



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

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

**Potencial anti-*Helicobacter pylori* de extratos  
hidroetanólicos de caule e folhas de *Astronium urundeuva***

**Maria Luiza Bellizzi Duarte**

**Orientadora:** Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara – SP

2014



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

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

**Potencial anti-*Helicobacter pylori* de extratos  
hidroetanólicos de caule e folhas de *Astronium urundeuva***

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

*Maria Luiza Bellizzi Duarte*  
**Graduanda**

*Profa. Dra. Taís Maria Bauab*  
**Orientadora**

Araraquara – SP

2014

*"Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante"*

**Antoine de Saint-Exupéry, "O pequeno príncipe".**

## DEDICATÓRIA

---

*Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Cristina, que com sabedoria e paciência soube me orientar pelos caminhos da vida. Não fosse por seu esforço e dedicação em todos esses anos, e foram muitos, eu não poderia estar aqui agora celebrando esta conquista. Por isso meu “muito obrigada”, meu carinho e gratidão eternos! Amo você!*

*Obrigada...*

*A Deus por me manter de pé nos momentos em que quase caí.*

*A minha mãe por acreditar que esse dia chegaria. Por me incentivar e por não me deixar desistir. E ao Sílvio por também ser parte essencial dessa trajetória.*

*Ao meu irmão Arthur, que desde que nasceu trouxe uma alegria e um amor imensurável a minha vida, obrigada pela leveza que seu sorriso me trás.*

*A Profa. Dra. Taís Maria Bauab, minha orientadora, por acreditar em mim e colocar em minhas mãos parte desta pesquisa tão importante.*

*A minha amiga e companheira Raquel Martins, obrigada por fazer parte de todos esses anos de faculdade, pelas risadas e por aguentar meu choro, por estar sempre ao meu lado, me ajudando e me dando forças. Obrigada por ser minha metade loira, a sua amizade foi das melhores coisas que ganhei nesses anos em Araraquara, te quero sempre comigo.*

*A amiga e parceira para todas as horas Carolina Akune, obrigada por me ouvir sempre, me puxar a orelha quando necessário e me fazer ver um lado leve da vida.*

*A Rosangêla Rinaldi, minha psicóloga, sem você eu não estaria aqui, finalmente, concluindo esta etapa.*

*A minha família, já que vocês não acharam que este dia chegaria. Vocês são a base de tudo!*

*A República Só Caquí, que mais que uma república foi uma família em Araraquara, onde aprendi a ser uma pessoa mais paciente e calma. Onde aprendi que irmãs, podem sim, não nascer da mesma mãe.*

*As companheiras de casa nova, Flávia Lourenço, Bruna Okamoto, Rafaela Massa, e Luísa Ambrosio pelas risadas e gordices, pela amizade e carinho, pelas confidências e apoio.*

*A turma 81 noturno, por passarem juntos comigo momentos maravilhosos e outros nem tão bons assim nesses 6 anos de graduação.*

*Aos companheiros do laboratório de Fisiologia de Microrganismos, Patricia, Kamila, Victor, Isadora, Aymê, Irina, Tháís, e por me ajudarem no desenvolvimento deste trabalho, por terem paciência comigo, por me ensinarem tantas coisas novas.*

*A Bruna e Matheus, por terem me ajudado em cada detalhe, por me ensinarem com tanta dedicação e amor. Sem vocês nada disso seria possível, obrigada por estarem fazendo parte deste meu sonho!*

*A Araraquara, que com seu cheiro de laranja, sempre foi uma cidade acolhedora e divertida, e o lugar onde passei os melhores anos da minha vida.*

*A Faculdade de Ciências Farmacêuticas -UNESP, Araraquara.*

*A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-  
FAPESP (Projeto BIOTA)*

## RESUMO

Dentre as várias doenças crônicas que acometem o homem, destacam-se as que afetam o trato digestório como as úlceras gástricas e duodenais, colite ulcerativa e doença de *Crohn*, estando o *Helicobacter pylori* relacionado intimamente com grande parte dessas doenças. Nesse contexto, o uso de fitoterápicos padronizados com eficácia e segurança determinadas tem apresentado bons resultados no tratamento de tais doenças. Dentre as plantas com potencial farmacológico, está o gênero *Astronium* (Anacardiaceae) que possui diversas espécies utilizadas pela medicina popular como, com destaque para *A. urundeuva* (aroeira-do-sertão), com propriedades adstringentes, antitérmicas, antidiarreicas, antirreumáticas e antimicrobianas, atribuídas aos componentes químicos lignanas, flavonoides, triterpenos e xantonas. A fim de aprofundar os estudos e o desenvolvimento de novas drogas a partir de plantas medicinais, este estudo visou checar o potencial antimicrobiano de extratos hidroalcóolicos de *A. urundeuva* frente ao *Helicobacter pylori* utilizando a técnica de diluição em microplaca e o ensaio *Checkerboard*. Os resultados mostraram que o extrato do caule desta espécie é pouco eficaz contra o *H. pylori*, apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) maior que 1000 µg/mL, enquanto que o extrato da folha desta mesma espécie apresentou um CIM de 1000 µg/mL. Quando avaliada em combinação com os antibióticos usualmente utilizados no tratamento contra o *H. pylori*: o extrato das folhas de *A. urundeuva* juntamente com a amoxicilina apresentou CIM significativamente inferior (CIM AUFcomb= 7,81 µg/mL e CIM AMOXcomb= 0,48 µg/mL) do que quando testados isoladamente (CIM AUF= 1000 µg/mL e CIM AMOX= 125 µg/mL). Da mesma forma, foi encontrado sinergismo para claritromicina em combinação com o extrato das folhas (CIM AUFcomb= 31,2 µg/mL e CIM CLRcomb= 0,97 µg/mL) e isolados (CIM AUF= 1000 µg/mL e CIM CLR= 0,97 µg/mL). Tais resultados demonstram que a combinação dos extratos de *A. urundeuva*, principalmente das folhas, foi capaz de potencializar a atividade antimicrobiana contra o *H. pylori*, o que pode contribuir para futuros estudos no que se diz respeito a busca de novas fontes antimicrobianas alternativas.

Palavras chave: *Helicobacter pylori*, *Astronium urundeuva*, fitoterápico, *Checkboard*

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Fotografia de <i>A. urundeuva</i> .....	13
<b>Figura 2.</b> Microscopia eletrônica de varredura de <i>H. pylori</i> no estômago ampliado 3100 vezes. ....	15
<b>Figura 3.</b> Microscopia eletrônica de transmissão do <i>H. pylori</i> na parede estomacal ampliado 40000 vezes. ....	16
<b>Figura 4.</b> Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico do extrato do caule e das folhas de <i>A. urundeuva</i> com AMX, CLR, OMP e tríplice. ....	25
<b>Figura 5.</b> Inibição do crescimento do micro-organismo pelo extrato hidroetanólico de caule de <i>A. urundeuva</i> . ....	27
<b>Figura 6.</b> Inibição do crescimento do micro-organismo pelo extrato hidroetanólico das folhas de <i>A. urundeuva</i> . ....	28

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1.** Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações. .... 26
- Tabela 2.** CIM dos extratos hidroetanólicos de caule e folhas de *A. urundeuva* através da revelação com resazurina (0,01%)..... 27
- Tabela 3.** Efeito sinérgico do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* frente a amoxicilina (AMOX), claritromicina (CLR), omeprazol (OMP) e a tríplice (TRI). .... 30
- Tabela 4.** Efeito sinérgico do extrato hidroetanólico do caule de *A. urundeuva* frente à amoxicilina (AMOX), claritromicina (CLR), omeprazol (OMP) e a tríplice (TRI)..... 32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

AMOX – Amoxicilina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

AU – *Astronium urundeuva*

AUC – Caule de *Astronium urundeuva*

AUF – Folha de *Astronium urundeuva*

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

CIF – Concentração Inibitória Fracionada

CLR – Claritromicina

CMH – Caldo Mueller Hinton

DMSO – Dimetilsulfóxido

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*

OMP – Omeprazol

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato de Sódio)

SFB – Soro Fetal Bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TRI – Trílice

UFC – Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 Objetivos Específicos .....	18
<b>3.JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
4.1. Extratos Vegetais .....	21
4.1.1. Obtenção e Procedência .....	21
4.1.2. Espectro de Absorção dos Extratos Vegetais .....	21
4.1.3. Preparo das Soluções do Extrato .....	21
4.2. Bactéria Utilizada.....	22
4.2.1.Cepa Bacteriana.....	22
4.2.2. Estocagem e Manutenção das Cepas.....	22
4.3. Atividade Bacteriana.....	22
4.3.1. Preparo das Suspensões Microbianas .....	22
4.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	23
4.3.3. Ensaio Checkboard .....	23
4.3.4. Leitura Espectrofotométrica.....	26
4.3.5. Leitura com Revelador .....	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	34

## 1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia é utilizada pelo homem no alívio de suas doenças desde a antiguidade. Com o uso das plantas medicinais e do conhecimento popular, gerado a partir disto, a fitoterapia foi se desenvolvendo ao longo do tempo. Nos países em desenvolvimento, cerca de 80% da população depende apenas do uso das plantas medicinais, seja pelo alto custo dos medicamentos industrializados ou pelo difícil acesso a assistência médica. Isso mostra a importância de se ampliar a pesquisa e o desenvolvimento de terapias alternativas que venham contribuir com os cuidados primários à saúde (ALMEIDA et al., 2013).

Constantemente a indústria farmacêutica vem buscando inovar seus produtos a fim de conseguir menores efeitos indesejáveis em relação aos produtos já existentes no mercado, com isso as plantas medicinais bem como a fitoterapia apresentam interessantes potenciais terapêuticos (COSTA et al., 2010). As plantas medicinais possuem diversos produtos químicos que são provenientes de seu metabolismo secundário com potencial terapêutico, sendo esses compostos de várias classes como alcaloides, lignanas, xantonas, terpenos e quinonas (VENTUROSIO et al., 2011). Dessa forma, pode-se evidenciar a existência de plantas medicinais com compostos químicos que apresentam possíveis e importantes atividades antimicrobianas (DAS et al., 2010).

Neste contexto um grupo de pesquisadores incluindo botânicos, químicos, farmacêuticos e biólogos estão empenhando seus estudos em um projeto temático intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de

doenças crônicas”, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, com suporte financeiro da FAPESP (Projeto Biota – processo nº 09/52237-9). Fazem parte desse projeto estudos que apresentam como base plantas relacionadas na lista proposta pelo SUS, com atividade em doenças crônicas, em destaque as utilizadas no combate à doenças do trato gastrointestinal como *Astronium* sp (Anacardiaceae).

### **1.1 *Astronium urundeuva***

A família Anacardiaceae é geograficamente bem distribuída no Brasil, sendo encontrada principalmente no Nordeste (PACHECO et al., 2006). A maioria das espécies são tropicais e subtropicais, e algumas também podem ser encontradas em regiões temperadas (SAWANGCHOTE et al., 2009). O gênero *Astronium* reúne espécies arbóreas e é constituído por 13 espécies e 8 variedades (CARMELLO-GUERREIRO e PAOLI, 2000) sendo que 12 espécies são encontradas do Norte ao Sul do Brasil, em diversos habitats, como as áreas do Cerrado nos pantanais do Mato Grosso, florestas caatingas e áreas circundantes, floresta amazônica e Mata Atlântica (AGUIAR et al., 2003).

O *A. urundeuva* (fig 1) é uma das plantas mais utilizadas na medicina tradicional nordestina para o tratamento de várias doenças (CUNHA et al., 2009), sendo o caule bastante utilizado como “banho-de-assento” após o parto. Também é indicado na terapêutica de gastrites, úlceras gástricas, cervicites, vaginites, hemorróida (LORENZI, 2008) e como anti-inflamatório e cicatrizante natural (PINHO et al., 2012). As atividades terapêuticas apresentadas se

devem principalmente pela presença de constituintes fitoquímicos tais como óleos essenciais, taninos hidrolisáveis e condensados (CUNHA et al., 2009).

**Figura 1.** Fotografia de *A. urundeuva*.



Fonte: Lorenzi, 2008

## 1.2 *Helicobacter pylori*

Determinados micro-organismos que convivem com o hospedeiro e em condições normais não são patogênicos (MIMS et al, 2002) no entanto em determinadas situações, esses micro-organismos podem ser agentes causadores de doenças infecciosas.

Dentre as espécies bacterianas de interesse para a saúde humana destaca-se o *Helicobacter pylori* (Figura 2) um bacilo Gram-negativo, microaerófilo, da família Enterobacteriaceae, helicoidal com flagelos, que tem sido considerado o principal agente etiológico da gastrite crônica, úlcera péptica e neoplasias gástricas (MANYI-LOH et al., 2012). Pode-se observar uma maior prevalência de infecções causadas por *H. pylori* nos países em desenvolvimento, em locais onde há uma deficiência nos hábitos de higiene e

alimentação, sendo que os fatores sócio-econômicos e ambientais têm papel determinante em seu aparecimento e posterior manutenção (SILVA et al., 2011).

A colonização do epitélio superficial do estômago se dá pela penetração da bactéria em suas criptas (fig 3), seguida da adaptação ao meio e a aderência. A sobrevivência em meio ácido é considerada sua principal característica, o bacilo é capaz de alterar o pH estomacal, pela produção da enzima urease, e além disso acredita-se que ocorra o aumento da secreção de gastrina (SILVA et al.,2011). A enzima urease é capaz de hidrolisar, em meio ácido, a ureia que está presente no suco gástrico, e assim ocorre a produção de amônia que é um receptor de íon  $H^+$ , gerando por consequência um pH neutro no meio intracelular e garantindo a sobrevivência da bactéria. Essa relação entre a amônia e a urease favorece o desequilíbrio da camada mucosa, fazendo com que apareçam lesões no revestimento da parede estomacal. Acredita-se também que a urease pode estar envolvida na sinalização para ativação do sistema imune, gerando uma resposta inflamatória no local (WROBLEWSKI et al., 2010).

**Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura de *H. pylori* no estômago ampliado 3100 vezes.



**Fonte:** Science Photo Library, 2013.

No geral, os sintomas da gastrite envolvem queimação, dor abdominal, perda do apetite, náusea, vômito, sensação de saciedade e sangramento digestivo. A dificuldade na absorção de alguns elementos e vitaminas podem causar também quadros de fraqueza e diarreia (BURNETT-HARTMAN et al., 2008; BANERJEE et al., 2008; NDIP et al., 2008).

Das doenças causadas por *H. pylori* destaca-se o desenvolvimento do câncer de estômago. Este tipo de patologia está diretamente associada a permanência e conseqüente progresso da ação do patógeno, além da pré-disposição genética do hospedeiro. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) cerca de 20.390 novos casos são esperados no Brasil, sendo em sua maioria homens por volta de 70 anos. Nos brasileiros esses tumores aparecem em terceiro lugar na incidência entre homens e em quinto, entre as mulheres. Já em países mais desenvolvidos tais como Inglaterra e Estados Unidos estudos estatísticos tem verificado um declínio da incidência (INCA, 2014).

**Figura 3.** Microscopia eletrônica de transmissão do *H. pylori* na parede estomacal ampliado 40000 vezes.



Fonte: Science photo library, 2014

### 1.3 Antimicrobianos

Os antimicrobianos correspondem a uma classe de medicamentos usados em tratamentos e profilaxia de doenças infecciosas em humanos e animais, bem como podem exercer papel de auxiliares no processo de crescimento de plantas na agricultura (ARIAS e CARRILHO, 2012). Eles podem ser classificados como bacteriostáticos quando são capazes de inibir o crescimento das bactérias ou bactericidas quando são capazes de matar as bactérias (GUIMARÃES et al., 2010).

O seu uso indiscriminado e abusivo é o grande responsável pela resistência bacteriana aos antimicrobianos, o que pode levar a falhas na terapia medicamentosa esgotando as possibilidades de tratamento e até mesmo elevando o índice de mortalidade (BOLIVAR et al., 2011; ARIAS e CARRILHO, 2012). Para erradicação da *H. pylori* é usada uma terapia tripla que consiste na

combinação de dois antibióticos, sendo os de primeira escolha a clarotromicina e a amoxicilina ou metronidazol, juntamente com um inibidor da bomba de prótons (WU et al., 2012).

#### **1.4 Atividade antimicrobiana e sinergismo**

Existem diferentes maneiras de avaliar a atividade antimicrobiana dos produtos naturais, uma delas é a microdiluição em placa. Neste método verifica-se a menor concentração de extrato utilizada para inibir o crescimento dos micro-organismos, a concentração inibitória mínima (CIM). Para se determinar o CIM é utilizado um método sensível de microdiluição que foi desenvolvido por Ellof em 1998 (OSTROSKY et al., 2008). Além de possibilitar a utilização de mais de uma substância-teste, bem como de diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio, é possível que este seja realizado em microplacas, exigindo pequenos volumes de amostras e reagentes, fato extremamente vantajoso quando se trabalha com produtos naturais, que na grande maioria das vezes são obtidos em pequenas quantidades (COWAN, 1999; ALVES et al., 2008; YUNES e CALIXTO, 2001; DAS et al., 2010).

Além do teste de microdiluição, neste trabalho também foi realizado um teste que avalia combinações de agentes antimicrobianos frente ao micro-organismo, o Checkerboard. Esse teste avalia em um tempo fixo a atividade de inibição do crescimento bacteriano ou bactericida de diferentes combinações com concentrações específicas. As interações são calculadas algebricamente e interpretadas como sinérgica, indiferente ou antagonista, comparando-as com as atividades dos agentes antimicrobianos testados individualmente. Esse teste

deve ser considerado quando a previsibilidade de sinergismo é desconhecida, como com um novo agente antimicrobiano neste caso o extrato do caule e das folhas de *A. urundeuva*, ou quando a previsibilidade não é viável devido ao desenvolvimento de fatores de resistência bacteriana ou falhas no tratamento (BERENBAUM 1978; ELIOPOULOS e ELIOPOULOS, 1988; ELIOPOULOS e MOELLERING JR, 1996, PILLAI e MOELLERING, 2005; MITCHELLI et al., 2012).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos vegetais do caule e das folhas de *Astronium urundeuva*.

### **2.2. Específicos**

- ✓ Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos do caule e das folhas de *A. urundeuva* frente ao *Helicobacter pylori*;
- ✓ Avaliar a existência de sinergismo entre os extratos do caule e das folhas de *A. urundeuva* quando em combinação com claritromicina (CLR), amoxicilina (AMOX), omeprazol (OMP) e a tríplice (TRI), utilizados no tratamento de infecções pelo *H. pylori*.

### 3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a resistência dos micro-organismos em relação aos antimicrobianos existentes e o uso indiscriminado destes, se faz necessária a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos para aliar ao tratamento das infecções (ARIAS e CARRILHO, 2012).

Além disso, na busca por medicamentos que tenham reduzido efeito indesejável, dá-se a importância da inserção do uso de fitoterápicos, aliado também ao seu baixo custo e a uma consciência econômica. Isso gera a necessidade de se testar as plantas medicinais a fim de utilizá-las individualmente ou em associação, melhorando os efeitos da terapia antimicrobiana (VENTUROSU et al., 2011).

Neste trabalho avaliou-se a atividade anti-*Helicobacter pylori* da espécie *Astronium urundeuva*, popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão e associada a ambientes secos do cerrado, savanas e caatingas, sendo encontrada em regiões do nordeste, sudeste e centro-oeste (GAINO et al., 2010). As plantas foram escolhidas com base em seus compostos químicos que possuem possíveis agentes antimicrobianos (DAS et al., 2010).

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Materiais

- agar Müeller Hinton + 5% de sangue de carneiro (AS) - Biomérieux®
- amoxicilina - União Química®
- caldo Müeller-Hinton (CMH) - Difco®

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

#### **4.2. Equipamentos**

- autoclave vertical - Phoenix®
- balança analítica - Shimadzu®
- câmara de fluxo laminar - Veco®
- espectrofotômetro - Pharmacia LKB Ultrospec III®
- espectrofotômetro de microplacas Epoch - Biotek®
- estufa de incubação bacteriológica com CO<sub>2</sub> - Forma Scientific®
- peagômetro - Marconi®
- purificador de água destilada - Millipore®
- purificador de água mili-Q - Millipore®
- ultrassom - Thornton®
- vortex mixer SA8 - Stuart®

### **4.3. Extratos vegetais**

#### **4.3.1. Obtenção e procedência**

Os extratos fazem parte do projeto Biota “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” (processo FAPESP no 09/52237-9), coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Campus Experimental do Litoral Paulista - UNESP - São Vicente.

As folhas e caules de *A. urundeuva* foram coletados em novembro de 2007 em viagens de campo nos municípios paulistas de Bálsamo e Votuporanga pelo pós-graduando Leonardo Perez de Souza. Exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas sendo identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro obtendo o número de registro 1446. O método de extração exaustiva de percolação simples foi utilizado para obtenção do extrato, seguindo a Farmacopeia Brasileira (2010).

#### **4.3.2. Preparo das soluções dos extratos**

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

#### **4.3.3. Espectro de absorção dos extratos vegetais**

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

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

#### **4.4. Cepa Bacteriana**

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

##### **4.4.1. Estocagem e manutenção das cepas**

A cepa de *H. pylori* foi mantida em Caldo Mueller Hinton (CMH) contendo 50% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 50% de glicerol e mantido a temperatura de -20 °C. Para manutenção durante o período de uso, o *H. pylori* foi repicado em CMH acrescido de 50% de SFB e incubado a 37 °C por 72 horas em estufa com 10% de CO<sub>2</sub> e umidade.

#### **4.5. Atividade bacteriana**

##### **4.5.1. Preparo da suspensão bacteriana**

A suspensão foi padronizada a partir de uma cultura em AS de 72 horas com 10% de CO<sub>2</sub>, adicionando-se CMH acrescido de 50% de SFB até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala McFarland (aproximadamente  $6 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 570 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH acrescido

de 50% de SFB, obtendo-se uma suspensão de  $6 \times 10^7$  UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

#### **4.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

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

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80  $\mu$ L de CMH acrescido de 50% de SFB para o *H. pylori*. Em seguida, foram acrescentados 100  $\mu$ L das soluções dos extratos vegetais e então foi realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8  $\mu$ g/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20  $\mu$ L das suspensões do micro-organismo em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a amoxicilina - AMOX (1000  $\mu$ g/mL). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extratos vegetais e o controle negativo (solventes). As microplacas foram incubadas em estufa: a 37 °C por 72 horas com 10% CO<sub>2</sub>. Em cada microplaca foi testado os extratos do caule e das folhas de *A. urundeuva*, sendo que os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.5.3. Ensaio *checkboxboard***

Para avaliar o efeito sinérgico do extrato do caule e das folhas de *A. urundeuva* com amoxicilina (AMOX), claritromicina (CLR) e omeprazol (OMP) (tríplice - TRI) frente ao *H. pylori* foi realizada a técnica de microdiluição modificada para o ensaio Checkerboard de acordo com a metodologia descrita em Pillai e Moellering (2005) e Nogueira (2012)

Para a realização dos experimentos, as soluções de antibióticos (amoxicilina e claritromicina) e omeprazol (inibidor de bomba de prótons) foram preparados individualmente solubilizando-os em água Milli-Q nas concentrações de 250, 125 e 5 µg/mL, determinadas a partir de dados da literatura (LUTHER et al., 2010). Os extratos do caule e das folhas foram avaliados combinados com cada agente antimicrobiano (AMOX e CLR) ou OMP de maneira individual e simultânea (tríplice).

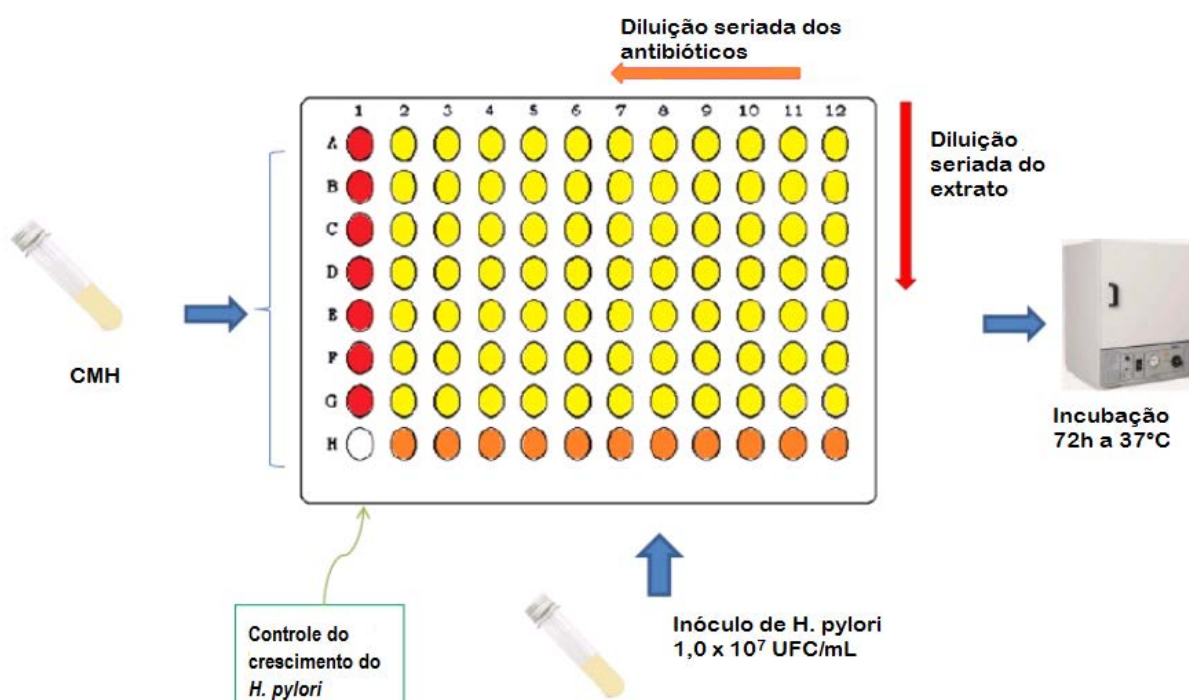
Para os ensaios, a cultura de *H. pylori* foi transferida à solução de PBS e ajustada a turbidez com a escala 2 de McFarland, seguida de leitura espectrofotométrica a 570 nm até obtenção de absorvância 0,23 ( $6,0 \times 10^8$  UFC/mL), e posteriormente diluída na proporção 1:10 para obter-se a concentração de  $6,0 \times 10^7$  UFC/mL, que foi então utilizada nos ensaios.

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH. Na última coluna (nº 12) adicionaram-se 100 µL das soluções de AMOX, CLR e OMP ou da combinação tripla para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100 µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2. Da mesma maneira, na primeira linha (A) adicionou-se 100 µL da solução de extrato do caule ou das folhas (2000 µg/mL) para posterior realização da diluição seriada até a linha G. Portanto, a coluna 1 continha apenas o extrato do caule ou das folhas de *A. urundeuva* e a linha H apenas a AMOX, a CLR e o OMP ou a combinação tripla. No poço H1 foi feito o controle de crescimento bacteriano. Adicionalmente, foram distribuídos 20 µL da suspensão de *H. pylori* em cada poço.

As microplacas foram incubadas por 72 horas à 37 °C em condições de microaerofilia (10% de CO<sub>2</sub>) e após esse período foi realizada a leitura

espectrofotométrica do crescimento bacteriano e a leitura com o revelador resazurina (100 µg/mL), utilizado como indicador de crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em triplicata. A Figura 3 esquematiza a realização do teste em microplacas.

**Figura 4.** Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico do extrato do caule e das folhas de *A. urundeuva* com AMX, CLR, OMP e tríplice.



Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula (Eq1):

$$\text{ICIF} = \text{CIF (AUF)} + \text{CIF (antibiótico)} \text{ (Eq1)}$$

$$\text{ICIF} = \frac{(\text{CIM AUF na combinação})}{(\text{CIM AUF})} + \frac{(\text{CIM antibiótico na combinação})}{(\text{CIM do antibiótico})} \text{ (Eq2)}$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Kumar et al. (2012), conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.

<b>Interação</b>	<b>ICIF</b>
Sinergismo	$CIF \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 < CIF \leq 1$
Indiferente	$1 < CIF \leq 2$
Antagonismo	$CIF > 2$

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; CIF: concentração inibitória fracionada.

#### **4.5.4. Leitura espectrofotométrica**

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

A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada determinada a CIM a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008; HAWSER e ISLAM, 1999).

#### **4.5.5. Leitura com revelador**

Foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100 µg/mL) do qual 30 µL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (O'BRIEN et al., 2000; PALOMINO et al., 2002; FUKUSHIMA et al., 2003).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

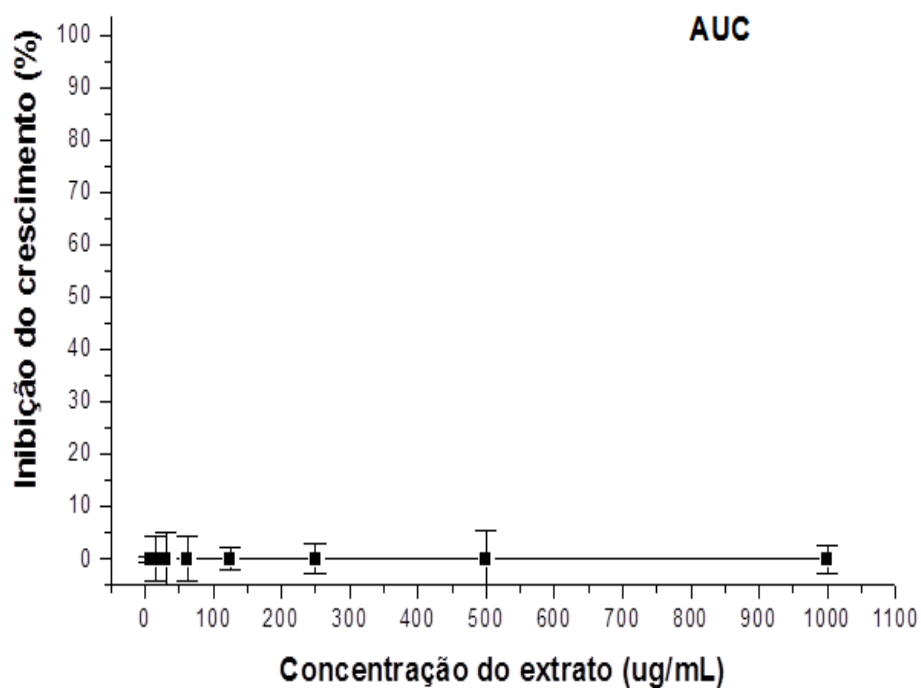
### 5.1. Determinação da CIM dos extratos vegetais

A CIM dos extratos hidroetanólicos do caule e das folhas de *A. urundeuva* estão apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 5 e 6.

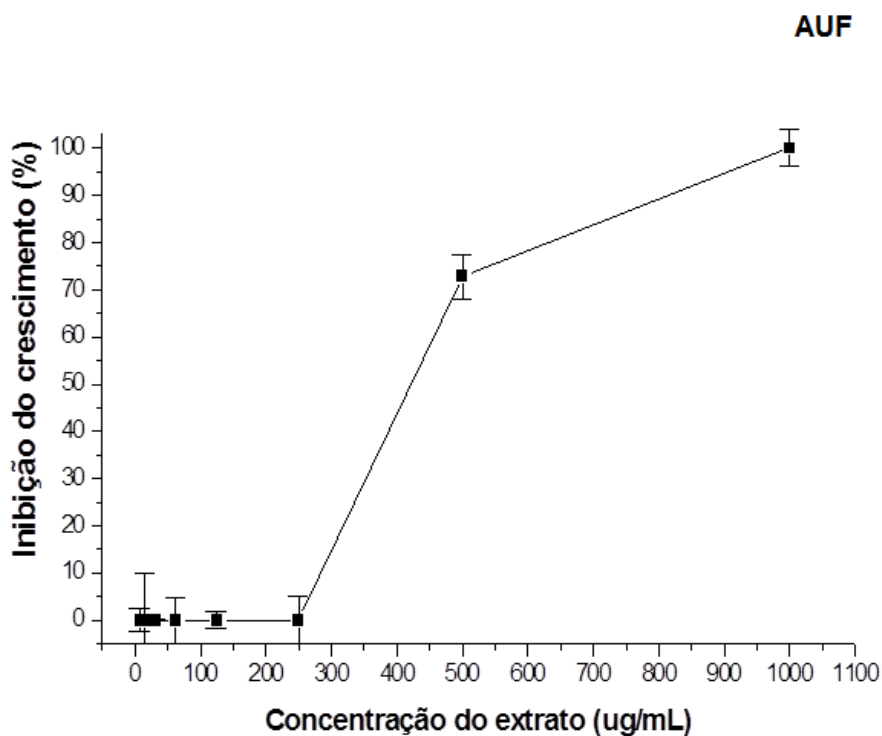
**Tabela 2.** CIM dos extratos hidroetanólicos de caule e folhas de *A. urundeuva* através da revelação com resazurina (0,01%).

Extratos vegetais	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
AUC	>1000
AUF	1000

**Figura 5.** Inibição do crescimento do micro-organismo pelo extrato hidroetanólico de caule de *A. urundeuva*.



**Figura 6.** Inibição do crescimento do micro-organismo pelo extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva*.



O agente revelador resazurina quando preparado apresenta uma coloração azul. Segundo Stoppa (2009) na presença de células viáveis a resazurina sofre oxidação formando a resorufina que tem uma coloração rósea. Dúvidas podem surgir na leitura com revelador uma vez que diferentes tons entre o azul e o róseo podem aparecer, dificultando a determinação da CIM, detectada nesse caso somente quando ocorre uma porcentagem de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 90% (HÖRNER et al., 2008; GUDIÑA et al., 2010; HAWSER e ISLAM, 1999). A revelação com resazurina mostrou que o extrato de caule de *A. urundeuva* não apresentou atividade anti-*Helicobacter pylori*, já o extrato das folhas desta mesma espécie mostrou ser

eficaz contra essa bactéria apresentando CIM de 1000 µg/mL. Esses resultados foram condizentes com a leitura espectrofotométrica, que fornece resultados através da turvação podendo variar de 0 a 100% de inibição de crescimento, sendo um teste mais sensível para detectar o crescimento microbiano.

## 5.2. Ensaio checkerboard

O extrato das folhas de *A. urundeuva* testado isoladamente apresentou CIM de 1000 µg/mL e a amoxicilina e claritromicina de 125 µg/mL ; 0,97 µg/mL respectivamente. Quando testado em combinação, o mesmo apresentou CIM de 7,81 µg/mL quando combinado com a amoxicilina, de 31,2 µg/mL quando combinado com a claritromicina, e de 125 µg/mL quando combinado com a tríplice, comprovando dessa forma seu efeito sinérgico ( $ICIF \leq 0,5$ ) como apresentado na Tabela 3.

Quando combinados com o extrato, a amoxicilina e a claritromicina apresentaram CIM de 0,48 µg/mL e 0,97 µg/mL respectivamente.

**Tabela 3.** Efeito sinérgico do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* frente a amoxicilina (AMOX), claritromicina (CLR), omeprazol (OMP) e a tríplice (TRI).

Substância teste	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		CIF	ICIF	Resultado
	Sozinho	Combinado			
<b>AUF</b>	1000	7,81	0,01		
<b>+</b>				0,01	<b>Sinérgico</b>
<b>AMX</b>	125	0,48	0,01		
<b>AUF</b>	1000	31,2	0,03		
<b>+</b>				0,03	<b>Sinérgico</b>
<b>CLR</b>	0,97	0,97	1,00		
<b>AUF</b>	1000	1000			
<b>+</b>					
<b>OMP</b>	-	-	-	-	-
<b>AUF</b>	1000	125	0,12		<b>Sinérgico</b>
<b>+</b>					
<b>TRI</b>	<b>AMX:15,6</b>	<b>AMX:0,48</b>	0,03	0,12	<b>Sinérgico</b>
	<b>CLR: 7,81</b>	<b>CLR: 0,97</b>	0,12	0,13	<b>Sinérgico</b>

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; AUF: Extrato das folhas de *A. urundeuva*; AMOX: amoxicilina; CLR: claritromicina; OMP: omeprazol; TRI: tríplice.

O método Checkerboard é um ensaio *in vitro* o qual analisa o efeito de combinações de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação distintos no crescimento bacteriano (JACKSON et al., 2009). A terapia de combinação pode ser utilizada para expandir o espectro antimicrobiano, para evitar o surgimento de organismos resistentes, para minimizar a toxicidade, e se obter atividade antimicrobiana sinérgica (KUMAR et al., 2012). Os resultados obtidos neste estudo pelo ensaio Checkerboard mostraram que quando testados em combinação, o extrato das folhas de *A. urundeuva* e a amoxicilina, a CIM foi significativamente inferior (CIM AUFcomb= 7,81  $\mu\text{g/mL}$  e CIM AMOXcomb= 0,48  $\mu\text{g/mL}$ ) do que quando testadas isoladamente (CIM AUF= 1000  $\mu\text{g/mL}$  e CIM AMOX= 125  $\mu\text{g/mL}$ ). Do mesmo modo encontramos os

seguintes resultados para claritromicina em combinação com o extrato (CIM AUFcomb= 31,2 µg/mL e CIM CLRcomb= 0,97 µg/mL) e isolados (CIM AUF= 1000 µg/mL e CIM CLR= 0,97 µg/mL). Para a tríplice (combinação entre AMOX, CLR e OMP) usada no tratamento de doenças causadas por *H. pylori* também encontramos uma significativa queda do CIM de modo que quando testados isoladamente, pode-se observar os seguintes valores: CIM AUF= 1000 µg/mL, CIM AMOX= 15,6 µg/mL e CIM CLR= 7,81 µg/mL, e CIM AUFcomb= 125 µg/mL, CIM AMOXcomb= 0,48 µg/mL e CIM CLRcomb= 0,97 µg/mL. Isso significa que no tratamento para *H. pylori* a dose terapêutica dos antimicrobianos amoxicilina e claritromicina combinado com o extrato das folhas de *A. urundeuva* poderá ser menor, retardando assim o desenvolvimento de resistência ao micro-organismo e melhorando o resultado da terapia.

Esses valores são expressos em índice de concentração inibitória fracionada, calculados por uma equação, sendo que valores  $\leq 0,5$  indicam uma interação sinérgica, sendo que o grau de sinergismo aumenta quando o valor tende para zero (JACKSON et al., 2009). Baseando-se nesta informação, o resultado obtido da associação do extrato das folhas de *A. urundeuva* com amoxicilina, claritromicina e a tríplice foi de uma interação sinérgica.

O papel do omeprazol é inibir de forma irreversível a bomba H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (bomba de prótons), o passo terminal na secreção de ácido. Este fármaco é uma base fraca que se acumula no ambiente ácido dos canalículos das células parietais onde é ativado (SHIN e SACHS, 2008). Desta forma na terapia tripla, ele age sinérgicamente à claritromicina e amoxicilina ao elevar o pH gástrico (LIND et al.,1999). Assim pode-se explicar por que o omeprazol

isoladamente e combinado apenas com o extrato das folhas de *A. urundeuva* não apresentou CIM.

Há outros estudos, como Henley-Smith et al. (2014), que também consideram sinergismo apenas quando o valor da CIM de determinada amostra é reduzida em combinação com alguma outra substância, e não necessariamente através do cálculo do ICIF. A Tabela 4 apresenta os resultados do caule de *A. urundeuva* quando testado isoladamente e quando em combinação com AMOX, CLR, OMP e com a TRI.

**Tabela 4.** Efeito sinérgico do extrato hidroetanólico do caule de *A. urundeuva* frente à amoxicilina (AMOX), claritromicina (CLR), omeprazol (OMP) e a tríplice (TRI).

Extrato	CIM (µg/mL)
AUC	>1000
AUC + CLR	62,5
AUC + AMX	31,25
AUC + OMP	> 1000
AUC + TRI	7,81

Se estes resultados fossem classificados de acordo com Henley-Smith et al. (2014), pode-se considerar que, de certa forma, o extrato do caule de *A. urundeuva* também apresentou ação sinérgica quando combinado com os antibióticos uma vez que apresentou CIMs menores do que quando testado isoladamente quando testados em combinação.

Conforme evidenciado neste estudo, os extratos do caule e das folhas de *A. urundeuva* apresentam diferentes comportamentos em relação à atividade frente ao *H. pylori*. Este fato pode estar relacionado à presença e quantidade de diferentes compostos ativos que podem ou não apresentar atividade antimicrobiana. De acordo com o estudo de Silva et al. (2010) as espécies do gênero *Astronium* sp tem como componentes principais de seu metabolismo os flavonoides, as proantocianidinas, além do alto teor de ligninas

e taninos. Os taninos são compostos muito reativos, que, além de outras, tem também atividade antimicrobiana. Além disso, a ligação às proteínas e adesinas, e inibição de enzimas são capazes de suprimir o substrato microbiano. Estes compostos são facilmente oxidáveis, capazes de se complexar com a parede celular e provocar ruptura da membrana plasmática, além de formar complexos com íons metálicos (COWAN, 1999; ROSSI et al., 2012).

Não foram encontrados estudos na literatura que abordam a combinação do extrato de *A. urundeuva* com os antibióticos mais convencionalmente utilizados na terapêutica de infecções causadas por *H. pylori*.

## 6. CONCLUSÃO

O extrato do caule de *A. urundeuva* não apresentou ação anti-*Helicobacter pylori* nas concentrações testadas, enquanto que o extrato das folhas apresentou pouca atividade (CIM de 1000 µg/mL).

Em relação ao ensaio *checkerboard*, pode-se concluir que a combinação dos extratos das folhas de *A. urundeuva* com os antibióticos mais utilizados na terapia de erradicação de *H. pylori* providenciou CIMs inferiores, com valores de ICIF inferiores a 0,5. Já em relação ao extrato do caule de *A. urundeuva*, apesar de não ter apresentado atividade nas concentrações testadas impedindo o cálculo do ICIF, pode-se inferir que apenas a redução dos valores

de CIMs em combinação com os antibióticos testados já foi o suficiente para deduzir uma possível ação sinérgica, mostrando uma maior efetividade.

## 7. REFERÊNCIAS

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

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

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina Ciênc. Agrar.**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

BANERJEE, D.; MAITY, B.; NAG, S. K.; BANDYOPADHYAY, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Healing Potential of *Picrorhiza kurroa* (Scrofulariaceae) rhizomes against indomethacin-induced gastric ulceration: a mechanistic exploration. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 8, n. 3, p. 1-14, 2008.

BERENBAUM, M. C. A method for testing synergy with any number of agents. **J. Infect. Dis.**, v. 137, n. 2, p. 122-130, 1978.

BOLIVAR, P.; CRUZ-PAREDES, C.; HERNÁNDEZ, L. R.; JUÁREZ, Z. N.; SÁNCHEZ-ARREOLA, E.; AV-GAY, Y.; BACH, H. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, p. 141-147, 2011.

BURNETT-HARTMAN, A.; NEWCOMB, P. A.; POTTER, J. D. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC Virus, and Human Papillomavirus. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 17, n. 11, p. 2970-2979, 2008.

CARMELLO-GUERREIRO, S.M. E PAOLI, A.A.S. Estrutura do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) com notas taxonômicas. **Rev. Bras. Bot.**, v. 23, n. 1, p. 87-96, 2000.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 6ª ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

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

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

CUNHA, F. P.; COSTA, L. J. L.; FERNANDES, A. J. D.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 3, p. 647-652, 2009.

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

ELIOPOULOS, G. M.; ELIOPOULOS, C. T. Antibiotic combinations: should they be tested? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, n. 2, p. 139-156, 1988.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLER JR, R. C. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. (Ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, Md: 1996, p. 330-396.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Fiocruz, 2010, v. 1, p. 236-253.

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

GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conserv. Genet.**, v. 11, n. 5, p. 1631-1643, 2010.

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. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

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

HENLEY-SMITH, C.; STEFFENS, F. E.; BOTHA, F. S.; LALL, N. Predicting the influence of multiple components on microbial inhibition using a logistic response model - a novel approach. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 14, n. 190, doi: 10.1186/1472-6882-14-190.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2014**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago>> Acesso em: 13 set 2014.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **J. Med. Plants Res.**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

KUMAR, S. N.; SIJI, J. V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 3143-3150, 2012.

LIND, T.; MÉGRAUD, F.; UNGE, P.; BAYERDÖRFFER, E.; O'MORAIN, C.; SPILLER, R. The MACH2 study: Role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. **Gastroenterology**, v. 116, n. 2, p. 248-253, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1, 384 p.

LUTHER, J.; HIGGINS, P. D.; SCHOENFELD, P. S.; MOAYYEDI, P.; VAKIL, N.; CHEY, W. D. Empiric quadruple vs. triple therapy for primary treatment of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis of efficacy and tolerability. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 105, n. 1, p. 65-73, 2010.

MANYI-LOH, C. E.; CLARKE, A. M.; NDIP, R. N. Detection of phytoconstituents in column fractions of n-hexane extract of goldcrest honey exhibiting anti-*Helicobacter pylori* activity. **Arch. Med. Res.**, v. 43, n. 3, p. 197-204, 2012.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2 ed., Ed. Manole Ltda, p. 580, 2002.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D. L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 559-68, 2012.

NDIP, R. N.; AJONGLEFAC, A. N.; MBULLAH, S. M.; TANIH, N. F.; AKOACHERE, J. F. T. K.; NDIP, L. M.; LUMA, H. N.; WIRMUM, C. NGWA, F.; EFANGE, S. M. N. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lycopodium cernuum* (Linn) Pic. Serm. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7, n. 22, p. 3989-3994, 2008.

NOGUEIRA, L. G.; Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. 2012. 107p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2012.

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

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PACHECO, M. V.; MATOS, V. P.; FERREIRA, R. L. C.; FELICIANO, A. L. P.; PINTO, K. M. S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Rev. Árvore**, v. 30, n. 3, p. 359-367, 2006.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C. **Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 365-400.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciênc. Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

ROSSI, T.; BRITO, J. O.; BITTENCOURT, E.; ALMEIDA, R. S. R.; FARIA, P. N.; DIAS, C. T. S. Resíduo efluente de eucalipto como extrato corante para o tingimento têxtil de algodão. **Redige**, v. 3, n. 1, 2012.

SAWANGCHOTE, P.; GROTE, P. J.; DILCHER, D. L. Tertiary leaf fossils of Mangifera (Anacardiaceae) from Li Basin, Thailand as examples of the utility of leaf marginal venation characters. **Am. J. Bot.**, v. 96, n. 11, p. 2048-2061, 2009.

SHIN, J. M.; SACHS, G. Pharmacology of proton pump inhibitors. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 10, n. 6, p. 528-534, 2008.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, C.; RODRIGUES-SANTOS, P.; CARVALHO, L. Genotipagem do *Helicobacter pylori* no Carcinoma Gástrico e Gastrite Crônica. **J. Port. Gastreterol.**, v. 18, n. 5, 2011.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Sci. Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

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

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

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

WU, W.; YANG, Y.; SUN, G. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. **Gastroenterol. Res. Pract.**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais**: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001, 500 p.

**De acordo,**

**Aluna:** Maria Luiza Bellizzi Duarte

**Orientadora :** Profa. Dra.Taís Maria Bauab