	>1000
Extrato etanólico	1000
Fração 1	>1000
Fração 2	62,5
Fração 3	>1000
SF13	500
SF17	>1000
SF20	250
SF46	1000
Amoxicilina	15

Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória mínima do extrato etanólico e fração 2 incorporados em uma microemulsão das frente a cepa de *H. pylori*.

Material Vegetal	CIM $\mu\text{g/mL}$
Extrato etanólico Incorporado	> 1000
Fração 2 Incorporado	> 1000

Posteriormente ao teste da CIM testada com os derivados vegetais incorporados, foi observado que ambas as amostras (extrato etanólico e fração 2) não apresentaram atividade, como apresentadas antes da incorporação. Estes resultados mostram que incorporação não foi bem sucedida contra células

planctônicas, provavelmente impedindo a liberação do princípio ativo dos derivados vegetais.

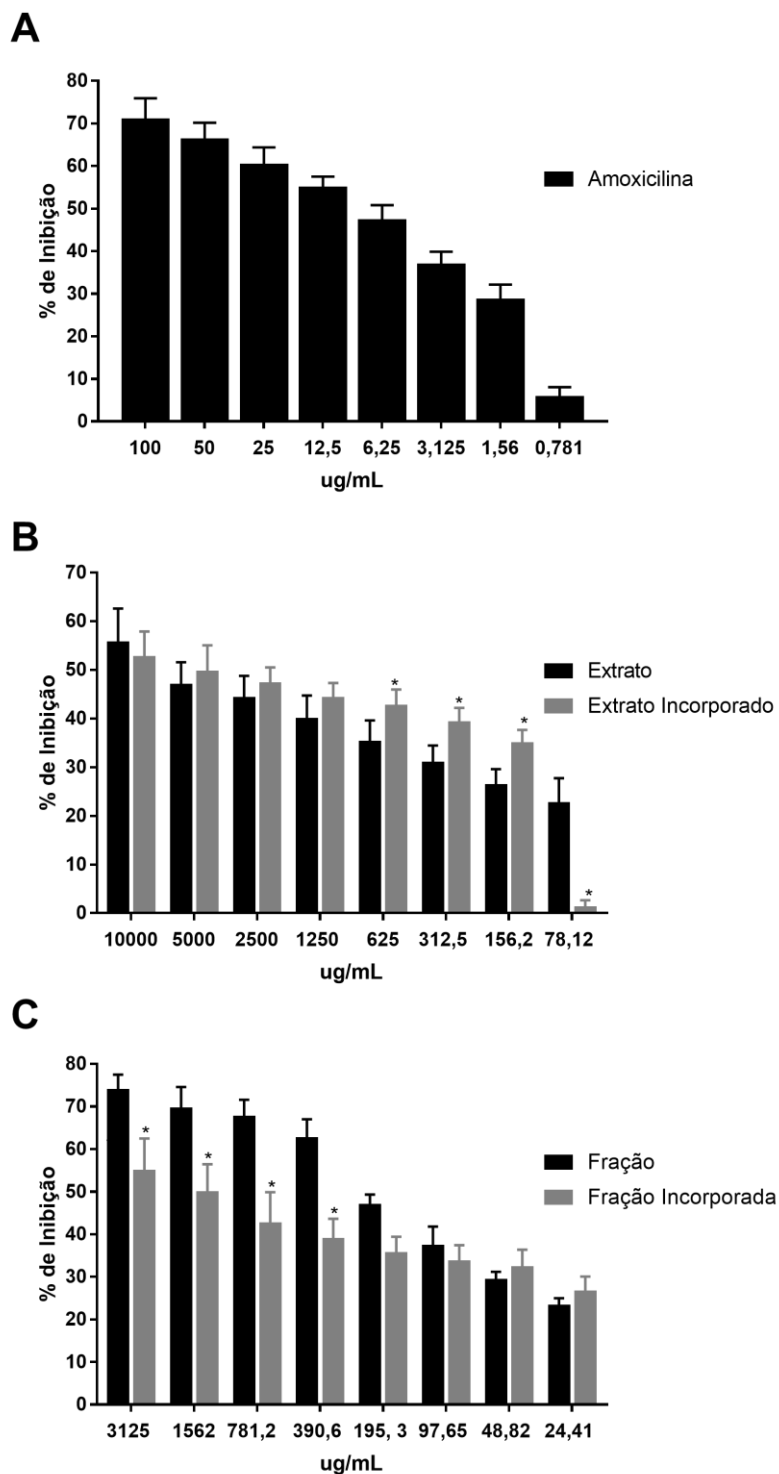
4.2.2 Determinação da Concentração bactericida mínima (CBM)

Os compostos vegetais se mostraram bacteriostáticos frente à cepa de *H. pylori*, pois após a retirada de uma alíquota de todos os poços da microplaca e passada para um meio de cultura favorável houve crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas (>1000 µg/mL), mesmo quando incorporado na microemulsão.

4.2.3 Ensaio de Biofilme

A Figura 21 apresenta os resultados do ensaio *in vitro* de inibição do biofilme frente a cepa de *H. pylori*.

Figura 21 - Atividade anti biofilme: A - amoxicilina, B - extrato etanólico não incorporado e incorporado, C- fração 2 não incorporado e incorporado em uma microemulsão.



A, porcentagem de inibição do grupo Amoxicilina em relação ao grupo controle positivo.

B, porcentagem de inibição do grupo extrato etanólico e extrato etanólico incorporado.

* $p < 0,05$ em relação ao extrato na respectiva concentração. C, porcentagem de inibição do grupo fração e fração incorporado. * $p < 0,05$ em relação a fração na respectiva concentração.

Tanto o extrato etanólico não incorporado quanto o incorporado foram capazes de inibir o biofilme formado por *H. pylori* nas concentrações testadas, com exceção do extrato incorporado na concentração de 78,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi observado que a atividade do extrato etanólico incorporado foi melhor do que o extrato não incorporado nas concentrações mais baixas (625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 312,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 156,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pois ele inibiu uma porcentagem maior nas mesmas concentrações do extrato.

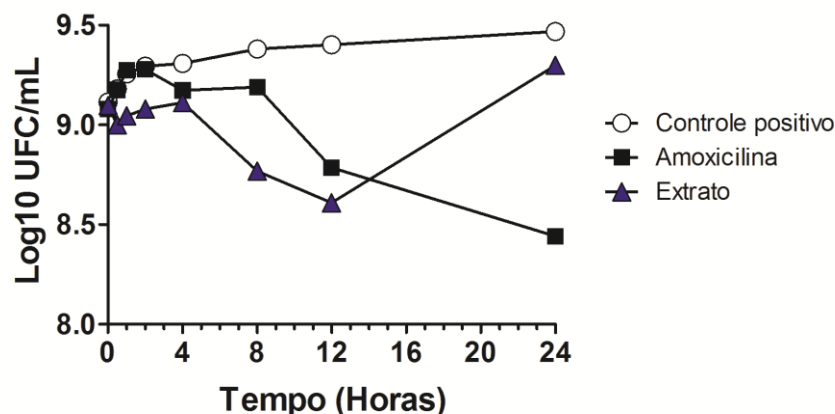
Quando observamos a fração 2 incorporado e não incorporada estas também foram eficazes contra o biofilme em todas as concentrações testadas. A fração 2 teve um maior potencial de inibição nas concentrações mais altas (até 390,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que a fração 2 quando incorporada, sendo também mais eficiente quando comparada com o extrato e o extrato incorporado, pois ela inibiu o biofilme em uma concentração menor com uma porcentagem maior.

Podemos observar que apesar dos compostos terem inibido o biofilme de *H. pylori*, nenhum dos derivados vegetais foi superior a amoxicilina, que conseguiu inibir o biofilme em uma concentração menor com uma porcentagem maior.

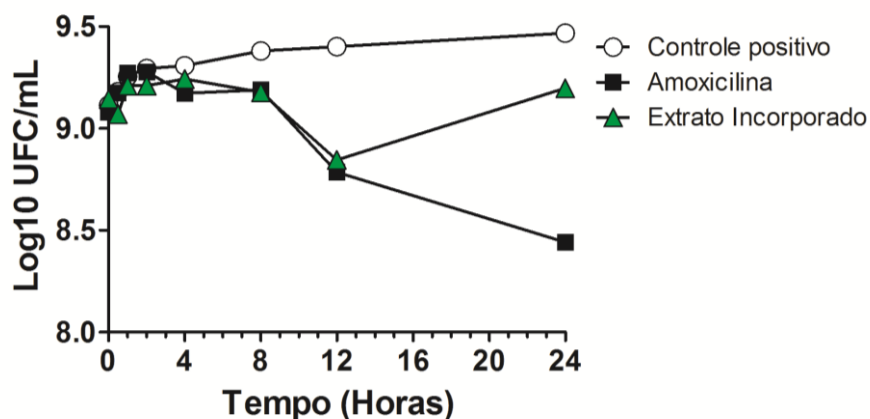
4.2.4 Cinética de crescimento

As Figuras 22 - 25 apresentam o comportamento do crescimento da cepa bacteriana em contato com o extrato vegetal e com a fração 2 não incorporados e incorporados, assim como o controle de crescimento e o fármaco amoxicilina.

Essa análise confirma os resultados anteriores de CBM, mostrando que o extrato vegetal e a fração 2 não possuem a capacidade de promover a morte do *H. pylori* nem mesmo depois de incorporados na microemulsão, promovendo apenas a diminuição de crescimento e proliferação do micro-organismo.

Figura 22- Cinética de crescimento do extrato etanólico contra *H. pylori*

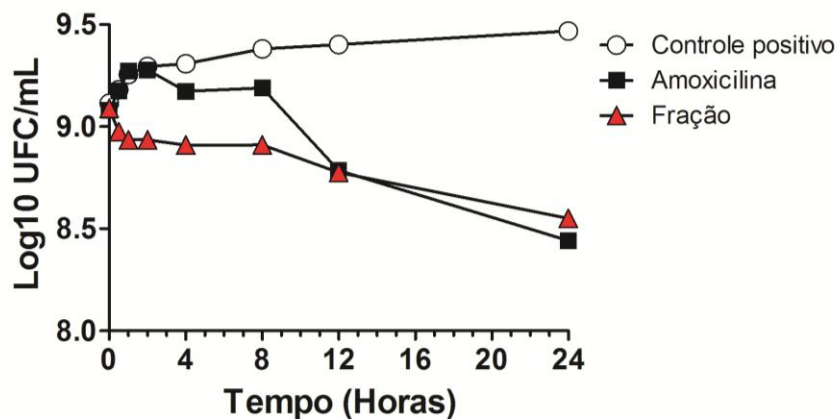
Podemos observar que o extrato etanólico (Figura 22) diminuiu a quantidade de micro-organismos a partir do tempo de 8 horas de incubação permanecendo em decrescente até o tempo de 12 horas, sendo este capaz de inibir mais que o antibiótico (amoxicilina) usado na prática clínica. No entanto no tempo de 24 horas houve um aumento, todavia, ainda assim esse crescimento foi menor que o controle de crescimento da bactéria.

Figura 23 – Cinética de crescimento do extrato etanólico incorporado contra *H. pylori*

O extrato incorporado (Figura 23) também promoveu uma inibição do micro-organismo em relação ao controle de crescimento, entretanto quando comparada com a amoxicilina a inibição foi similar. No tempo de 24 horas houve um aumento

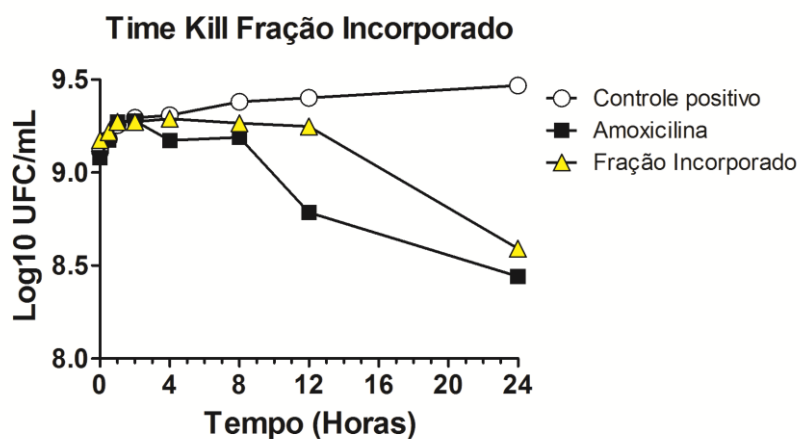
maior no crescimento do extrato incorporado em relação ao da amoxicilina, mas ainda foi menor que o controle de crescimento.

Figura 24 Cinética de crescimento da fração 2 contra *H. pylori*



Nota-se que a fração 2 (Figura 24) foi potencialmente melhor nos primeiros tempos da curva de morte quando comparada a amoxicilina, permanecendo assim até o tempo de 12 horas, após o qual apresentou a mesma atividade da amoxicilina. No entanto a fração quando incorporada (figura 25) não teve um desempenho tão bom quanto antes, reduzindo a capacidade de inibição desta.

Figura 25 - Cinética de crescimento da fração 2 incorporado contra *H. pylori*

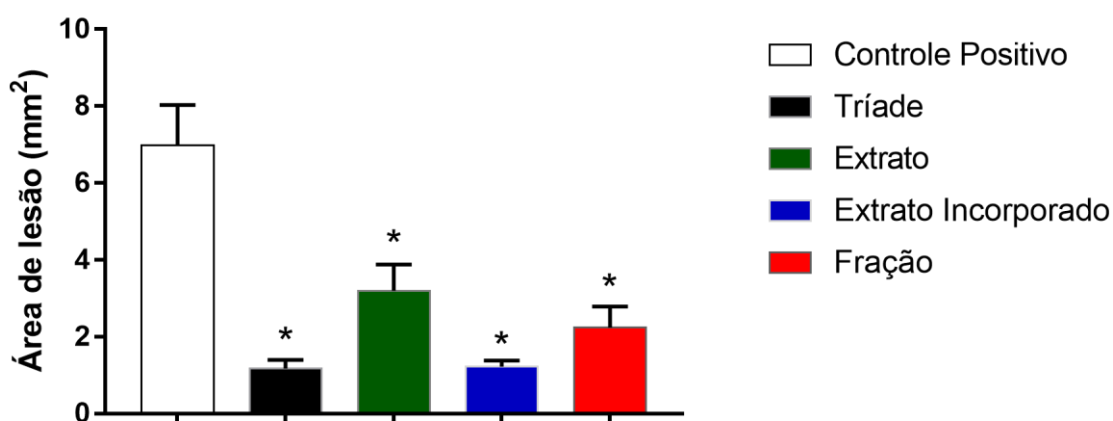


4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VIVO

4.3.1 Determinação da atividade anti-*Helicobacter pylori* in vivo

Tanto o tratamento convencional (tríade) quanto os derivados vegetais foram eficazes em diminuir a área ulcerada nos animais testados. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo dos tratamentos ($F_{4,29} = 9,467 / p < 0,05$). No grupo controle positivo onde foi administrada indometacina + solução de *H. pylori*, a área ulcerada foi de $6,980 \pm 1,047 \text{ mm}^2$. O tratamento convencional com a tríade (100 mg/kg) foi de $1,171 \pm 0,225 \text{ mm}^2$ ($p = 0,0001$), o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* $3,192 \pm 0,686 \text{ mm}^2$ ($p = 0,0068$), a fração $2,234 \pm 0,554 \text{ mm}^2$ ($p = 0,0060$) e o extrato incorporado no sistema $1,221 \pm 0,155 \text{ mm}^2$ ($p = 0,0008$), demonstrado na (Figura 26). Devido a problemas inerentes a fração 2 após a sua incorporação, não foi possível realizar o teste com essa.

Figura 26- Efeito do extrato não incorporado e incorporado em um sistema nanoestruturado e da fração 2 de *C. sylvestris* sobre o tamanho de lesão ulcerativa em um modelo de infecção por *H. pylori*.



*, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle positivo.

O teste de urease foi positivo para todos os animais do grupo controle e fração 2. Os grupos extrato, extrato incorporado e tríade apresentaram urease

negativa. Podemos concluir que apenas a fração 2 não foi capaz de eliminar a bactéria *H. pylori* presente no estômago.

Figura 27- Fotografia dos estômagos



5. DISCUSSÃO

Newman e Cragg desde 1984 veem estudando e enfatizando que os produtos naturais e/ou suas estruturas químicas desempenham um papel importante na descoberta e no processo de desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2016). O emprego destes na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento (chás, extratos, entre outros) muito utilizado pelos nossos ancestrais até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizadas recentemente (comprimidos, capsulas, drágeas, cremes, entre outros) (DARAVAS *et al.*, 2009).

Usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm a prática do consumo destas, sendo muito importantes as informações terapêuticas que foram acumuladas durante séculos. De modo indireto, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a abundante fonte medicinal natural: a flora mundial.

A família Salicaceae é amplamente utilizada no território brasileiro e vários estudos ao longo dos anos tem demonstrado que diversas espécies dessa família possuem atividades biológicas relevantes, tais como: antimicrobianas, hipolipêmicas e hipoglicemiantes, anti-ofídicas, antiulcerogênicas, citotóxica (PHILIPPSEN *et al.*, 2013).

Alguns estudos atuais mostraram que derivados vegetais da *Casearia sylvestris* tem atividade antimicrobiana frente a diferentes tipos de micro-organismos patogênicos (CAVALHEIRO, *et al.*, 2016; ESPINOSA *et al.*, 2015; LIPINSKI *et al.*, 2013). No presente estudo a revelação com resazurina mostrou que alguns dos derivados vegetais de *C. sylvestris* (extrato etanólico, fração 2 e subfrações das folhas de *C. sylvestris*) apresentam atividade anti- *H. pylori*. Os extratos aquosos nas condições testadas não obteve atividade, enquanto o extrato etanólico um CIM de 1000 µg/mL. Dentre as frações somente a fração 2 obteve uma atividade menor que

1000 µg/mL, sendo de 62,5 µg/mL. Das subfrações somente a subfração 17 não apresentou atividade relevante frente ao *H. pylori* (>1000 µg/mL). Já as demais apresentaram atividade relevante, sendo a atividade da subfração 46 1000 µg/mL, da SF13 500 µg/mL e da subfração 20 250 µg/mL.

O revelador resazurina (cor azul) utilizado, na presença de células viáveis sofre metabolização formando a resorufina (roséa), mostrando se há ou não viabilidade celular nos poços da microplaca. No entanto, as nuances de cores entre o azul e o rósea podem ocasionar dúvidas na determinação da CIM (STOPPA *et al.*, 2009), detectada nesse caso somente quando ocorre uma porcentagem de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 90% (GUDIÑA *et al.*, 2010; HÖRNER *et al.*, 2008).

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis *et al.*, (2001) apresentaram a seguinte classificação: agentes cujo CIM é de até 0,5mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6mg/mL são inibidores fracos. Já Webster *et al.*, (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000µg/mL ou menos. Wang, (2014) utiliza uma classificação que propõem a divisão em 4 classes de acordo com a sua CIM: atividade forte (CIM: <10 µg / mL); atividade moderadamente forte (CIM: 10-100 µg / mL); atividade moderadamente fraca (CIM: 100-1000 µg / mL) e atividade fraca (CIM:> 1000 µg / mL).

De uma maneira geral, através da classificação de Wang, 2014, foi observado que a maioria dos compostos testados foi classificado com tendo uma atividade moderadamente fraca, com exceção da fração 2 do extrato etanólico, a qual, apresentou o melhor potencial de inibição frente ao *H. pylori* (62,5), sendo considerado moderadamente forte. Levando-se em conta que o valor de CIM da amoxicilina, controle positivo utilizado contra *H. pylori* foi de 15µg/mL, não sendo tão inferior ao apresentado pela fração 2, pode-se inferir que este apresentou um resultado promissor.

Devido à diversidade estrutural e farmacológica, os metabólitos secundários das plantas estão sendo considerados um campo de pesquisa muito atraente, pelo

fato deles apresentarem ricas fontes de moléculas desconhecidas, que podem ser importantes terapeuticamente.

Na pesquisa de novos medicamentos fitoterápicos, os flavonóides presentes nas plantas medicinais são considerados como fortes agentes terapêuticos em casos de doenças de origem microbiana. Sua ação vai além disso, com promissoras atividades antivirais, antiproliferativas, antimutagênicas, antitrombóticas e antioxidantes (ORHAN *et al.*, 2010). Neste sentido, a presença de compostos fenólicos em espécies da família Salicaceae se caracteriza como um modelo promissor na avaliação de mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana (CUSHNIE; LAMB, 2011). Em relação aos efeitos antimicrobianos exercidos pelos flavonóides, as ações resultam de uma interação destes compostos com a membrana celular dos micro-organismos alvo, provavelmente devido à sua capacidade de se complexar com proteínas extracelulares e com a parede celular (SAVOIA, 2012).

Estudos fitoquímicos prévios mostraram que as espécies de *Casearia* revelaram possuir diversos metabólitos secundários em sua composição, sendo diferentes diterpenos, destacando-se os clerodânicos, taninos, cumarinas, flavonóides, lignanas, esteroides, amidas e compostos fenólicos (FERREIRA, *et al.*, 2011; TININIS *et al.*, 2006).

A literatura mostra que os compostos fenólicos (fenólicos, fenóis simples e polifenóis), flavonóides, quinonas, cumarinas, alcaloides e terpenos estão relacionados com atividades anti-*H.pylori* (WANG, 2014).

De acordo com CUSHNIE; LAMB, (2011), os compostos das classes de flavonóides e chalconas são primariamente inibidores da enzima urease, que é secretada pelo *H. pylori* durante a infecção para assegurar a sua sobrevivência no pH ácido do estômago. No entanto, não observamos atividade na fração 3 que foi eluída com metanol, que espera-se que tenha retirado os compostos de maior polaridade que estavam no extrato bruto, no qual se enquadram os flavonóides.

Entre os terpenos com atividade anti *H. pylori* podemos destacar uma saponina isolada de *Pteleopsis suberosa*, efetiva contra cepas *vacA* / *cagA* positivas e resistentes ao metronidazol (LEO *et al.*, 2006); Trichorabdol um diterpeno de

Rabdosia trichocarpa (KADOTA *et al.*, 1997) e o terpinen-4-ol, que foi isolado de Sclerocarya birrea (Anacardiaceae (NJUME *et al.*, 2011)). Nossos resultados mostram que cerca de 14% dos compostos encontrados no extrato etanólico da classe de diterpenos clerodânicos (a classe de terpenos). Após o fracionamento, esta classe de substâncias foi concentrada na fração 2, compondo cerca de 50% dos compostos encontrados nestes derivados. Considerando a melhora da atividade contra o *Helicobacter pylori* da fração 2 em relação ao extrato etanólico, sugerimos que a atividade anti – *H. pylori* dos derivados do *C. sylvestris* vem dos compostos desta classe, uma vez que uma maior quantidade destes compostos foi encontrado no derivado de melhor atividade. Neste sentido, esperava-se que quando houvesse o subfracionamento da fração 2 pudéssemos encontrar o composto que fosse responsável por tal atividade. Entretanto, nenhuma das subfrações foi capaz de inibir mais o crescimento do *H. pylori* que a fração 2. Neste contexto, é possível que esteja ocorrendo um sinergismo entre estes compostos presentes.

Como demonstrado, os derivados vegetais utilizados foram capazes de inibir o micro-organismo, deste modo, a investigação do potencial anti-*Helicobacter pylori* dos derivados vegetais após a incorporação em um sistema de liberação de fármacos tornou-se interessante.

As ciências fitoquímicas e fitofarmacológicas já estabeleceram que produtos naturais tem atividades biológicas. A maioria dos seus constituintes que são biologicamente ativos (flavonoides, taninos, terpenos) são altamente solúveis em água e tem grandes tamanhos moleculares, sendo incapazes de cruzar membranas lipídicas, o que diminui sua absorção; resultando na perda de biodisponibilidade e eficácia. Diversos estudos tem demonstrado que muitos derivados vegetais têm atividade em ensaios *in vitro*, mas não são reproduzíveis em experiências *in vivo* (BONIFÁCIO, *et al.*, 2013).

As plantas medicinais podem apresentar diversos problemas na sua utilização, tais como solubilidade, estabilidade e toxicidade. Estas questões podem ser superadas desenvolvendo-se sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos que podem ajudar na melhoria de seus parâmetros farmacológicos (RAMOS, *et al.*, 2015). A complexidade química dos derivados vegetais é muito

importante para que a formulação tenha sucesso, isso devido ao fato que a formulação é responsável pela liberação do princípio ativo. Conseqüentemente, a formulação deve solubilizar o fármaco, minimizar o processo de degradação, reduzir qualquer toxicidade e mascarar gosto ruim, e ao mesmo tempo controlar a absorção e a resposta biológica (BONIFÁCIO, *et al.*, 2013).

Kesarwani e Gupta, (2013) publicaram uma revisão que mostra uma variedade de estudos que utilizam a nanotecnologia para otimizar as propriedades dos derivados vegetais e concluíram que esta realmente aumenta a biodisponibilidade destes (BONIFÁCIO, *et al.*, 2013). Bhattacharya e Ghosh, (2008) incorporaram os extratos de chá verde e o ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer) (Araliaceae) para melhorar a absorção dos compostos ativos. SU *et al.*, (2008) usaram *Radix salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae) incorporados em microcápsulas e demonstraram uma significativa melhora na biodisponibilidade do extrato.

SINICO *et al.*, (2005) incorporou óleo essencial de *Artemisia arborescens* L. (Asteraceae) em lipossomos e observou que esses sistemas ajudaram os componentes ativos desta planta a penetrar a barreira citoplasmática.

Estudo realizado com extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*, com atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo*, demonstrou que após a incorporação em um sistema nanoestruturado (microemulsão) foi capaz potencializar a inibição (BONIFÁCIO, *et al.*, 2015).

Ramos *et al.*, (2016), demonstrou que o extrato de *S. nitens* quando incorporado em um crystal líquido mucoadesivo, pode ter facilitado a interação com as células fúngicas em um modelo animal de com ratos e ser responsável na melhora da atividade encontrada (RAMOS, *et al.*, 2016).

Neste trabalho a incorporação no sistema nanoestruturado, não potencializou a atividade antibacteriana de nenhum dos derivados vegetais no teste de CIM, visto que tanto o extrato 2 quando foram incorporados apresentaram CIM de >1000 µg/mL, perdendo assim a capacidade de inibição que existia anteriormente à incorporação. Isto pode ser devido aos compostos presentes nos derivados vegetais que não foram liberados após a incorporação.

A formação de biofilme é um importante marcador de virulência atribuído aos micro-organismos. Inicialmente os micro-organismos aderem aos tecidos dos hospedeiros, sendo estas mediadas por macromoléculas denominadas adesinas, as quais caracterizam-se em estruturas da superfície do micro-organismo que interagem com receptores específicos nas células do hospedeiro (NOBILE; JOHNSON, 2015).

Existe uma grande dificuldade na descoberta de novos compostos que possuam ação contra biofilmes, uma vez que estes possuem uma alta complexidade de mecanismos de metabolização e principalmente à alta concentração da carga bacteriana ou fúngica presente. Neste sentido, a busca por novas moléculas para a eliminação do mesmo é constante e permanece em extrema expansão nos dias atuais (FANNING; MITCHELL, 2012).

Em relação aos resultados encontrados neste estudo, foi observado que todos os derivados não incorporados e incorporados foram capazes de inibir o biofilme já formado do *H. pylori* na maioria das concentrações testadas. A fração 2 foi a que teve um maior potencial de inibição, uma vez que inibiu o biofilme em uma concentração menor com uma porcentagem de inibição maior em relação aos outros derivados testados.

Além do CIM e o CBM, um ensaio baseado no tempo de morte é um modelo utilizado para descrever a farmacodinâmica de um composto. O teste de cinética de crescimento é um método empregado para se determinar o tempo em que a substância-teste impede o desenvolvimento do micro-organismo a ser testado. Ele fornece a dinâmica de ação desta substância e sua interação com o tempo, sendo assim, fornece parte da informação necessária de quanto tempo é preciso para realizar-se a administração do antibiótico novamente. Normalmente, as investigações de novos compostos antimicrobianos utilizam este método de análise para complementar os resultados obtidos na determinação da CIM do composto avaliado (CHEN *et al.*, 2016; NOBREGA *et al.*, 2013).

Neste estudo o ensaio de cinética de crescimento foi realizados nas concentrações de 2x a CIM para os derivados vegetais. Como controle positivo de inibição foi utilizado o fármaco amoxicilina na concentração de 100 µg/mL. Os

resultados encontrados confirmaram a ação bacteriostática observada no ensaio de CBM, indicando que não houve morte celular (ação bactericida) e sim a diminuição do crescimento e proliferação da cepa. Ambos os derivados, extrato e fração não incorporados ou incorporados foram capazes de diminuir o crescimento do *H. pylori*, em determinados tempos. O extrato etanólico e o extrato incorporado diminuíram a quantidade de micro-organismos permanecendo em decrescente até o tempo de 12 horas, voltando o crescimento no tempo de 24 horas. Já a fração e a fração incorporada apresentaram um tempo maior de inibição, permanecendo em decrescente até o tempo de 24 horas. Em diversos tempos os derivados apresentaram um melhor desempenho que a amoxicilina, fármaco utilizado na prática clínica.

Um modelo animal para estudo da infecção por *H. pylori* consiste na administração de indometacina seguida pela inoculação gástrica de solução contendo o micro-organismo (O'ROURKE; LEE, 2003). A administração oral dos derivados vegetais das folhas de *C. sylvestris* não incorporados para ratos, ulcerados por indometacina e inoculados com *H. pylori*, apresentaram capacidade de melhoria no processo de cicatrização das úlceras provocadas pela indometacina. A incorporação desses não potencializou a ação cicatrizante. Com exceção da fração 2, os demais derivados vegetais testados nesse modelo apresentaram a capacidade de eliminar a bactéria *H. pylori*, sendo as amostras de lesão gástrica urease negativa.

Em trabalhos prévios, o extrato de folhas de *C. sylvestris* demonstrou eficácia para o tratamento e a prevenção de úlceras induzidas experimentalmente em ratos (FIALHO *et al.*, 2010; NEGRI, 2015).

Alguns estudos sugerem que esta atividade possa estar relacionada com a inibição da pepsina (ESTEVES *et al.*, 2005; SERTIÉ; CARVALHO; PANIZZA, 2000; SILVA, *et al.*, 2006). Flausino Junior *et al.*, (2009) sugeriu que os diterpenos clerodânicos obtidos de *C. sylvestris* (casearinas) podem estar relacionados com a atividade antiulcerogênica de seus derivados vegetais, e que seus mecanismos ação podem estar relacionados à inibição de pepsina. Soluções etanólica e aquosa de extratos de outras espécies de *Casearia* apresentaram atividade inibitória da

pepsina. Outros estudos fitoquímicos estão sendo realizados para investigar os diterpenos clerodânicos nestas plantas.

6. CONCLUSÕES

- Os extratos aquosos das folhas de *C. sylvestris*, não mostraram atividade significativa quando testados contra células planctônicas *in vitro* de *H. pylori*, através do teste de microdiluição.
- O extrato etanólico das folhas *C. sylvestris*, apresentou uma atividade de 1000 µg/mL contra *H. pylori*.
- A fração 2 do extrato etanólico de *C. sylvestris* foi a única entre as frações deste que apresentou atividade frente ao *H. pylori*, sendo expressivamente bom (62,5 µg/mL).
- Dentre as subfrações escolhidas, somente a SF17 não apresentou atividade (>1000 µg/mL), enquanto as demais obtiveram um maior potencial anti- *H. pylori* (SF13, 500 µg/mL; SF20, 250 µg/mL e a SF46, 1000 µg/mL).
- A incorporação do extrato e da fração 2 das folhas de *C. sylvestris* no sistema nanoestruturado não potencializou a ação dos mesmos nos testes de CIM frente ao *H. pylori*.
- O extrato etanólico de *C. sylvestris* e a fração 2 não incorporados e incorporados no sistema nanoestruturado foram eficientes contra o biofilme de *H. pylori*. O maior potencial de inibição foi a fração 2 não incorporada.
- No ensaio de cinética de crescimento, o extrato etanólico e a fração não incorporados e incorporados conseguiram diminuir a carga bacteriana consideravelmente. Todavia a fração 2 foi a mais ativa entre todos os compostos.
- Apenas o extrato etanólico e o extrato etanólico incorporado foram capazes de eliminar o *H. pylori* no ensaio *in vivo*, sendo as amostras de lesões gástricas urease negativas. Apesar disso, todos os derivados vegetais testados *in vivo* diminuíram significativamente a área ulcerada.

REFERÊNCIAS

ABAT, C.; CHAUDET, H.; ROLAIN, J.-M.; COLSON, P.; RAOULT, D. Traditional and syndromic surveillance of infectious diseases and pathogens. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 22–28, 2016.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168–70, 2001.

ANTUNES, D. C.; SILVA, I. M. L.; CRUZ, W. M. DE S. Quimioprevenção do Câncer Gástrico Gastric Cancer Chemoprevention. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 3, p. 367–374, 2010.

ARAÚJO, É. J. F.; FREITAS, D. Y. M. L.; FERREIRA, R. M.; PINHEIRO, P. M. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.3, p. 355-361, 2014.

ARAÚJO JÚNIOR, O. N. A.; ALEXANDRE, A. A. T. V.; BARBOZA, D. R. M. M.; MEIRELES, M. S.; PINHEIRO, M. V.; PINHEIRO, A. T. M. Perfil epidemiológico e histopatológico do câncer gástrico em um hospital terciário de Fortaleza-CE. **Cadernos ESP, Ceará**, v. 5, n. 2, p. 26–33, 2011.

ARGENT, R. H.; KIDD, M.; OWEN, R. J.; THOMAS, R. J.; LIMB, M. C.; ATHERTON, J. C. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 127, n. 2, p. 514–523, 2004.

AYALA, G.; ESCOBEDO-HINOJOSA, W. I.; de la CRUZ-HERRERA, C. F.; ROMERO, I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 6, p. 1450, 2014.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. D. L. D.; SILVA, F. M. DA; RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132–139, 2011.

BARBOSA, J. A.; SCHINONNI, M. I. *Helicobacter pylori*: Associação com o câncer gástrico e novas descobertas sobre os fatores de virulência. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 254–262, 2011.

BELTRÁN-ANAYA, F. O.; POBLETE, T. M.; ROMÁN-ROMÁN, A.; REYES, S.; SAMPEDRO, J. DE; PERALTA-ZARAGOZA, O.; RODRÍGUEZ, M. Á.; MORAL-HERNÁNDEZ, O. DEL; ILLADES-AGUIAR, B.; FERNÁNDEZ-TILAPA, G. The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1,

p. 223, 2014.

BETTEGA, P. V. C.; CZLUSNIAK, G. R.; PIVA, R.; NAMBA, E. L.; RIBAS, C. R.; GRÉGIO, A. M. T.; ROSA, E. A. R. Fitoterapia : dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, p. 89–97, 2011.

BHATTACHARYA, S.; GHOSH, A. Phytosomes: the Emerging Technology for Enhancement of Bioavailability of Botanicals and Nutraceuticals. **The Internet Journal of Aesthetic and Antiaging Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2008.

BIDONE, J.; ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; SIMÕES, C. M. O.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts into topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 421–429, 2014.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS**, v. 121, n. 136, p. 1–58, 2013.

BONIFÁCIO, B.; SILVA, P.; RAMOS, M.; NEGRI, K.; MARIA BAUAB, T.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1, 2013.

BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêutica - UNESP, 2014. 98 p.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. DOS S.; SILVA, P.; NEGRI, K.; LOPES, É.; SOUZA, L.; VILEGAS, W.; PAVAN, F.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5081, 2015.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; BAUAB, T. M. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 54, 2014.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC N° 26, 2014. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2017.

BURMØLLE, M.; REN, D.; BJARNSHOLT, T.; SØRENSEN, S. J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 84–91, 2014.

CAMARGO, M. C.; GARCÍA, A.; RIQUELME, A.; OTERO, W.; CAMARGO, C. A.; HERNANDEZ-GARCÍA, T.; CANDIA, R.; BRUCE, M. G.; RABKIN, C. S. The Problem of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Systematic Review in Latin America. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 485–

495, 2014.

CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277–284, 2009.

CARVALHO, F. A. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de látex natural de Hevea brasiliensis (WILD. EX A. JUSS.) MÜLL. ARG. com extrato de Casearia sylvestris SWARTZ e seus componentes**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 2015. 1-168 p.

CAVALHEIRO, A. H.; GODOI, A. P. T.; CARVALHO, T. C. DE; CATIRSE, A. B.; FURTADO, N. A. J. C. Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bacteria. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 4, p. 214–218, 2016.

CHEN, B. J.; JAMALUDIN, N. S.; KHOO, C. H.; SEE, T. H.; SIM, J. H.; CHEAH, Y. K.; HALIM, S. N. A.; SENG, H. L.; TIEKINK, E. R. T. In vitro antibacterial and time kill evaluation of mononuclear phosphane-gold(I) dithiocarbamates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 163, p. 68–80, 2016.

CLAUDINO, J. C.; SACRAMENTO, L. V. S. DO; KOCH, I.; SANTOS, H. A.; CAVALHEIRO, A. J.; TININIS, A. G.; SANTOS, A. G. DOS. Evaluation of morpho-anatomical and chemical differences between varieties of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1253–1265, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards. CLSI document M07-A9**. 7th. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; CUNICO, M. M.; RIBEIRO, M. L.; CAMARGO, E. R. DE; KUSSEN, G. M. B.; NOGUEIRA, K. DA S.; COSTA, L. M. D. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 304–309, 2010.

COSTA, M. C.; COSTA, P. R. S.; SILVA, J. C. P.; MAIA, R. E. N.; MOREIRA, J. C. L.; CARVALHO, R. M. Utilização do óleo de alho e da amoxicilina, metronidazol e omeprazol no controle de *Helicobacter* spp. em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 362–368, 2009.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99–107, 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: Um promissor

carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9–18, 2011.

DANDLEN, S. A.; LIMA, A. S.; MENDES, M. D.; MIGUEL, M. G.; FALEIRO, M. L.; SOUSA, M. J.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G.; FIGUEIREDO, A. C. Antimicrobial activity , cytotoxicity and intracellular growth inhibition of Portuguese Thymus essential oils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1012–1024, 2011.

DARAVAS, A. M.; MOREIRA, J.; ROSSATO, E. A.; CITADINI-ZANETTE, V.; AMARAL, P. A. *Casearia sylvestris* Sw.(SALICACEAE) E JACARANDA PUBERULA CHAM. (BIGNONIACEAE): USO POPULAR VERSUS LITERATURA CIENTÍFICA. **Visão Acadêmica**, v. 10, p. 83–96, 2009.

DAS, D.; ABBAS, M.; NEPAL, A.; ISLAM, A.; AYUBA, A.; MALLICK, N.; IHSEN, A. A clinical review on the pathology and management *Helicobacter pylori* infection. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, p. 18–30, 2016.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. D. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 724–728, 2010.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Impactos da Nanotecnologia na Saúde: produção de medicamentos. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.

ESPINOSA, J.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, A.; GUNTZEL, A. R. C.; RUCKER, B.; CASALI, E. A.; ETHUR, E. M.; WINK, M. R.; TORRES, I. L. S. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibits in vitro antioxidant and antimicrobial activities and in vivo hypolipidemic effect in rats. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 2, p. 305–315, 2015.

ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1–3, p. 191–196, 2005.

FALSAFI, T.; MAHBOUBI, M. *Helicobacter hepaticus*, a new pathogenic species of the *Helicobacter* genus: Similarities and differences with *H. pylori*. **Iranian journal of microbiology**, v. 5, p. 185–194, 2013.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. **New**

England Journal of Medicine, v. 366, n. 5, p. 454–461, 2012.

FERNANDES, C. C.; CURSINO, L. M. C.; NOVAES, J. DE A. P.; DEMETRIO, C. A.; JÚNIOR, O. L. P.; NUNEZ, C. V. Salicilatos Isolados de folhas e talos de *Salix martiana* Leyb. (*Salicaceae*). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 983–986, 2009.

FERNANDES, M. J. B. ***Helicobacter Pylori* – a Fisiopatologia da Doença**. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto, 2016. 35 p.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373–1384, 2011.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA JR, W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290–298, 2014.

FIALHO, S. S.; NOGUEIRA, G. M.; DUARTE, C. C.; NETO, A. DE O. P.; MACORIS, D. DE G. *Casearia sylvestris* na permeabilidade gástrica à sacarose em equinos submetidos a protocolo de indução de úlcera gástrica. **Ciência Rural**, v. 40, p. 348–355, 2010.

FIORENTINO, M.; DING, H.; BLANCHARD, T. G.; CZINN, S. J.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A. *Helicobacter pylori*-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 3, p. 876–883, 2013.

FLAUSINO JR, O.; ABISSI, B. M.; VIEIRA JR, G. M.; SANTOS, A. G. DOS; SILVA, D. H. DA; CAVALHEIRO, A.; BOLZANI, V. D. S. Protease inhibition activity of extracts from *Salicaceae* species from Brazilian Cerrado and Atlantic Rain Forest and of an enriched fraction of clerodane diterpenes (casearins). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 755–758, 2009.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. D. S.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. DE. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301–313, 2005.

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

GODOY, A. P. O.; RIBEIRO, M. L.; BENVENGO, Y. H. B.; VITIELLO, L.; MIRANDA, M. DE C. B.; MENDONÇA, S.; PEDRAZZOLI JUNIOR, J. Analysis of antimicrobial

susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. **BMC Gastroenterology**, v. 3, p. 1–6, 2003.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419–424, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos : importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, p. 667–679, 2010.

HAJIMAHMOODI, M.; SHAMS-ARDAKANI, M.; SANIEE, P.; SIAVOSHI, F.; MEHRABANI, M.; HOSSEINZADEH, H.; FOROUMADI, P.; SAFAVI, M.; KHANAVI, M.; AKBARZADEH, T.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. In vitro antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 11/12, p. 1059–1066, 2011.

HENRIQUE, V. H. O.; MAGALHÃES, V. S.; ALEZANDRE, M.; PASA, M. C. Etnofarmacologia e educação básica: contribuições para a educação ambiental. **Revista Ouricuri**, v. 5, p. 117–131, 2015.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A. D.; WESTPHALEN, A. B.; IGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H. DO; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. D. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441–9, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tipo de Câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

KADOTA, S.; BASNET, P.; ISHII, E.; TAMURA, T.; NAMBA, T. Antibacterial Activity of *Trichorabdal A* from *Rabdosia trichocarpa* Against *Helicobacter pylori*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 286, n. 1, p. 63–67, 1997.

KESARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 4, p. 253–266, 2013.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, M. D. F.; RODRIGUES, A. M. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2003.

LEO, M. DE; TOMMASI, N. DE; SANOGO, R.; D'ANGELO, V.; GERMANÒ, M. P.; BISIGNANO, G.; BRACA, A. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. **Phytochemistry**, v. 67, n. 24, p. 2623–2629, 2006.

LEVENTHAL, G. E.; HILL, A. L.; NOWAK, M. A.; BONHOEFFER, S. Evolution and emergence of infectious diseases in theoretical and real-world networks. **Nature communications**, v. 6, p. 6101, 2015.

- LIPINSKI, L. C.; GUIMARÃES, C. D. F.; BORGES, F. DOS R.; OLLHOFF, R. D. Antibacterial activity of *Casearia sylvestris*, *Schinus Terebinthifolius* and *Tabebuia Avellaneda*-three native brazilian tree species. **PUBVET**, v. 7, 2013.
- MACEDO, M. D. L. D. A. P.; CARTAXO, R. D. S.; ALMEIDA, T. C. D. C.; SOUZA, L. B. S. DE; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. **UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde**, v. 7, p. 59–63, 2005.
- MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.
- MÉGRAUD, F.; BESSÈDE, E.; LEHOURS, P. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 19, n. S1, p. 6–10, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148p.
- MOBLEY, H. L. T.; MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. ***Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics**. Washington (DC): ASM Press, 2001. 627p.
- MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Emerging Infectious Diseases: Threats to Human Health and Global Stability. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. e1003467, 2013.
- MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Meeting the Challenge of Epidemic Chikungunya. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S434–S435, 2016.
- MOURA, K. C. R. **Análise da frequência do polimorfismo rs12979860 c/t no gene il28b em pacientes acometidos por câncer gástrico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Médica) - Universidade Estadual Paulista - UNESP. Faculdade de medicina de Botucatu, 2015. 1-64 p.
- NEGRI, K. M. S. **Avaliação do potencial biológico de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados: in vitro e in vivo**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- NJUME, C.; AFOLAYAN, A. J.; GREEN, E.; NDIP, R. N. Volatile compounds in the stem bark of *Sclerocarya birrea* (*Anacardiaceae*) possess antimicrobial activity against drug-resistant strains of *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 4, p. 319–324, 2011.
- NOBELPRIZE.ORG. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005**. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html>.

Acesso em: 5 jan. 2017.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71–92, 2015.

NOBREGA, H. DO N.; FERREIRA, J. A. B.; ROMAO, C. M. C. P. A.; CAPASSO, I. R. V. DE F. Analysis of in vitro antimicrobial activity of antiseptics products by means of time kill assay. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 3, p. 246–253, 2013.

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

O'ROURKE, J. L.; LEE, A. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 8, p. 741–748, 2003.

O'TOOLE, P. W.; LANE, M. C.; PORWOLLIK, S. *Helicobacter pylori* motility. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1207–1214, 2000.

OLIVEIRA, A. G. DE; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131–138, 2004.

ORHAN, D. D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 496–504, 2010.

PARREIRA, P.; DUARTE, M.; REIS, C. A.; MARTINS, M. C. L. *Helicobacter pylori* infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 7828, n. April, p. 1–12, 2014.

PERON, L. **Doença causada por *Helicobacter pylori* ou *H. pylori* - Causas, Sintomas, Diagnóstico e Tratamento.** Disponível em: <<https://biomagsaude.blogspot.com.br/2016/04/doenca-causada-por-helicobacter-pylori.html>>. Acesso em: 8 jan. 2017.

PHILIPPSSEN, A. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; LIMA, C. P. DE; KALEGARI, M.; LORDELLO, A. L. L. Avaliação da atividade antibacteriana das cascas das raízes de *Xylosma ciliatofolia* (Clos) Eichler (*Flacourtiaceae/ Salicaceae* sensu lato). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, p. 258–269, 2013.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45–61, 2002.

PLAPIED, L.; DUHEM, N.; RIEUX, A. DES; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228–237, 2011.

PROCTOR, M. J.; DEANS, C. Complications of peptic ulcers. **Surgery (Oxford)**, v. 32, n. 11, p. 599–607, 2014.

RAJ, S.; SUMOD, U.; JOSE, S.; SABITHA, M. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 186, 2012.

RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 613–617, 2013.

RAMOS, M. A. DOS S.; TOLEDO, L.; CALIXTO, G.; BONIFÁCIO, B.; FREITAS ARAÚJO, M. DE; SANTOS, L. DOS; ALMEIDA, M. DE; CHORILLI, M.; BAUAB, T. *Syngonanthus nitens* Bong. (Rhul.)-Loaded Nanostructured System for Vulvovaginal Candidiasis Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1368, 2016.

RAMOS, M. A. S. ***Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland: Caracterização biológica e prospecção terapêutica do extrato metanólico incorporado ou não em sistema nanoestruturado para aplicação no tratamento da candidíase vulvovaginal.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 2015.

RAMOS, M. A. S.; CALIXTO, G. M. F.; GASPAR DE TOLEDO, L.; VIDAL BONIFÁCIO, B.; CAMPANER DOS SANTOS, L.; GOTTARDO DE ALMEIDA, M. T.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 7455, 2015.

SAINI, J. K.; NAUTIYAL, U.; KUMAR, S.; SINGH, D.; ANWAR, F. Microemulsions: A potential novel drug delivery system. **Int. J. Pharm. Med. Res. International Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research Journal**, v. 2, n. 1, p. 15–20, 2014.

SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZON, E. N.; RAMOS, M. A. S.; SANTOS, C. T.; PICCOLI, J. P.; BAUAB, T. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; CILLI, E. M. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon**, v. 103, p. 160–168, 2015.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; JÚNIOR, G. M. V.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. DA S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. DO Ó.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, Its Degradation Product and Other Clerodane Diterpenes from Leaves of *Casearia sylvestris*: Evaluation of Cytotoxicity against Normal and Tumor Human Cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205–215, 2010.

SANTOS, P. S. S. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e microemulgeles contendo ibuprofeno**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto, 2015. 1-135 p.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt_1, p. 10–24, 2013.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979–990, 2012.

SCOTT, D. R.; MARCUS, E. A; WEN, Y.; OH, J.; SACHS, G. Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 17, p. 7235–7240, 2007.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer Activity of the Crude Extract from the Leaves of *Casearia Sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 112–119, 2000.

SILVA, A. C.; BALZ, D.; SOUZA, J. B. D.; MORSCH, V. M.; CORRÊA, M. C.; ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; SCHETINGER, M. R. C. Inhibition of NTPDase, 5'-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 7, p. 509–514, 2006.

SILVA, J. D. F.; SILVA, Y. P. DA; PIATNICKI, C. M. S.; BÖCKEL, W. J.; MENDONÇA, C. R. B. Microemulsions: components, characteristics, potentialities in food chemistry and other applications. **Química Nova**, v. 38, p. 1196–1206, 2015.

SILVA, M. K. D.; TEREZAN, M. L. F.; FISCHER, R. G. Associação da halitose com a presença de *Helicobacter pylori* no biofilme dental supragengival em pacientes com doenças periodontal um estudo piloto. **Brazilian Journal Periodontology**, v. 22, p. 63–60, 2012.

SILVA, P. B.; FREITAS, E. S.; BERNEGOSI, J.; GONÇALEZ, M. L.; SATO, M. R.; LEITE, C. Q. F.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Treatment of Tuberculosis—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 2, p. 241–260, 2016.

SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; NEGRI, K. M. S.; SATO, M. R.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnological Strategies for Vaginal Administration of Drugs—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2218–2243, 2014.

SINICO, C.; LOGU, A. DE; LAI, F.; VALENTI, D.; MANCONI, M.; LOY, G.; BONSIGNORE, L.; FADDA, A. M. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. **European Journal of Pharmaceutics**

and **Biopharmaceutics**, v. 59, n. 1, p. 161–168, 2005.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S. S.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 1, p. 9–13, 2007.

SOCIEDADE CATARINENSE DE GASTROENTEROLOGIA. **Infecção pelo H. Pylori**. Disponível em: <<http://www.gastrocentro.med.br/infeccao-pelo-h-pylori/>>. Acesso em: 23 dez. 2016.

SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; SANTOS, R. A. N. DOS; RAO, V. S.; SILVA, R. M. DA; MARTINS, D. T. DE O. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 452–458, 2009.

SOUZA, V. A.; LIMA, D. C. DA S.; VALE, C. R. Avaliação do conhecimento etnobotânico de plantas medicinais pelos alunos de ensino médio da cidade de Inhumas, Goiás. **Revista Eletrônica de Educação da Faculdade Araguaia**, v. 8, p. 13–30, 2015.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. E; MARTINS, C. H. G.; FURTADO, N. A. J. C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498–502, 2009.

SU, Y. L.; FU, Z. Y.; ZHANG, J. Y.; WANG, W. M.; WANG, H.; WANG, Y. C.; ZHANG, Q. J. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. **Powder Technology**, v. 184, n. 1, p. 114–121, 2008.

THADEO, M.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A.; ARAÚJO, J. M. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq . (*Salicaceae*). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, p. 329–338, 2009.

TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW . **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 132–136, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 1-967p.

TRECCO, A.; BORGES, F. A.; PIERRI, E. G.; GONZAGA, A.; CHIN, C. M. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 1, p. 89–95, 2014.

UBERTI, A. F. **Urease de *Helicobacter Pylori*: Atividade Pró- Inflamatória e Efeitos em Células Epiteliais Gástricas**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal

do Rio Grande do Sul, 2014. 1-84 p.

WANG, Y.-C. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 30, p. 10368, 2014.

WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **The Lancet**, v. 321, n. 8336, p. 1273–1275, 1983.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R. J.; SAND, C.; RENNIE, R. P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140–146, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infectious diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/>. Acesso em: 12 set. 2016.

WU, J.; XU, S.; ZHU, Y. *Helicobacter pylori* CagA: A Critical Destroyer of the Gastric Epithelial Barrier. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 7, p. 1830–1837, 2013.

ANEXOS

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 29/2015

Interessada: LARISSA SPÓSITO

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Projeto: Caracterização biológica de *Casearia sylvestris* com enfoque na atividade anti-*Helicobacter pylori*.

Parecer nº 111/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Caracterização biológica de *Casearia sylvestris* com enfoque na atividade anti-*Helicobacter pylori*”, apresentado pela pós-graduanda LARISSA SPÓSITO, sob orientação da Professora Doutora Taís Maria Bauab, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em AGOSTO de 2016, em formulário para este fim.

Araraquara, 14 de DEZEMBRO de 2015.


Profa Dra ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA