



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS ARARAQUARA

KAMILA MARIA SILVEIRA NEGRI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE EXTRATOS
HIDROETANÓLICOS DE *Astronium* sp INCORPORADOS OU NÃO EM SISTEMAS
NANOESTRUTURADOS: *IN VITRO* E *IN VIVO***

ARARAQUARA - SP

2015

KAMILA MARIA SILVEIRA NEGRI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE EXTRATOS
HIDROETANÓLICOS DE *Astronium* sp INCORPORADOS OU NÃO EM SISTEMAS
NANOESTRUTURADOS: *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese 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 para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Taís Maria Bauab

ARARAQUARA - SP

2015

Ficha Catalográfica

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

N386a

Negri, Kamila Maria Silveira

Avaliação do potencial biológico de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados: in vitro e in vivo I / Kamila Maria Silveira Negri. — Araraquara, 2015
134 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Taís Maria Bauab

1. *Astronium* sp. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Atividade cicatrizante. 4. Sistemas nanoestruturados. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*Dedico esse trabalho ao meu marido, Antonio Carlos,
pelo apoio prestado em todos os momentos desta
caminhada e aos meus amados pais por todo
carinho e confiança sempre.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho, minhas escolhas e ter sido minha rocha e fortaleza para tornar tudo possível;

Agradeço à minha orientadora Prof^a Taís Maria Bauab por ter aceitado me conduzir neste percurso, por todos os ensinamentos, atenção, paciência, compreensão e contribuição para o meu crescimento científico e intelectual, muito obrigada!

Ao Prof Wagner Vilegas juntamente com o doutorando Leonardo Perez pelo fornecimento dos extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp;

Ao Prof Iguatemi pelo auxílio e orientação para o desenvolvimento dos testes de atividade antioxidante. Agradeço em especial à Renata Assis, por todo auxílio na execução dos ensaios;

Ao Prof Marlus pela colaboração e orientação no desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados. A Dra Patrícia Bento que muito me auxiliou e orientou na execução dos ensaios de farmacotécnica;

Ao Prof Fernando Pavan pela colaboração nos testes de citotoxicidade. Agradeço diretamente a mestrandas Érica Oliveira e Dra Isabel Silva pela execução dos ensaios;

Aos Professores Rosemeire Pietro e Marlus Chorilli que fizeram parte da banca examinadora de qualificação, pelas sugestões e críticas que certamente contribuíram para o enriquecimento deste trabalho;

À Prof^a Dr^a Nunziatina De Tommasi da Università degli Studi di Salerno pela co-orientação e apoio ao meu projeto de estágio de doutorado no exterior. Aos amigos Giovanna, Nicola e a professora Dr^a Mariapaola Germanò pelo apoio e amizade durante meu estágio de doutorado na Itália;

Ao Prof. João Aristeu da Rosa, do Departamento de Ciências Biológicas, pela disponibilização do equipamento analisador. Agradeço também a técnica Nina pelo auxílio na utilização deste equipamento;

À Profa Dra Cláudia Rocha pelas explicações e pelo tempo disponibilizado para me auxiliar no uso do analisador;

Ao Prof Dr. Rodolpho Telaarolli Júnior pela concessão das receitas médicas;

A Profa Dra Marisa Veiga Capela pela ajuda na parte estatística da tese;

Ao pessoal do laboratório: Bruna Bonifácio, Matheus Ramos, Larissa Sposito, Mariana Rozzato, Leonardo Gorla, Luciani Toledo, Irina, Raquel, Malu, Aymê, Isadora, Natália Mathias, Júlia, Caetano, Beatriz, pelos auxílios, momentos de descontração e de entusiasmo compartilhados em conjunto, facilitando minha jornada;

Aos alunos de iniciação científica Victor Lucena e Thaís Jovenazzo pela ajuda na execução dos ensaios *in vivo*;

Às técnicas do laboratório de Microbiologia Edinéia, Mariza, Nathália, Débora, Angélica e Sílvia, pela ajuda e amizade;

Agradeço a Tatiani, Giovana e especialmente a Larissa Sposito, por disponibilizarem moradia, agradáveis refeições e conversas. Meninas, muito obrigada!

Aos meninos e meninas do Grupo de Oração Universitário - GOU Ruah pela oportunidade concedida em servir a Deus na universidade, possibilitando momentos de descontração e de encontro com Deus;

À técnica Elisabete Lepera do laboratório de Farmacologia, pelo auxílio e empréstimo da câmara de CO₂ para eutanásia dos ratos;

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação da FCFAr, Cláudia, Daniela, Joice e Flávia pela dedicação e toda atenção com que cuidam da pós-graduação e de cada pós-graduando;

À todos do Departamento de Ciências Biológicas, que contribuíram com o meu trabalho. Agradeço à secretária Margarete por sua alegria contagiante e amizade;

Ao meu amado marido Antonio pelo amor, respeito, amizade, confiança, companheirismo e principalmente pela paciência e compreensão. Obrigada meu amor!

Aos meus pais por apoiarem meus sonhos e acreditarem na minha capacidade me incentivando sempre a crescer mais e mais. Amo muito vocês!

A minha querida irmã Carla por sempre me apoiar e ser minha grande amiga. Sem você essa jornada seria muito mais difícil. Obrigada querida! Agradeço ao meu cunhado Danilo por todo apoio e amizade;

Ao meu irmão Beto, a minha cunhada Priscila e ao meu sobrinho Thiago por todo apoio e carinho;

A minha querida avó Rosa por todo carinho e orações;

Aos meus sogros pelo apoio e incentivo;

Ao projeto Biota, da FAPESP;

Agradeço à CAPES e ao PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior), pela concessão da bolsa e o suporte financeiro, por me dar a oportunidade enriquecedora de um doutorado-sanduíche na Itália;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara;

À todos aqueles que porventura não tenha mencionado e que contribuíram para o meu crescimento científico e profissional o meu muito obrigada!

RESUMO

As plantas medicinais são de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas. Neste contexto, os pesquisadores vêm a necessidade de se avaliar o potencial biológico das diversas espécies vegetais do Cerrado brasileiro. Dentre estas plantas encontra-se o *Astronium* sp com as espécies *A. urundeuva* (aroeira-do-sertão), *A. graveolens* (guarita) e *A. fraxinifolium* (Gonçalo-alves), utilizadas popularmente como anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-ulcerogênico e cicatrizante. O uso da nanotecnologia é a ferramenta mais moderna para potencializar a ação biológica dos produtos naturais, dentre os sistemas nanoestruturados utilizados destacam-se as microemulsões. Com o objetivo de avaliar o potencial biológico das espécies de *Astronium* sp utilizou os testes de determinação de fenóis e flavonoides, atividade antioxidante, antiangiogênica, incorporação dos extratos em sistemas nanoestruturados, atividade cicatrizante, anti-*Helicobacter pylori* *in vivo*, citotóxica e antimicrobiana *in vitro*. A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais (1000-7,81 µg/mL) foi determinada pela microdiluição frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella setubal* ATCC 19196, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 e *Candida albicans* ATCC 18804. Como controle foi utilizado a amoxicilina (100 µg/mL) para *H. pylori*; a ampicilina (50 µg/mL) para as demais bactérias, e a anfotericina B (32 µg/mL) e fluconazol (256 µg/mL) para *C. albicans*, sendo a resazurina 0,01% (bactérias) e o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 2% - TTC (levedura) utilizados como reveladores. Os extratos foram incorporados em dois sistemas: Sistema 1 [10% de fase oleosa (colesterol), 10% de tensoativo (Brij 98[®] e fosfatidilcolina de soja - 2:1) e 80% de fase aquosa (tampão fosfato pH=7,4)]; Sistema 2 [10% de fase oleosa (colesterol), 10% de tensoativo (Brij 58[®] e fosfatidilcolina de soja - 2:1) e 80% de fase aquosa (tampão fosfato pH=7,4 e Pluronic F127[®] - 0,08%). Ambos preparados por sonicação (amplitude de 10 e 15%, respectivamente, potência 700 watts. Destaca-se os resultados obtidos com o extrato de folhas de *A. graveolens* (AGF) que a incorporação no sistema 2 potencializou a atividade em 32 vezes frente *S. aureus* (AGF não incorporado - CIM = 250 µg/mL e AGF incorporado sistema 2 - CIM = 7,81 µg/mL). Além deste, o extrato de folhas de *A. urundeuva* (AUF) que quando incorporado no sistema 2 apresentou CIM = 1,95 µg/mL, enquanto que o não incorporado apresentou CIM = 125 µg/mL, ou seja, a atividade melhorou 64 vezes quando o extrato foi solubilizado no sistema nanoestruturado estudado. No que diz respeito à atividade contra *C. albicans* o extrato do caule de *A. fraxinifolium* (AFC) que a incorporação nos sistemas 1 e 2 potencializou sua atividade antifúngica (AFC não incorporado - CIM >1000 µg/mL e AFC incorporado sistema 1 - CIM = 62,50 µg/mL e AFC incorporado sistema 2 - CIM = 7,81 µg/mL), tendo sua atividade potencializada em 16 e 128 vezes, respectivamente. Em relação aos ensaios *in vivo* o extrato das folhas de *A. urundeuva* não incorporado reduziu em 60,1% a área da lesão, enquanto que o extrato incorporado no sistema 1 reduziu 79,7% e incorporado no sistema 2 reduziu 78,8% a área da lesão. No modelo utilizado, os extratos incorporados apresentaram valores significativos em comparação com o grupo controle reduzindo em aproximadamente 80% a área total da lesão ulcerativa, porém não houve diferença significativa entre os sistemas nanoestruturados. O extrato hidroetanólico de *A. urundeuva* não incorporado e incorporado nos sistemas nanoestruturados foi administrado aos ratos Wistar na dose de 100 mg/kg, não evidenciando a eliminação de *H. pylori*. Porém, a inoculação do *H. pylori* nos animais com úlceras induzida por indometacina aumentou significativamente a área ulcerada para $58,2 \pm 1,6 \text{ mm}^2$ ($p < 0,05$). Os tratamentos com extratos folhas de *A. urundeuva* não incorporado (100 mg/kg) e incorporado nos sistemas 1 e

2 nas mesmas concentrações reduziu $25,3 \pm 0,8$; $17,5 \pm 1,2$ e $13,8 \pm 1,1 \text{ mm}^2$, respectivamente a área ulcerada. A incorporação dos extratos de *Astronium* sp aumentou a seletividade para as linhagens normais e tumorais. A incorporação no sistema 2 proporcionou mais seletividade do que no sistema 1. O extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporados no sistema 2 demonstrou ser mais ativo contra *S. aureus* em relação ao extrato não incorporado, em até 28 vezes, com baixa citotoxicidade e alta seletividade. O extrato do caule *A. fraxinifolium* incorporado no sistema 2 (IS=105,51) foi altamente seletivo, apresentando-se aproximadamente 135 vezes mais seletivo em relação ao extrato não incorporado (IS<0,76) para *C. albicans*. O extrato da folha de *A. fraxinifolium* foi o que apresentou a maior atividade antiangiogênica com inibição de 30% na formação dos vasos pelo modelo de Zebrafish. O extrato do caule dessa mesma espécie apresentou inibição de 22,6 %. Os extratos de *Astronium* sp apresentaram uma atividade moderada na inibição da ligação de ambos PlGF/Flt-1 e VEGF-A/Flt-1. Concluiu-se que os extratos das folhas e caule de *Astronium* sp apresentaram atividade antioxidante, antiangiogênica e antimicrobiana *in vitro*, destacam-se os extratos das folhas das espécies *A. graveolens* e *A. urundeuva*. A incorporação dos extratos de *Astronium* sp nos sistemas estudados potencializaram a ação antimicrobiana, principalmente frente as cepas de *S. aureus* e *C. albicans*. O extrato das folhas de *A. urundeuva* mostrou-se excelente potencial cicatrizante e sua solubilização nos sistemas nanoestruturados aumentaram a atividade cicatrizante dessa espécie. Estes dados sugerem que a nanotecnologia pode ser aplicada como alternativa terapêutica eficaz em menores doses.

Palavras-chave: *Astronium* sp. Atividade antimicrobiana. Atividade cicatrizante. Atividade citotóxica. Atividade antiangiogênica. Sistemas nanoestruturados

ABSTRACT

The medicinal plants are of great importance in view of the use of the active substances as prototypes for drug development and as a source of pharmaceutical raw materials. In this context, researchers have been the need to assess the biological potential of the various plant species of the Brazilian Cerrado. Among these plants is the *Astronium* sp with the species *A. urundeuva* (aroeira-do-sertão), *A. graveolens* (Guaritá) and *A. fraxinifolium* (Gonçalo-alves), popularly used as anti-inflammatory, antimicrobial, anti-ulcerogenic and healing. The use of nanotechnology is the most modern tool to enhance the biological activity of natural products, among nanostructured systems used there are the microemulsion. In order to evaluate the biological potential of the species of *Astronium* sp used the test determination of phenols and flavonoids, antioxidant, anti-angiogenic activity, incorporating extracts in nanostructured systems, healing activity, anti-*Helicobacter pylori* *in vivo*, *in vitro* antimicrobial and cytotoxic. The minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts (from 1000 to 7.81 µg/mL) was determined by the microdilution against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, ATCC 19196 *Salmonella setubal*, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 and *Candida albicans* ATCC 18804. As control was used amoxicillin (100 µg/mL) for *H. pylori*; ampicillin (50 µg/mL) for the remaining bacteria and amphotericin B (32 µg/mL) and fluconazole (256 µg/mL) for *C. albicans*, and 0.01% resazurin (bacteria) and chloride 2,3,5-triphenyltetrazolium 2% - TTC (yeast) used as revealing. The extracts were incorporated into two systems: System 1 [10% oil phase (cholesterol), 10% surfactant (Brij 98[®] and soybean phosphatidylcholine - 2: 1) and 80% aqueous phase (pH = 7.4 phosphate buffer)]; System 2 [10% oil phase (cholesterol), 10% surfactant (Brij 58[®] and soybean phosphatidylcholine - 2: 1) and 80% aqueous phase (phosphate buffer pH 7.4 and Pluronic F127[®] - 0.08%). Both prepared by sonication (ranging from 10 and 15%, respectively, power 700 watts). The *A. urundeuva* leaf extract (33.68 mgEAG/100g) was the one that had the highest concentration of phenolic compounds and the stem of that kind was the one with the highest flavonoid content (107.19 mgEQ/100g) which consequently demonstrated excellent potential antioxidant. Highlights the results obtained with the *A. graveolens* leaf extract (AGl) the incorporation in the system 2 potentiated the activity 32 times forward *S. aureus* (not embedded AGl - MIC = 250 µg/mL and AGl embedded system 2 - MIC = 7.81 µg/mL). In addition to this, the extract of leaves of *A. urundeuva* (Aul) that when incorporated in the system 2 showed MIC = 1.95 µg/mL while the unincorporated showed MIC = 125 µg/mL, or improved activity 64 times when the extract was solubilized in nanostructured system studied. Regarding to the activity against *C. albicans*, the stem extract of *A. fraxinifolium* (AFs) which incorporation into systems 1 and 2 potentiated their antifungal activity (AFs not incorporated - MIC > 1000 µg/mL and incorporated AFs system 1- MIC = 62.50 µg/mL and AFs system 2 incorporated - MIC = 7.81 µg/mL) and their enhanced activity at 16 and 128 times, respectively. For the tests *in vivo* the extract of leaves of *A. urundeuva* unincorporated reduced by 60.1% the area of injury, while the built-in system 1 extract reduced 79.7% and incorporated into the system 2 reduced 78.8% the lesion area. In the model used, the embedded extracts showed significant values compared to the control group reduced by approximately 80% the total area of ulcerative lesion, but there was no significant difference between the nanostructured systems. The hydroethanolic extract of *A. urundeuva* not embedded and embedded in the nanostructured was administered to Wistar rats at a dose of 100 mg/kg, showing no elimination of *H. pylori*. However, inoculation of *H. pylori* in animals with ulcers induced by indomethacin significantly increased the ulcerated area to 58.2 ± 1.6

mm² ($p < 0.05$). The treatments with extracts of leaves *A. urundeuva* not incorporated (100 mg/kg) and embodied in systems 1 and 2 at the same concentrations decreased 25.3 ± 0.8 ; 7.5 ± 1.2 and 13.8 ± 1.1 mm², respectively ulcerated area. The incorporation of *Astronium* sp extracts increased the selectivity to both normal and tumor cell lines. The incorporation in the system 2 selectivity provided more than system 1. The extract from the leaves of *A. urundeuva* incorporated in the system 2 has proved to be more active against *S. aureus* compared to extract unincorporated, up to 28 times with low cytotoxicity and high selectivity. The stem extract *A. fraxinifolium* incorporated into the system 2 (IS = 105.51) was highly selective, performing about 135 times more selective in relation to unincorporated extract (IS < 0.76) for *C. albicans*. The leaf extract *A. fraxinifolium* showed the most antiangiogenic activity with 30% inhibition in the formation of blood vessels by Zebrafish model. The stem extract of the same species showed inhibition of 22.6%. The extracts *Astronium* sp showed moderate activity in both inhibition of PlGF/Flt-1 and VEGF-A/Flt-1. It was concluded that the extracts of the leaves and stem *Astronium* sp showed antioxidant activity, antiangiogenic and antimicrobial in vitro, we highlight the extracts of leaves of *A. graveolens* and *A. urundeuva*. The incorporation of *Astronium* sp extracts the studied systems improved the antimicrobial action, especially because of the strains of *S. aureus* and *C. albicans*. The extract from the leaves of *A. urundeuva* proved to be excellent healing potential and solubilization in nanostructured systems increased healing activity of this species. These data suggest that nanotechnology may be applied as an effective therapeutic alternative at lower doses.

Keywords: *Astronium* sp. Antimicrobial. Antioxidant. Antiulcer. Cytotoxic. Antiangiogenic activity. Nanostructured systems.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fotografia do <i>Astronium fraxinifolium</i>	27
Figura 2. Fotografia do <i>Astronium graveolens</i>	28
Figura 3. Fotografia do <i>Astronium urundeuva</i>	29
Figura 4. Estruturas químicas das chalconas diméricas (urundeuquina A, B e C).....	30
Figura 5. Estrutura química do monoterpreno δ -3-careno.....	32
Figura 6. Fotografia do estômago com úlcera gástrica	33
Figura 7. Fatores que levam ao desenvolvimento de úlceras gástricas.....	33
Figura 8. Representação esquemática da atuação das enzimas COX-1 e COX-2 e a inibição por AINES	36
Figura 9. Fotomicrografia do <i>Helicobacter pylori</i>	37
Figura 10. Representação esquemática da organização das microemulsões	47
Figura 11. Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando resazurina como revelador	57
Figura 12. Reação de óxido-redução da resazurina	58
Figura 13. Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antifúngica e da CIM utilizando TTC como revelador.....	59
Figura 14. Reação de óxido-redução do TTC	60
Figura 15. Fluxograma do ensaio de inibição da ligação de PlGF e VEGF ao receptor Flt-1.....	63
Figura 16. Reação de óxido-redução do TMB	69
Figura 17. Capacidade de captura do HOCl/OCl ⁻ pelos extratos do caule e das folhas de <i>Astronium</i> sp, expressa em porcentagem de inibição (IC ₅₀)	70
Figura 18. Capacidade de captura da taurina cloramina pelos extratos do caule e das folhas de <i>Astronium</i> sp, expressa em porcentagem de inibição (IC ₅₀)	71
Figura 19. Ensaio da atividade antibacteriana pela técnica de diluição em microplaca (extratos hidroetanólicos frente à <i>S. aureus</i>) revelado por resazurina 0,01%	74
Figura 20. Ensaio da atividade antifúngica pela técnica de diluição em microplaca (extratos hidroetanólicos frente à <i>C. albicans</i>) revelado por TTC 2%	74
Figura 21. Diagrama de fases do sistema S ₁ , no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVO = sistema viscoso opaco; SF = separação de fases; SVT = sistema viscoso transparente; SVST = sistema viscoso semi-transparente	75

Figura 22. Diagrama de fases do sistema S ₂ , no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVO = sistema viscoso opaco; SF = separação de fases; SVT = sistema viscoso transparente; SVST = sistema viscoso semi-transparente	76
Figura 23. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas das espécies de <i>Astronium</i> sp frente ao <i>S. aureus</i>	80
Figura 24. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Astronium</i> sp incorporados no sistema 1 frente ao <i>S. aureus</i>	80
Figura 25. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Astronium</i> sp incorporados no sistema 2 frente ao <i>S. aureus</i>	81
Figura 26. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Astronium</i> sp incorporados no sistema 1 frente ao <i>H. pylori</i>	81
Figura 27. CFM dos extratos hidroetanólicos das folhas das espécies de <i>Astronium</i> sp frente a <i>C. albicans</i>	82
Figura 28. CFM dos extratos hidroetanólicos do caule de <i>Astronium</i> sp incorporados no sistema 1 frente a <i>C. albicans</i>	82
Figura 29. CFM dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Astronium</i> sp incorporados no sistema 1 frente a <i>C. albicans</i>	82
Figura 30. CFM dos extratos hidroetanólicos do caule de <i>Astronium</i> sp incorporados no sistema 2 frente a <i>C. albicans</i>	83
Figura 31. CFM dos extratos hidroetanólicos das folhas de <i>Astronium</i> sp incorporados no sistema 2 frente a <i>C. albicans</i>	83
Figura 32. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos <i>Astronium</i> sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a <i>E. coli</i>	85
Figura 33. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos <i>Astronium</i> sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a <i>S. aureus</i>	86
Figura 34. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos <i>Astronium</i> sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a <i>S. setubal</i>	87
Figura 35. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos <i>Astronium</i> sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a <i>H. pylori</i>	88
Figura 36. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos <i>Astronium</i> sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a <i>C. albicans</i>	89
Figura 37. Efeito dos extratos hidroetanólicos <i>Astronium</i> sp sobre a angiogênese embrionária, no ensaio de <i>Zebrafish</i>	97

Figura 38. Vista lateral do embrião de <i>Zebrafish</i> corado com EAP	97
Figura 39. Comparação da mucosa gástrica após tratamento entre: controle negativo (A, solução salina), controle positivo (B, amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg), tratamentos (C, <i>A. urundeuva</i> não incorporado 100mg/Kg e D e E, respectivamente <i>A. urundeuva</i> 100mg/Kg incorporado nos sistemas 1 e 2).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos sistemas nanoestruturados	53
Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais	66
Tabela 3. Divisão dos grupos experimentais	67
Tabela 4. Quantificação de compostos fenólicos dos extratos do caule e folhas de <i>Astronium</i> sp.....	68
Tabela 5. Quantificação de flavonoides dos extratos do caule e folhas de <i>Astronium</i> sp.	69
Tabela 6. Capacidade de captura do radical DPPH pelos extratos do caule e das folhas de <i>Astronium</i> sp, expressa em porcentagem de inibição (IC ₅₀)	72
Tabela 7. Determinação da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos, pela técnica de diluição em microplaca.....	73
Tabela 8. Determinação do diâmetro das gotículas e índice de polidispersidade (IPD) dos extratos de <i>Astronium</i> sp incorporados nos sistemas nanoestruturados	77
Tabela 9. Trabalho e força mucoadesiva do extrato das folhas de <i>A. urundeuva</i> incorporado nos sistemas microemulsionados 1 e 2	78
Tabela 10. Determinação da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos, pela técnica de diluição em microplaca.....	79
Tabela 11. Determinação do IC ₅₀ e IS dos extratos de <i>Astronium</i> sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para <i>E. coli</i>	90
Tabela 12. Determinação do IC ₅₀ e IS dos extratos de <i>Astronium</i> sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para <i>S. aureus</i>	91
Tabela 13. Determinação do IC ₅₀ e IS dos extratos de <i>Astronium</i> sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para <i>S. setubal</i>	92
Tabela 14. Determinação do IC ₅₀ e IS dos extratos de <i>Astronium</i> sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para <i>H. pylori</i>	93
Tabela 15. Determinação do IC ₅₀ e IS dos extratos de <i>Astronium</i> sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para <i>C. albicans</i>	94
Tabela 16. Determinação do IC ₅₀ e IS do extrato das folhas de <i>A. urundeuva</i> (AUF) incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados.....	95
Tabela 17. Resumo da % de ligação a 500 mg/mL dos extratos de <i>Astronium</i> sp.....	96

Tabela 18. Análise do efeito do extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados S₁ e S₂ em úlcera gástrica induzida por indometacina (40 mg/kg)	98
Tabela 19. Efeito do extrato das folhas de <i>Astronium urundeuva</i> incorporados ou não em sistemas nanoestruturados sobre a produção de urease por <i>Helicobacter pylori</i> e atividade cicatrizante	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O: Água em óleo
AFC: *Astronium fraxinifolium* caule
AFF: *Astronium fraxinifolium* folha
AGC: *Astronium graveolens* caule
AGF: *Astronium graveolens* folha
AINES: Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMH: Agar Müeller-Hinton
AS: Agar Sabouraud
ATCC: *American Type Culture Collection*
AUC: *Astronium urundeuva* caule
AUF: *Astronium urundeuva* folha
BCIP: 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt
CagA: gene associado à citotocina
CBM: Concentração bactericida mínima
CFM: Concentração fungicida mínima
CIM: Concentração inibitória mínima
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMH: Caldo Müller-Hinton
COX: Ciclo-oxigenases
DMSO: Dimetilsulfóxido
EAG: Equivalente de ácido gálico
EAP: Ensaio quantitativo de fosfatase alcalina endógena
EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EHL: Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EQ: Equivalente de quercetina
ERO: Espécies reativas do oxigênio
EtOH: Etanólico
FA: Fase aquosa
FO: Fase oleosa
HCl: Ácido clorídrico
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HOCl: ácido hipocloroso

hpf: *hours post fertilization*

hPlGF: *human placental growth factor*

HRP: *horseradish peroxidase*

H₂SO₄: ácido sulfúrico

hVEGF: *human vascular endothelial growth factor*

IC₅₀: Concentração que promove 50% de inibição

IL-8: Interleucina-8

IL-11β: Interleucina-11 beta

IPD: Índice de polidispersidade

IS: Índice de seletividade

IUG: Índice de ulcerogênese gástrica

MALT: Mucose-associated lymphoid tissue

ME: Microemulsão

MPO: Mieloperoxidase

NaOCl: hipoclorito de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NBT: *Nitrobluetetrazolium*

O/A: Óleo em água

OCl⁻: Ânion hipoclorito

OMS: Organização Mundial da Saúde (Sigla em inglês: WHO)

¹O₂: Oxigênio singlete

O₂^{•-}: Ânion radical superóxido

OH[•]: Radical hidroxil

PBS: *Phosphate buffer saline*

PBS-T: Solução salina tamponada de fosfato com Tween-20

PGS: Prostaglandinas

PlGF: *placental growth factor*

PTU: N-fenil-tiourea

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SF: Separação de fases

SFB: Soro Fetal Bovino

SLT: Sistema Líquido Transparente

SUS: Sistema Único de Saúde

SVO: Sistema Viscoso Opaco

SVST: Sistema Viscoso Semi-Transparente

SVT: Sistema Viscoso Transparente

T: Tensoativo

TauCl: Taurina cloramina

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TTC: Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UFC: Unidade Formadora de Colônia

VacA: Citotoxina vacuolizadora

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

WHO: *World Health Organization*

6-HODA: 6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2 . REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Plantas Medicinais	24
2.1.1 Família Anacardiaceae	25
2.1.2 Gênero <i>Astronium</i>	26
2.1.2.1 <i>Astronium fraxinifolium</i>	26
2.1.2.2 <i>Astronium graveolens</i>	27
2.1.2.3 <i>Astronium urundeuva</i>	28
2.2 Atividade antimicrobiana.....	31
2.3 Atividade antiúlcera.....	32
2.3.1 Úlcera Péptica	32
2.3.2 Fatores agressores da mucosa.....	35
2.3.2.1 AINEs.....	35
2.3.2.2 <i>H. pylori</i>	37
2.4 Atividade antiangiogênica	40
2.5 Atividade antioxidante.....	41
2.5.1 Ácido hipocloroso (HOCl).....	42
2.5.2 Taurina cloramina (TauCl)	43
2.6 A Nanotecnologia como estratégia para desenvolvimento de novos antimicrobianos	44
2.6.1 Microemulsões (ME)	46
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Extratos vegetais.....	49
4.1.1 Obtenção	49
4.1.2 Extração	49
4.2 Ensaios Químicos	50
4.2.1 Determinação de fenóis totais	50
4.2.2 Determinação de flavonoides	50
4.2.3 Atividade <i>scavenging</i> sobre o ácido hipocloroso ou a taurina cloramina	51

4.3 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados	52
4.3.1 Preparo das formulações.....	52
4.3.2 Incorporação dos extratos nos sistemas nanoestruturados	53
4.3.3 Caracterização estrutural dos sistemas	53
4.3.3.1 Determinação do diâmetro das gotículas e índice de polidispersidade (IPD) por espalhamento de luz dinâmico	53
4.4 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva dos sistemas nanoestruturados	54
4.5 Ensaios biológicos.....	54
4.5.1 Preparo das soluções estoques	54
4.5.2 Cepas microbianas.....	55
4.5.3 Estocagem e Manutenção.....	55
4.5.4 Avaliação da atividade antibacteriana.....	55
4.5.5 Padronização da suspensão bacteriana	55
4.5.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	56
4.5.6.1 Realização do teste.....	56
4.5.6.2 Leitura espectrofotométrica	57
4.5.6.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	57
4.5.6.4 Leitura com revelador	58
4.5.7 Avaliação da atividade antifúngica	58
4.5.8 Padronização da suspensão fúngica	58
4.5.9 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	58
4.5.9.1 Realização do teste.....	59
4.5.9.2 Leitura espectrofotométrica	59
4.5.9.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	60
4.5.9.4 Leitura com revelador	60
4.5.10 Determinação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	61
4.5.11 Determinação da atividade antiangiogênica.....	62
4.6 Ensaios biológicos <i>in vivo</i>	64
4.6.1 Animais	65
4.6.2 Determinação da atividade cicatrizante gástrica.....	65
4.6.3 Determinação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori in vivo</i>	67
4.7 Análise estatística	68
5. RESULTADOS	68

5.1 Ensaaios químicos	68
5.1.1 Determinação de fenóis totais	68
5.1.2 Determinação de flavonoides	68
5.1.3 Atividade <i>scavenger</i> de radicais pelo ácido hipocloroso.....	69
5.1.4 Atividade <i>scavenger</i> sobre taurina cloramina	70
5.1.5 Atividade <i>scavenger</i> de DPPH'	71
5.2 Determinação da atividade biológica	72
5.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	72
5.3 Incorporação dos extratos nos sistemas nanoestruturados.....	75
5.3.1 Desenvolvimento dos sistemas	75
5.3.2 Caracterização estrutural dos sistemas	77
5.4 Avaliação <i>in vitro</i> do trabalho e da força mucoadesiva	78
5.5 Determinação da CIM dos extratos de <i>Astronium</i> sp incorporados nos sistemas nanoestruturados	78
5.6 Determinação do IC ₅₀ e IS.....	89
5.7 Determinação da atividade antiangiogênica.....	95
5.7.1 Ensaio de inibição da ligação de PlGF e VEGF ao receptor Flt-195	
5.7.2 Ensaio de angiogênese no modelo experimental Zebrafish.....	96
5.8 Determinação da atividade cicatrizante gástrica	98
5.9 Determinação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> <i>in vivo</i>	99
6. DISCUSSÃO	101
7. CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXOS	128

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana, sendo as principais fontes naturais para a síntese de medicamentos e recursos terapêuticos ao alcance do homem. Nos últimos anos, tem crescido ainda mais o uso terapêutico de produtos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas (LALL e KISHORE, 2014).

De acordo com o *World Health Organization* (WHO, 2014) cerca de 70-95% da população dos países em desenvolvimento depende principalmente de plantas para os seus cuidados de saúde primários. A medicina tradicional é uma parte importante e tem uma longa história de uso na manutenção da saúde, prevenção de doenças e tratamento, particularmente nas doenças crônicas, ganhando popularidade e aprovação, sendo por vezes o único sistema disponível em muitas áreas rurais.

O Ministério da Saúde divulgou uma lista com 71 plantas medicinais que poderão ser utilizadas como medicamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com potencial de utilização contra diabetes mellitus, dores, artrites, úlceras, hipertensão, inflamações e outras doenças crônicas. Essa lista visa orientar estudos e pesquisas, a fim de gerar produtos que possam ser agregados no âmbito do Sistema de Saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Alguns programas municipais ou estaduais distribuem plantas com fins medicinais, como é o caso das espécies *Maytenus ilicifolia* conhecida como espinheira santa, utilizada no tratamento de gastrites e úlceras, e *Mikania glomerata* (guaco) usada para tosses e gripes, medicamentos fitoterápicos fornecidos pelo SUS desde 2008. Entretanto, esses medicamentos são fornecidos em um número ainda incipiente e sem obedecer a padrões científicos de qualidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Na tentativa de superar essa deficiência, a portaria interministerial (2.960/2008) instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como objetivo inserir com segurança, eficácia e qualidade plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS. Além disso, irá promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros. Certamente, com a regulamentação da área e, recentemente, com a política de implantação de fitoterápicos na rede pública (SUS), a fitoterapia no Brasil tem atingido um aspecto mais amplo, com o ideal

voltado também para atender uma maior parcela da população do país (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

A crescente exigência em relação aos parâmetros fundamentais de produção (eficácia, segurança e qualidade), tem contribuído para a integração de diversas áreas científicas na pesquisa de novas espécies vegetais e produtos, como: botânica, agronomia, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, tecnologia farmacêutica, entre outras (DAS et al., 2010).

Neste cenário, um grupo de pesquisadores composto por botânicos, químicos, farmacêuticos e biólogos estão realizando seus estudos em projeto temático intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas” coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, com suporte financeiro da FAPESP (Projeto Biota - processo nº09/52237-9). Esse projeto constitui-se de estudos envolvendo plantas incluídas na lista proposta pelo SUS com atividade em doenças crônicas, em especial as utilizadas no combate a doenças do trato gastrointestinal.

Dentre estas plantas encontra-se o *Astronium* sp, pertencente à família Anacardiaceae.

O gênero *Astronium* compreende várias espécies típicas das savanas existentes no Norte e Nordeste do Brasil (HERNÁNDEZ et al., 2013) e dentre elas destacam-se as espécies *Astronium urundeuva* (aroeira-do-sertão), *Astronium graveolens* (guaritá) e *Astronium fraxinifolium* (Gonçalo-alves, gonçaleiro, pau-gonçalo e muiracatiara) (MAIA et al., 2002). São espécies ricas em taninos hidrolisáveis e condensados, flavonoides, polifenóis, entre outros (SILVA et al., 2012a).

É importante conhecer os constituintes fitoquímicos dessas plantas, bem como o seu potencial biológico. A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* é etapa importante na determinação do potencial biológico de produtos naturais. São utilizados diferentes métodos, sendo aplicados em estudos piloto na triagem de novas substâncias ativas (DAS et al., 2010; ROY et al., 2010).

O conhecimento da atividade antimicrobiana é de fundamental importância devido ao surgimento de infecções oportunistas fatais e de micro-organismos resistentes, como o *Helicobacter pylori*, importante patógeno que está envolvido nos quadros de inflamação persistente na mucosa gástrica com diferentes lesões orgânicas em humanos, tais como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico (KIM et al., 2009; DANDLEN et al., 2011).

A relação entre a infecção causada por *H. pylori*, acidez gástrica e níveis de gastrina tem atraído a atenção de pesquisadores, pois existem evidências de que durante a infecção por este

patógeno há um aumento da acidez gástrica e da secreção de gastrina (GÜRBÜZ et al., 2002; SUZUKI e MOAYYEDI, 2013).

A urease é uma enzima importantíssima na colonização e sobrevivência do *Helicobacter pylori*, pois em meio ácido, hidrolisa a uréia presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia. Atuando, dessa forma, como receptor de íons H^+ , gerando um pH neutro no meio intracelular, o que confere ao *H. pylori* resistência à acidez (WEEK e SACHS, 2001).

Apesar de ainda haver poucos estudos, acredita-se que o poder catalítico das proteases confira importante ação para a colonização gástrica do *Helicobacter pylori*. O fator HtrA (high temperature requirement A) é uma serina protease encontrada com frequência em indivíduos infetados por este micro-organismo, é considerada essencial para a sobrevivência da bactéria. As catepsinas lisossomais e as metaloproteases são proteases abundantes no início da patogênese de doenças mediadas por *H. pylori*, e, portanto acredita-se que esta classe de enzimas (proteases) desempenha um papel funcional na carcinogênese do estômago (WEX e MALFERTHEINER, 2006).

O ácido hipocloroso (HOCl) é o agente oxidante mais tóxico e mais abundante produzido por leucócitos polimorfonucleares. Ele acata biomoléculas importantes e gera outras espécies reativas (ERO). O HOCl reage com amônia produzida pelo *H. pylori* e gera monocloramina, um microbicida também relacionado com injúrias gástricas (SUZUKI et al., 1998; VELLOSA et al., 2007).

A taurina é um aminoácido presente no citoplasma de leucócitos e atua com *scavenger* de HOCl. A taurina reage com HOCl, formando taurina cloramina, exercendo então um papel protetor contra as lesões gástricas decorrentes da geração de monocloramina (KATO et al., 2002). No entanto, a taurina cloramina ainda é um agente oxidante, apesar de bem mais fraco em relação ao HOCl.

Nosso grupo de pesquisa bem como outros pesquisadores tem se voltado para os estudos de cicatrização gástrica e anti-*H. pylori* de produtos naturais de origem vegetal e os resultados evidenciam a referida atividade em animais (LIMA et al., 2008; MOLEIRO et al., 2009, MAZZOLIN et al., 2010; MEHROTRA et al., 2011).

O processo de cicatrização gástrica envolve a produção de alguns fatores de crescimento, tais como o derivado de plaquetas (PDGF), o de crescimento transformante- β (TGF- β), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), destacando-se como as principais citocinas necessárias para estimular a

formação do tecido de granulação. A cicatrização de úlceras é um processo dinâmico que envolve eventos fisiológicos e bioquímicos, a fim de promover e assegurar a restauração da lesão tecidual (SGONC e GRUBER, 2013).

O desenvolvimento e padronização de testes *in vitro* que possam detectar a citotoxicidade de produtos naturais ou mesmo sintéticos para o uso em seres humanos é de grande importância para continuidade dos estudos clínicos. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são amplamente utilizados para avaliar a toxicidade em células humanas em processos de triagem de produtos químicos e farmacêuticos. São utilizados diferentes métodos de estudo para avaliar a viabilidade celular em cultura de células, estes são realizados em microplacas, pois dessa forma possibilitam a utilização de um maior número de concentrações a serem testadas de forma mais rápida. Nestes ensaios de citotoxicidade são utilizados diferentes parâmetros para identificar proliferação e morte celular, podendo ser avaliadas por colorimetria e absorbância devido à incorporação de certas substâncias (FERNANDES et al., 2013).

A utilização de animais em pesquisas para o desenvolvimento de novas tecnologias, vacinas e fármacos, além da geração de conhecimento sobre a biologia das espécies e a interação com o meio ambiente contribuem para a melhoria da qualidade de vida dos humanos (VIANA et al., 2003). Estudos envolvendo animais demonstraram que o *A. urundeuva* possui atividades antiulcerogênica, e pesquisas revelaram efeitos antioxidantes, anti-diarréicos e anti-inflamatórios (VIANA et al., 2003; SOUZA et al., 2007; CARLINI et al., 2010).

O uso da nanotecnologia é uma ferramenta moderna que vem sendo utilizada para reduzir os efeitos tóxicos e potencializar a ação do fármaco, dentre os sistemas nanoestruturados usados destacam-se as microemulsões (ME). O termo "microemulsão" refere-se a uma dispersão termodinamicamente estável formada pela mistura de quatro componentes, água, óleo, tensoativo e cotensoativo (BONIFÁCIO et al., 2014).

Os extratos vegetais apresentam características complexas e a incorporação pode envolver uma mistura de diversos componentes, dificultando o desenvolvimento da formulação (RIBEIRO et al., 2013). O conhecimento das características dos sistemas nanoestruturados obtidos poderá auxiliar o pesquisador, possibilitando o direcionamento do estudo a ser realizado.

2 . REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais têm sido usadas durante séculos, e ainda numerosas culturas dependem do seu uso para a necessidade de cuidados de saúde primários (STREET e PRINSLOO, 2013). A utilização das substâncias ativas presentes nas plantas medicinais foi e continua sendo de grande relevância como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, e como fonte de matérias-primas farmacêuticas (RIBEIRO et al., 2014).

Apesar dos grandes avanços da medicina científica moderna, a medicina tradicional ainda é a principal forma de tratamento de doenças da maioria das pessoas nos países em desenvolvimento, mesmo entre aqueles a quem a medicina ocidental está disponível, visto que o número de pessoas que utilizam uma ou outra forma complementar de medicina está aumentando rapidamente em todo o mundo. Assim, o aumento no conhecimento do processo metabólico e o efeito de plantas sobre a fisiologia humana ampliou o campo de aplicação de plantas medicinais (STREET e PRINSLOO, 2013).

O uso de plantas medicinais e produtos à base de plantas para fins de saúde aumentaram em popularidade em todo o mundo ao longo dos últimos 40 anos, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos. Aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo são de origem vegetal e dos 252 medicamentos considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 27 deles são de origem vegetal. Um número significativo de drogas sintéticas é obtido a partir de precursores naturais (AHMED, 2013).

As empresas farmacêuticas globais munidas com a ciência moderna com alta tecnologia e repleta de ideias começaram a redescobrir as plantas medicinais como uma excelente fonte de novos fármacos, renovando as suas estratégias em favor do desenvolvimento de drogas a partir de produtos naturais (PAN et al., 2014).

O Brasil tem a maior biodiversidade do mundo. Estima-se que há aproximadamente 55 mil espécies descritas correspondentes a 22% do total de espécies no mundo. A grande maioria da população brasileira (80%) consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis no mercado e dependem quase que exclusivamente dos medicamentos de origem natural (DEY et al., 2012; CARVALHO et al., 2014).

As plantas são produtoras de metabólitos secundários, substâncias químicas que podem ser úteis no tratamento de uma grande diversidade de doenças humanas. Estes compostos possuem várias funções no desenvolvimento fisiológico das plantas e também como mediadores de interações entre elas e outros organismos (MATEUS et al., 2014). Uma das funções dos metabólitos secundários é fornecer proteção contra o ataque de organismos patogênicos. Sendo assim, as plantas medicinais e aromáticas possuem uma variedade de componentes, tais como alcaloides, ácidos graxos e compostos fenólicos, que possuem propriedades biológicas (MAZID et al., 2011).

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas pertencentes à família Anacardiaceae. A diversidade dos metabólitos e atividades biológicas tem justificado o enorme interesse no estudo desta família na busca de princípios bioativos.

2.1.1 Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae pertence à ordem Sapindales, subclasse Rosidae e compreende cerca de 70 gêneros e 700 espécies, amplamente distribuídos pelas regiões tropicais, subtropicais e poucas em regiões de climas temperados (MONTANARI et al., 2012).

Os gêneros de Anacardiaceae mais estudados do ponto de vista químico são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira*, *Melanorrhoea*, *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium*. Eles destacam-se pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos (CORREIA et al., 2006; MONTANARI et al., 2012).

A família Anacardiaceae possui algumas espécies com importância alimentar como caju (*Anacardium occidentale* L.), manga (*Mangifera indica* L.), seringueira (*Spondias mombin* L.) e pistache (*Pistacia vera* L.) (MONTANARI et al., 2012).

Aproximadamente 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. Essa dermatite é atribuída principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominados lipídios fenólicos (CORREIA et al., 2006).

Algumas espécies de *Anacardiaceae* têm uso na medicina popular brasileira como anti-inflamatório, cicatrizante, antisséptico, anti-ulcerogênico e nas afecções ginecológicas, pela

presença de taninos e polifenóis, a exemplo da aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*) (CARTAXO et al., 2010; CARLINI et al., 2010).

2.1.2 Gênero *Astronium*

O gênero *Astronium* é neotropical e reúne espécies arbóreas, com frutos de cálice persistente. Apresenta como componente principal flavonoides e taninos condensados como as proantocianidinas dos tipos profisetinidina e prorobinetinidina, além de possuir grande quantidade de polifenóis, entre eles as ligninas (SILVA et al., 2010). As espécies de árvores são nativas das florestas tropicais do Brasil, Suriname, Colômbia e Venezuela (HERNÁNDEZ et al., 2013). Dentre elas destacam-se as espécies *Astronium fraxinifolium* que é conhecida como Gonçalves-alves, gonçaleiro, pau-gonçalo e muiracatiara, *Astronium graveolens* (guaritá) e *Astronium urundeuva* (aroeira-do-sertão) (MAIA et al., 2002).

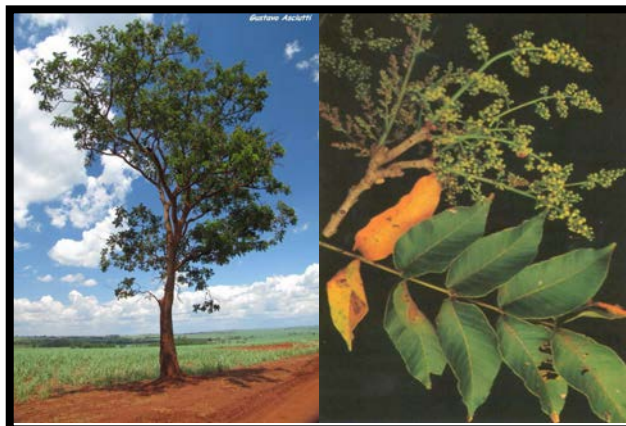
2.1.2.1 *Astronium fraxinifolium*

Astronium fraxinifolium é uma espécie de árvore tropical nativa (Figura 1) da Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, sendo conhecida popularmente como Gonçalves-alves. É considerada a espécie com maior amplitude de distribuição no Brasil, habitando em terrenos rochosos e secos (INGLIS et al., 2014).

A madeira dessa espécie é utilizada na construção civil e naval, na marcenaria, além de ser uma opção para o paisagismo por seu porte médio e beleza da copa (FEITOSA et al., 2011).

A casca é adstringente e utilizada contra diarreias e no tratamento de hemorróidas; as folhas possuem ação anti-séptica, indicadas no tratamento de úlceras da pele; as raízes, quando maceradas, e sob forma de infusão, são utilizadas no tratamento de reumatismo (CALDEIRA-JÚNIOR et al., 2007).

Figura 1. Fotografia do *Astronium fraxinifolium*.



Fonte: Panoramio, 2014; Embrapa, 2014.

A avaliação da atividade leishmanicida, em culturas axênicas de *Leishmania braziliensis* H3227, *in vitro* e *in vivo* dos extratos etanólicos (casca, entrecasca e folhas) e metanólicos (casca e entrecasca) de *A. fraxinifolium* demonstrou que os componentes químicos presentes na casca dessa espécie possuem uma potente atividade leishmanicida na concentração de 2,5 mg/mL (LIMA et al., 2014).

2.1.2.2 *Astronium graveolens*

Astronium graveolens Jacq. é popularmente conhecida como guaritá, é uma árvore tropical que mede aproximadamente 20 a 25 metros de altura, com diâmetro máximo de 40 a 60 cm e suas folhas apresentam cheiro característico (SILVA et al., 2010). Essa espécie (Figura 2) é decídua, perde as suas folhas em época de seca em resposta fisiológica para minimizar a transpiração e é encontrada especialmente em florestas Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Densa, do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul (ARAÚJO et al., 2014).

A madeira dessa espécie é nobre, tendo uma importante representação econômica, pois apresenta alta densidade, elevada dureza ao corte e grande resistência a esforços de flexão e choques, sendo utilizada propriamente na construção civil, obtenção de lenha e carvão, medicinal e paisagismo (ARAÚJO et al., 2014).

As raízes e cascas dessa espécie são utilizadas na medicina popular para tratar alergias, inflamação, diarreia e úlceras (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Figura 2. Fotografia do *Astronium graveolens*.

Fonte: Azuero Earth Project, 2014; Mentis Lúcidas, 2014.

As atividades biológicas dos extratos de caules e das folhas de *A. graveolens* não vêm sendo muito investigadas, e grande parte das investigações se concentram nos estudos fitoquímicos, avaliando principalmente o teor de tanino hidrolisável e a composição do óleo essencial (RODRIGUEZ-BURBANO et al., 2010; SILVA et al., 2011).

A atividade antioxidante e antiangiogênica dessa espécie foi investigada por Hernández et al. (2014), que isolaram a molécula 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-D-glucopirranose, um tanino hidrolisável, e concluíram que esse composto tem um excelente potencial biológico.

2.1.2.3 *Astronium urundeuva*

Astronium urundeuva possui sinonímia sob nome de *Myracrodruon urundeuva* Allemão, conhecida popularmente como aroeira-do-sertão, é uma planta decídua, heliófila e seletiva xerófila, que ocorre em agrupamentos densos, tanto em formações abertas e secas, como em formações fechadas e úmidas. Ela mede cerca de 30 m de altura, podendo variar conforme a região de ocorrência (Figura 3). Seu tronco pode chegar a ter mais de 1m de diâmetro e apresenta larga copa e ramos flácidos (NUNES et al., 2008).

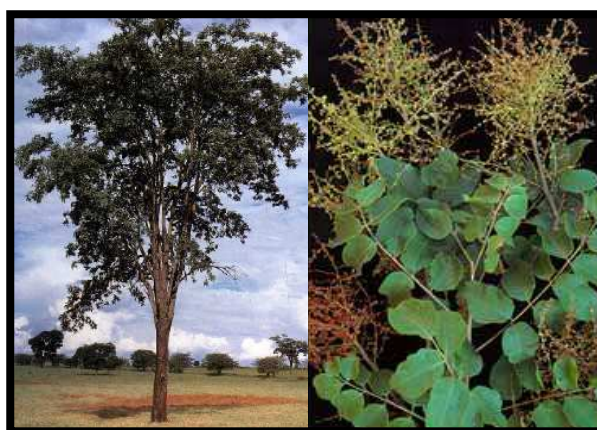
A aroeira-do-sertão é comumente encontrada em ambientes de vegetação arbustiva como no cerrado e na caatinga na América do Sul, principalmente nas regiões semi-árida do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, além da Bolívia, Paraguai e Argentina (CALOU et al., 2014).

A madeira pardo-avermelhada dessa espécie é muito usada na construção civil para a confecção de móveis de luxo e adornos torneados, postes ou dormentes para cercas, devido a

sua elevada resistência mecânica, durabilidade e dificuldade de putrefação. Essa resistência é atribuída pela presença de aproximadamente 15% de tanino na sua casca. Os taninos apresentam efeitos fungicida e inseticida, que a protege da ação de herbívoros e fungos patogênicos (PACHECO et al., 2006; NUNES et al., 2008).

As folhas e cascas dessa espécie possuem propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes, anti-sépticas, antiúlceras, adstringentes, antialérgicas e antimicrobianas, provavelmente, devido à presença de taninos e polifenóis, baixo teores de polímeros de celulose e alto teor de lignina (CARTAXO et al., 2010; CARLINI et al., 2010).

Figura 3. Fotografia do *Astronium urundeuva*.



Fonte: O NORDESTE, 2014.

Cartaxo et al. (2010) fizeram um levantamento das plantas medicinais usadas para tratar várias doenças em uma comunidade rural no estado do Ceará, Brasil. A população da região relatou que utiliza os extratos da aroeira-do-sertão por meio do preparo das folhas, raízes, entrecasca e casca do tronco e galhos para tratamento de infecções em geral, dor de cabeça e de dente, antisséptico, inflamação, entre outras.

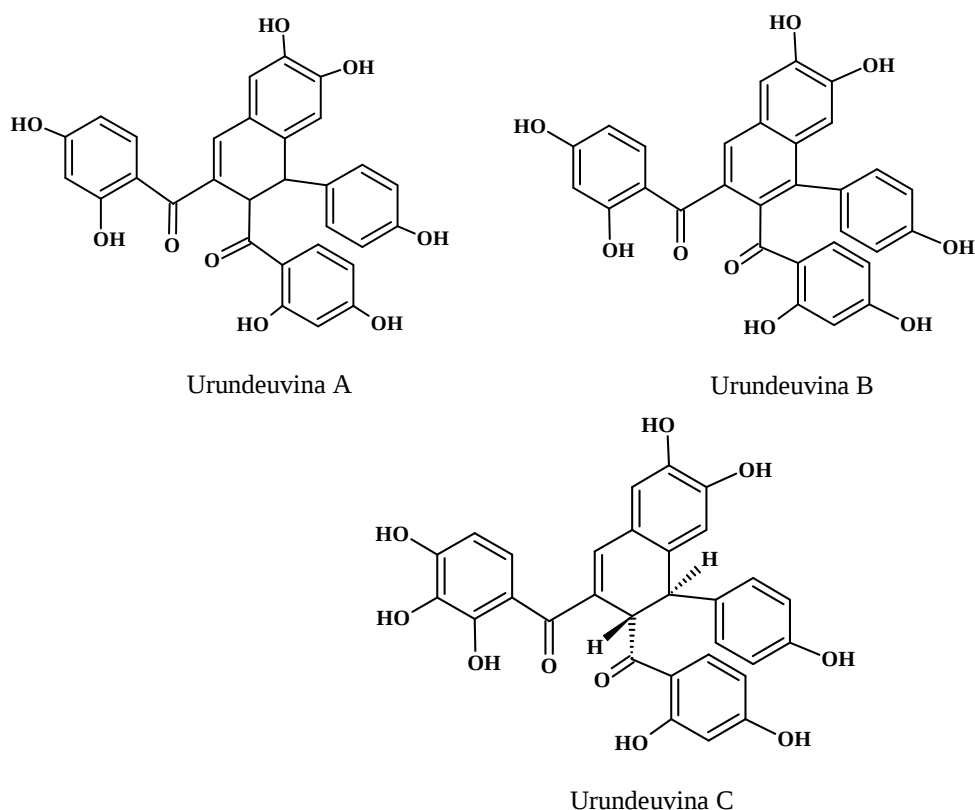
As atividades anti-inflamatórias e antiúlceras da fração enriquecida de taninos isolada do caule de *A. urundeuva* foram avaliadas em camundongo e ratos em modelos de edema de pata induzido por carragenina e modelo de úlcera induzida por etanol e indometacina, demonstrando que a fração inibiu o edema de pata do camundongo e reduziu significativamente as ulcerações gástricas (SOUZA et al., 2007).

Em pesquisas realizadas em modelo de morte celular induzida por 6-hidroxidopamina (6-HODA) em culturas mesencefálicas de ratos foi possível verificar que extratos de *A. urundeuva* apresentaram capacidade de diminuir significativamente e de modo dose-dependente a morte celular. Os autores sugerem que aroeira-do-sertão apresenta efeito

protetor contra as mudanças neurodegenerativas, por inibir o estresse oxidativo e o dano neuronal, sugerindo que o resultado é atribuído as chalconas, substâncias ativas presentes nessa espécie, que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (NOBRE-JÚNIOR et al., 2009; CALOU et al., 2014).

Estudos realizados com o extrato de acetato de etila das cascas da espécie de *A. urundeuva* revelaram que a separação de sete frações químicas resultou na descoberta de duas substâncias com atividade farmacológica, uma rica em chalconas (chalconas diméricas, conhecidas como urundeuquina A, B e C) (Figura 4) e a outra rica em taninos (taninos condensados - catéquico e pirogálico) (VIANA et al., 2003; SOUZA et al., 2007; SILVA et al., 2012a). As chalconas são precursores da biossíntese de flavonoides, e os taninos podem ser classificados como hidrolisável e condensado. Ambas as frações estão envolvidas nas atividades biológicas dessa planta (SILVA et al., 2012a).

Figura 4. Estruturas químicas das chalconas diméricas (urundeuquina A, B e C).



Fonte: adaptado de VIANA et al. (2003).

A atividade inseticida contra *Aedes aegypti*, vetor transmissor da dengue, foi evidenciada em um estudo utilizando o m-pentadecadienil-fenol, substância extraída das

sementes da espécie de *A. urundeuva*. Este composto isolado inibiu a eclosão dos ovos de *Aedes aegypti*, apresentando um excelente potencial larvicida e pupicida (SOUZA et al., 2012).

2.2 Atividade antimicrobiana

A resistência dos micro-organismos patogênicos aos antimicrobianos representa um importante e grave problema para medicina humana, tendo aumentado nas últimas décadas, surgindo assim, a necessidade do desenvolvimento de novas terapêuticas e estratégias de antimicrobianos (KUREK et al., 2012).

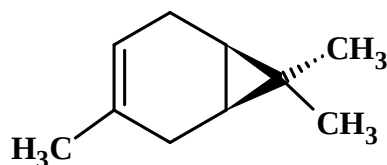
A busca por novas substâncias com atividade antimicrobiana se justifica devido ao fato de que durante várias décadas os micro-organismos patogênicos desenvolveram resistência aos antimicrobianos disponíveis (ROSA et al., 2003). Este fenômeno refere-se a isolados de micro-organismos que são capazes de multiplicar-se em presença de concentrações de antimicrobianos mais altas do que as que provêm de doses terapêuticas dadas a humanos (KUMAR et al., 2005). Isolados de *Candida spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, entre outras, estão se tornando mais resistentes aos múltiplos fármacos, estimulando a busca por novos antimicrobianos comerciais com novos mecanismos de ação (ROSA et al., 2003).

Estudos científicos apontam a capacidade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos da espécie de *A. urundeuva* sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stellatoidea* e *Candida krusei* (ALVES et al., 2009) e *Enterococcus faecalis* (COSTA et al., 2010).

A composição química dos óleos essenciais das espécies de *A. fraxinifolium* e *A. urundeuva* foi descrita por Montanari et al. (2012), que avaliaram o potencial antibacteriano frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como os efeitos oxidativos desses óleos em células bacterianas, quantificando o grau de peroxidação lipídica. Os óleos das espécies de *A. fraxinifolium* e *A. urundeuva* apresentaram atividade antibacteriana, com valores de CIM variando de 0,31 a 1,25 mg/mL, além de provocarem um aumento na peroxidação de lipídeos nas células bacterianas. A atividade antibacteriana do óleo das folhas de *A. urundeuva* pode estar relacionada ao alto teor do monoterpreno δ -3-

careno, principal constituinte (78,8%) do óleo essencial das folhas de *A. urundeuva* (Figura 5).

Figura 5. Estrutura química do monoterpeno δ -3-careno.



Fonte: adaptado de Montanari et al. (2012).

Hernández et al. (2013) investigaram o potencial antibacteriano do óleo essencial das folhas de *A. graveolens* frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella heidelberg*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* com valores de CIM variando de 0,25 a 2 $\mu\text{g/mL}$.

O potencial antimicrobiano das espécies de *Astronium* sp está associado à composição química dos mesmos. Usualmente é determinado por ensaios *in vitro* utilizando técnicas de difusão em ágar e diluição em caldo (macro e microdiluição). As técnicas espectrofotométricas de microdiluição, desenvolvidas em microplacas, possibilitam a utilização de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de produtos químicos que são de grande valia quando se tratam de produtos naturais (COWAN, 1999; LANGFIELD et al., 2004; OSTROSKY et al., 2008).

Desta forma, é possível isolar das plantas medicinais uma variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobianas e antifúngicas e este fato, nos últimos anos vêm despertando um enorme interesse nos cientistas em conseguir produzir novos fármacos antimicrobianos mais seguros, potentes e totalmente eficazes contra patógenos resistentes (AHMAD e BEG, 2001).

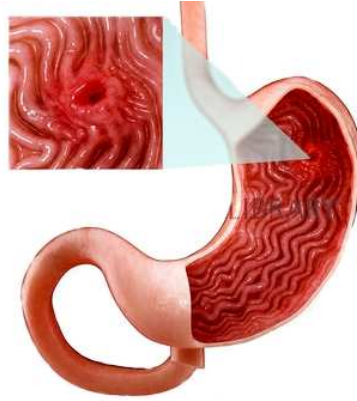
2.3 Atividade antiúlcera

2.3.1 Úlcera Péptica

A úlcera péptica inclui tanto as úlceras gástricas quanto as úlceras duodenais e é considerada a doença crônica mais comum do trato digestivo superior nos adultos (Figura 6).

São caracterizadas por um rompimento na integridade da mucosa e pela perda do tecido superficial, gerando uma inflamação local (SRIKANTA et al., 2010).

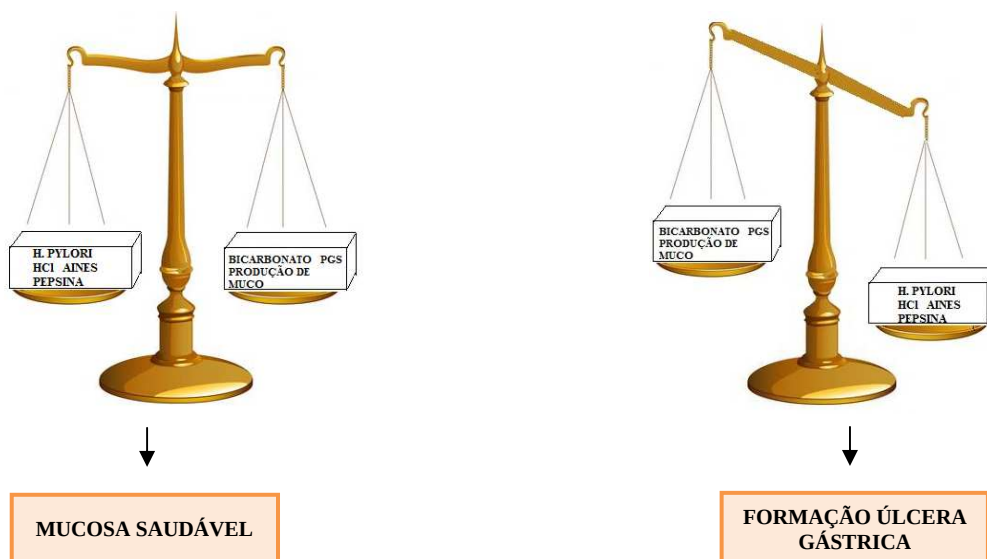
Figura 6. Fotografia do estômago com úlcera gástrica.



Fonte: adaptado de SCIENCE PHOTO LIBRARY, 2014.

As úlceras são provocadas por uma desordem gastrointestinal que ocorre quando há um desequilíbrio entre os fatores agressivos (secreção de ácido clorídrico - HCl e pepsina) e os fatores que defendem a mucosa gástrica como a secreção de bicarbonato e muco, e produção de prostaglandinas (PGS), provocando um dano superficial que é gerado por um processo inflamatório que por sua vez promove a perda de tecido em uma superfície das mucosas (Figura 7) (DONATINI et al., 2009; BRAZ et al., 2013).

Figura 7. Fatores que levam ao desenvolvimento de úlceras gástricas.



Fonte: Autor.

Os principais agressores da mucosa gástrica são o HCl e a pepsina. Seus danos podem ser minimizados ou evitados pelos fatores protetores da mucosa gástrica como a presença da camada intacta de células epiteliais gástricas, camada protetora de mucina, secreção de bicarbonato que neutraliza acidez presente no lúmen, presença de fatores de crescimento, fatores angiogênicos e a presença de prostaglandinas (SRIKANTA et al., 2010).

As PGS diminuem a secreção gástrica por efeito direto nas células parietais, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa e a regulação da síntese de mucina gástrica, e estimulam a secreção de muco e bicarbonato, a indução da angiogênese e várias outras funções para restaurar a integridade da mucosa e, por conseguinte, na cicatrização da úlcera, desempenhando um papel chave no processo de cura da úlcera (ARAKAWA et al., 2012).

A prevalência da úlcera gástrica é de 2,4% na população ocidental e a incidência anual varia de 0,10% a 0,19%. Em certas regiões da China Continental, a prevalência da úlcera gástrica é de 6,07% na população em geral, e 22,5% dos pacientes com sintomas gastrointestinais apresentam úlcera gástrica (BI et al., 2014).

No Brasil, a prevalência de úlceras pépticas é desconhecida, porém foi estimado que no período de 1996 e 2005 aproximadamente 3,3% da população apresentavam úlcera duodenal (JESUS et al., 2013).

O principal sintoma da úlcera péptica sem complicações é a dor epigástrica, que pode ser acompanhado por outros sintomas dispépticos, tais como plenitude, inchaço, saciedade precoce e náuseas. Em pacientes com úlcera duodenal a dor epigástrica ocorre particularmente durante o estado de jejum ou mesmo durante a noite e é normalmente aliviada pela ingestão de alimentos ou agentes neutralizantes de ácidos. Além disso, aproximadamente um terço desses pacientes apresenta azia (MALFERTHEINER et al., 2009).

As úlceras duodenais o tipo mais comum de úlcera péptica, surge no duodeno e podem ser assintomáticas, e esta ausência de sintomas particularmente é vista em úlceras induzidas por anti-inflamatórios não-esteróides (AINES), para os quais a hemorragia digestiva ou perfuração pode ser a primeira manifestação clínica da doença. O sangramento é a complicação mais frequente e grave das úlceras pépticas, e ocorre com maior risco nas pessoas com idade acima de 60 anos (MALFERTHEINER et al., 2009).

As úlceras gástricas afetam cerca de 4 milhões de pessoas por ano em todo o mundo e alguns fatores tais como: fumo, estresse, deficiências nutricionais, uso abusivo e prolongado de drogas como AINES, álcool e infecção por *H. pylori* contribuem para sua formação (THORSEN et al., 2013).

Os fatores etiológicos mais comuns atualmente são a presença da bactéria *H. pylori*, a qual é também responsável pela recorrência ulcerosa e ingestão de AINES. Atualmente, os AINES estão entre os medicamentos mais usados no mundo, e na Europa representa mais de 7,7 % de todas as prescrições. O principal problema com a utilização destes fármacos se deve aos efeitos adversos, especialmente gastrointestinais, provocados por elas como a formação de úlceras gástricas, entre outros que podem gerar complicações no trato gastrointestinal superior e inferior (SOSTRES et al., 2010).

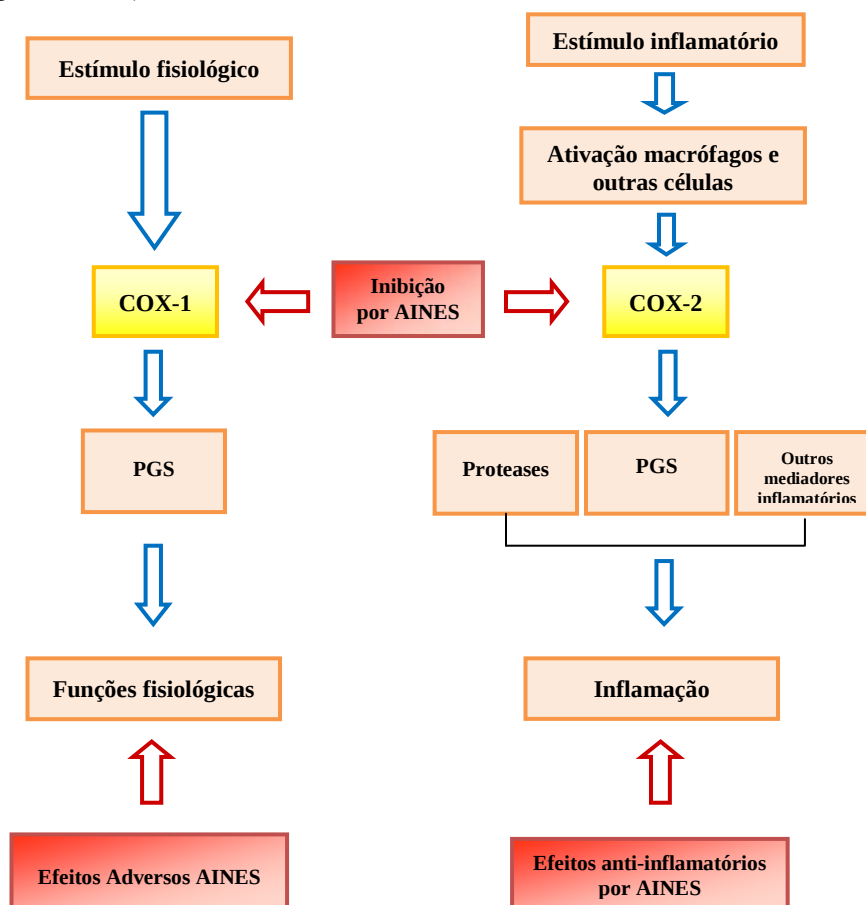
2.3.2 Fatores agressores da mucosa

Como referido, dentre os fatores agressores à mucosa gástrica os mais comuns atualmente são a ingestão de AINES e a presença da bactéria *H. pylori*, a qual é também responsável pela recorrência ulcerosa.

2.3.2.1 AINEs

As úlceras induzidas pelo uso abusivo e prolongado de AINES ocorrem por uma inibição da via das enzimas ciclo-oxigenases (COX), responsável pela síntese das PGS. Os AINES tradicionais e clássicos inibem reversivelmente ambas isoenzimas, ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (BI et al., 2014). A ação anti-inflamatória está relacionada com a inibição da COX-2, enquanto os efeitos adversos advêm da inibição da COX-1 (Figura 8). Por sua vez as PGS têm um efeito citoprotetor da mucosa por inibir a secreção ácida, aumentando a quantidade de muco, além de serem substâncias vasodilatadoras que garantem o aporte nutritivo necessário para o bom funcionamento celular (BI et al., 2014). Além disso, após a formação da lesão na mucosa, os AINES inibem os primeiros eventos de restituição necessários para reparar os danos superficiais iniciais, bem como os eventos posteriores, atuando na redução da proliferação epitelial celular e na redução da angiogênese, promovendo um atraso na cicatrização da úlcera (MUSUMBA et al., 2009).

Figura 8. Representação esquemática da atuação das enzimas COX-1 e COX-2 e a inibição por AINES (adaptado de Rang et al., 2007).



As PGS atuam aumentando a angiogênese através da estimulação da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) promovendo a cicatrização de úlceras gastrointestinais (TAKEUCHI et al., 2010). Por sua vez, o VEGF estimula a formação de novos vasos, promovendo a cicatrização da úlcera (TARNAWSKI e JONES, 2003).

A inibição da PGS é responsável por causar os principais efeitos colaterais com a gastrite, disfunção plaquetária, comprometimento renal e broncoespasmo. A indometacina, um AINE derivado do ácido indolacético, com eficazes ações analgésica e anti-inflamatória, inibe a produção de PGS por meio de uma provável competição com o sítio ativo da enzima ciclo-oxigenase (COX). Além disso, apresenta acentuada recirculação enteropática, o que aumenta os efeitos tóxicos desse fármaco (CHAHADE et al., 2008).

As úlceras duodenais, sangramentos e perfurações ocorrem em aproximadamente 25% das pessoas que fazem usos prolongados de AINES, que podem vir a desenvolver algumas complicações, sendo que 50 a 80% dos casos de hemorragias digestivas estão relacionadas com o uso abusivo e prolongado de AINES (THORSEN et al., 2013).

2.3.2.2 *H. pylori*

Helicobacter pylori, um bacilo Gram-negativo, helicoidal, flagelado, é uma das principais causas no desenvolvimento de úlceras gástricas, mas principalmente duodenais, e é um reconhecido fator de risco para o aparecimento de adenocarcinoma gástrico e linfoma da mucosa gástrica associada ao tecido linfóide (MALT) (SUZUKI et al., 2012). Esta bactéria espiralada e microaerofílica foi descoberta em 1983, sendo identificada em muitos pacientes com úlcera péptica ativa (Figura 9). Foi inicialmente designada por *Campylobacter pylori*, denominação esta que posteriormente foi alterada para *H. pylori* (PROCTOR e DEANS, 2014).

Figura 9. Fotomicrografia do *Helicobacter pylori*.



Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY, 2015.

Infecção por *H. pylori* é geralmente adquirida na infância, muitas vezes por falta de higiene da criança. Os índices de prevalência são mais elevados nos países em desenvolvimento, pelo baixo nível socioeconômico, falta de saneamento e/ou higiene, condições essas que normalmente estão associadas ao desenvolvimento do país. Porém a prevalência está diminuindo em todo o mundo e é baixa na Europa Ocidental e América do Norte. Na maioria dos países asiáticos, da América do Sul e da África a prevalência permanece relativamente elevada (URS et al., 2014).

Esta bactéria é responsável por até 95% das úlceras duodenais e 70% de úlceras gástricas. Atualmente metade da população do mundo está infectada com *H. pylori*, entretanto, somente cerca de 5-10% desses indivíduos desenvolverão ulceração sintomática (STEWART e ACKROYD, 2011; PROCTOR e DEANS, 2014).

A variação na patogenicidade pode ser explicada pelo fato de que o genoma da bactéria codifica alguns fatores de virulência que estão envolvidos no processo de formação da úlcera

(PROCTOR e DEANS, 2014). Os principais fatores são as toxinas CagA , VacA e as proteínas de membrana externa que atuam juntamente com adesinas como o OipA e Bab2, sendo considerados fatores de grande importância na determinação dos índices de cura (SUGIMOTO e YAMAOKA, 2009).

CagA (gene associado a citotoxina) é uma proteína com aproximadamente 140 kDa de massa, altamente imunogênica e codificada pelo gene *cagA* presente em mais da metade das cepas de *H. pylori* (BARBOSA E SCHINONNI, 2011). Essa proteína é a mais significativa por desencadear uma resposta inflamatória, pois interage mais de perto com as células epiteliais e induz um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), afetando significativamente o muco e a concentração de bicarbonato da superfície celular, bem como a secreção ácida. Esses eventos são resultantes da atuação dessas citocinas nas células D, inibindo a produção de somatostatina e consequentemente aumentando a secreção ácida (MAJUMDAR et al., 2011).

Outro fator de virulência com papel crucial na patogênese da *H. pylori* é a proteína VacA, citotoxina vacuolizadora, descoberta como uma proteína secretada pela *H. pylori* e que induz *in vitro* uma grande vacuolização citoplasmática. Essa toxina desempenha algumas funções como a vacuolização celular, apoptose e ativação e proliferação dos linfócitos T CD4 positivos (BARBOSA E SCHINONNI, 2011).

Sugimoto e Yamaoka (2009) investigaram a relação entre os genótipos dos fatores de virulência com o grau de cura na erradicação terapêutica de *H. pylori*. Eles verificaram, por meio de metanálise, que a taxa de cura em pacientes infectados com cepas CagA-positivas foi em média 83,1%, enquanto a média dos pacientes infectados com cepas CagA-negativas encontrada foi de 69,9%. Deste modo, concluíram que as taxas de cura foram menores em pacientes CagA-negativos do que em pacientes CagA-positivos. A relação entre o sucesso ou o fracasso da terapia de erradicação de *H. pylori* relacionado ao fator CagA foi explicado pelo aumento da inflamação da mucosa gástrica encontrado em cepas CagA-positivas.

A disseminação do *H. pylori* para o corpo do estômago promove um processo inflamatório que danifica a mucosa gástrica, afetando o mecanismo de defesa natural. Com isso, ocorre a liberação de mediadores e o recrutamento de células do processo inflamatório, entre elas os neutrófilos que, por sua vez, atraem linfócitos T e B, células do plasma e macrófagos, bem como induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, com a presença da *H. pylori*, a produção de imunoglobulinas que, em vez de conduzirem à

erradicação da bactéria, aumentam a lesão inflamatória da mucosa por se ligarem aos antígenos de superfície das células epiteliais gástricas (PEEK et al., 2010).

H. pylori tem maior facilidade em atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico por apresentar um formato helicoidal espiralado. A bactéria induz irritação local, resultando numa resposta inflamatória na mucosa que pode levar a danos epiteliais. Para auxiliar na sua sobrevivência, a bactéria *H. pylori* produz grandes quantidades de urease, uma enzima que hidrolisa a uréia formando amônia, dióxido de carbono e bicarbonato, o que neutraliza a acidez gástrica, permitindo a sua colonização e protegendo-a do ambiente hostil gástrico (STEWART e ACKROYD, 2011).

O *H. pylori* coloniza a mucosa gástrica, predominantemente no antro e canal pilórico do estômago. Esta localização deve-se ao fato desta ser uma zona de transição, com um gradiente de pH ótimo para a sua colonização (STEWART e ACKROYD, 2011).

As úlceras duodenais geralmente são causadas pela hipersecreção ácida que agride as células epiteliais da mucosa duodenal. A hipersecreção gástrica é em decorrência das citocinas pró-inflamatórias atuarem nas células D, inibindo a produção de somatostatina com consequente aumento da secreção de gastrina. A gastrina estimula as células parietais do corpo do estômago que secretam ácido clorídrico e pepsina (MAJUMDAR et al., 2011).

A erradicação desta bactéria Gram-negativa contribui para o tratamento e a prevenção dessas doenças gastroduodenais. Uma vez que este processo auxilia na cicatrização tanto das úlceras gástricas como de úlceras duodenais, geralmente proporcionando o desaparecimento das úlceras. O tratamento adotado atualmente como opção de primeira linha é a terapia tripla que consiste de uma combinação de um inibidor de bomba de prótons e dois antibióticos como a claritromicina e amoxicilina ou metronidazol/tinidazol. Esta terapia tem duração de 7 a 14 dias, duas vezes por dia (LOPES et al., 2014).

Os inibidores de bomba de prótons têm se revelado como opção de tratamento eficaz em pacientes com as patologias gastrointestinais. Entretanto, após a infecção com o *H. pylori* ter sido relacionada a gastrites crônicas, e recidivas frequentes de gastrite e úlcera péptica, a erradicação da bactéria tem sido preconizada como tratamento de primeira linha no mundo todo. No entanto, caso a erradicação da bactéria falhe, ou não seja indicada, não existe nenhuma alternativa de tratamento recomendado para pacientes portadores de gastrite com sintomas de dispepsia (SANTOS et al., 2010).

2.4 Atividade antiangiogênica

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais e musculares lisas (formam o revestimento interno e externo dos vasos) que crescem em resposta a sinais específicos ou fatores (HANAHAAN e WEINBERG, 2011). Este processo é fundamental em muitas condições patológicas como o câncer, inflamação e formação de metástases (PESCA et al., 2013). A angiogênese e a metástase tumoral são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem etapas fisiopatológicas como mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular, levando à formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (STOCKMANN et al., 2014).

Folkman (1995) descobriram que o crescimento de tumores é dependente do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e, deste modo, a inibição da angiogênese pode impedir a progressão do tumor (STOCKMANN et al., 2014).

Os mecanismos de inibição da angiogênese *in vivo* podem envolver apoptose celular, inibição da sinalização dos receptores dos fatores de crescimento ou da expressão e/ou ativação das metaloproteinases, porém ainda não foram completamente elucidados (SCODITTI et al., 2012).

Existem diferentes métodos para se avaliar a atividade antiangiogênica como os ensaios de neovascularização da córnea, ensaios *in vitro* e *in vivo* da membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (CAM - *chicken embryo chorioallantoic membrane*), e um grupo de ensaios que usam implantes de esponjas contendo células ou substâncias a serem testadas, os quais correspondem a uma angiogênese inflamatória (AUERBACH et al., 2003).

A membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha é uma membrana extra-embrionária composta por um epitélio de múltiplas camadas. A mesoderme se funde com a ectoderme coriônica, que se encontra abaixo da membrana da casca (AUERBACH et al., 2003; LOKMAN et al., 2012). Além disso, a CAM contém proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, a laminina, o colágeno tipo I e integrina $\alpha_v\beta_3$ (LOKMAN et al., 2012).

O ensaio de CAM tem sido amplamente utilizado, devido ao seu baixo custo, facilidade e simplicidade de execução (AUERBACH et al., 2003). Porém ele vem sendo substituído pelo modelo animal de experimentação científica, o *Danio rerio*, conhecido como Zebrafish ou Peixe-Zebra que é uma das espécies de vertebrados que mais tem sido usada em estudos relacionados a diversos campos científicos, como na investigação do câncer, onde esse modelo é utilizado em ensaios de angiogênese embrionária. As características como a fácil

manutenção e reprodução, alta fecundidade (200-500 ovos/acasalamento), desenvolvimento rápido, e homologia com os mamíferos são as principais razões para o interesse do meio científico no Zebrafish (ESCH et al., 2012; KARTHIK et al., 2014).

Os ensaios *in vitro* abrangem a avaliação da proliferação, migração e formação em tubo, ensaios estes que são realizados em cultura de células, e do anel aórtico (cultura de órgãos) (AUERBACH et al., 2003).

Os ensaios de angiogênese são utilizados com objetivo de testar a eficácia dos agentes proangiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular - VEGF) e antiangiogênicos (endostatinas) (TARALLO et al., 2011). Dentre as inúmeras moléculas indutoras da angiogênese, se destaca o VEGF, que se constitui em uma família de moléculas mitogênicas endoteliais, com participação central na regulação da proliferação vascular, podendo ter sua expressão induzida ou reprimida conforme a oxigenação tecidual (OLIVEIRA et al., 2010). Os principais receptores de membrana que parecem envolvidos nas cascatas de transdução de sinal em resposta ao VEGF são uma família de receptores tirosina-quinase, tais como VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGFR-1 também conhecido como FLT 1 pode ter um papel negativo, suprimindo a sinalização do VEGFR-2. A expressão de VEGFR-1, bem como de seus ligantes PlGF e VEGFB, está aumentada em vários tumores, e tem relação com a progressão da doença e prediz prognóstico ruim, metástases (FISCHER et al., 2008). O VEGFR-2 também conhecido como FLK 1 é o principal mediador nos efeitos do VEGF no crescimento e permeabilidade dos vasos. O VEGFR-3 está presente basicamente nos vasos linfáticos e parece levar à proliferação destes (OLIVEIRA et al., 2010).

O VEGF e os seus receptores de membrana desempenham um papel essencial na sua regulação, e tornaram-se um alvo atraente nos processos de anti-angiogênese (PONTICELLI et al., 2008). Portanto, existe uma necessidade crescente de moléculas capazes de modular a ativação de VEGF para as abordagens terapêuticas (LEPORE et al., 2011).

2.5 Atividade antioxidante

Um antioxidante é definido como qualquer substância, quando em pequenas quantidades, é capaz de retardar ou inibir processos oxidativos, como, por exemplo, a lipoperoxidação (ATOUI et al., 2005; CHUN et al., 2005). A formação de espécies reativas é equilibrada naturalmente pela existência de compostos conhecidos como antioxidantes (STANNER e WEICHSELBAUM, 2013).

Em sistemas aeróbios, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as espécies reativas de oxigênio - ERO) e o sistema de defesa antioxidante. As ERO são geradas endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 , mas também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos, o que provoca a redução incompleta de O_2 (STANNER e WEICHSELBAUM, 2013). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: i) uma delas atua na desintoxicação do agente antes que ele cause a lesão, e é constituída pela glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; ii) a outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular. Quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano por espécies reativas pode resultar no estresse oxidativo (RAJENDRAN et al., 2014).

As estruturas químicas que apresentam um ou mais elétrons não pareados são definidas como radicais livres. Os radicais são muito instáveis, extremamente reativos e com uma grande capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas macromoléculas. Podendo ser formados por absorção de radiação (ultravioleta ou visível), por reações redox ou por processos de catálise enzimática (NEERAJ et al., 2013).

O termo ERO não é usado apenas para incluir radicais de oxigênio (espécies radicalares), mas também alguns não radicais derivados do O_2 (espécies não radicalares) capazes de gerar radicais livres, como exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl), entre outros (NEERAJ et al., 2013).

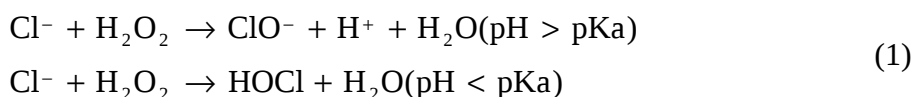
As ERO estão diretamente relacionadas aos prejuízos gástricos detectados, na presença de *Helicobacter pylori*; grandes quantidades de amônia são geradas e estas estimulam a ativação dos neutrófilos produtores de ácido hipocloroso, os quais reagem com o aminoácido taurina formando a taurina cloramina (VELLOSA et al., 2007).

2.5.1 Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl é um oxidante extremamente forte e além de atacar biomoléculas de importância fisiológica, tais como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos e ascorbato, é capaz de gerar outras ERO, tais como oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxil

(OH[•]) via sua reação com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido (O₂^{•-}), respectivamente (VELLOSA et al., 2007).

O HOCl é formado pela oxidação de íons cloreto (Cl⁻), catalisada pela mieloperoxidase (MPO) em presença de peróxido de hidrogênio (equação 1). O HOCl pode ser considerado como o mais abundante oxidante gerado por leucócitos do sangue (NEERAJ et al., 2013).



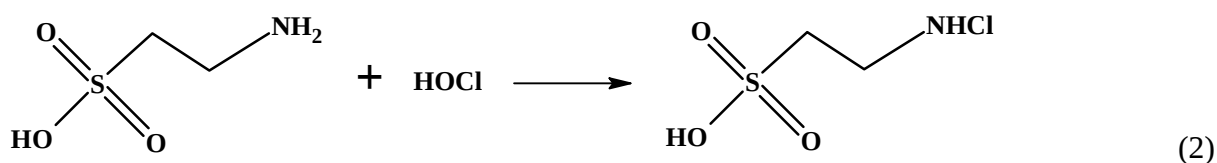
O HOCl apresenta ações: i) protetora ao nosso organismo, à medida que participa do processo de destruição de micro-organismos, mas, ao mesmo tempo, ii) agressora aos tecidos, pois células de mamíferos ou de bactérias podem detoxificar o HOCl por via catalítica, visto que estão ausentes defesas enzimáticas contra oxidantes clorados (NEERAJ et al., 2013).

A MPO é uma proteína catiônica em pH fisiológico e, portanto, apresenta a capacidade de se ligar a estruturas biológicas aniônicas, tais como fosfolipídeos de membranas celulares, além de catalisar a geração de HOCl e assim favorecer injúria celular (PULLI et al., 2013). A MPO foi encontrada em lesões ateroscleróticas humanas, sugerindo função de oxidantes clorados nos processos aterogênicos (ZHANG et al., 2001).

2.5.2 Taurina cloramina (TauCl)

Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa contra infecções bacterianas, bem como em respostas inflamatórias. Estas células geram diversos oxidantes altamente reativos quando são recrutadas para o local da inflamação. HOCl é o principal entre estes, sendo um potente oxidante e importante microbicida, entretanto, quando produzido em excesso, promove danos oxidativos nos tecidos e contribui para o desenvolvimento ou progressão da doença (KLAMT e SHACTER, 2005).

A taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico), um aminoácido que contém ácido sulfônico em sua composição, é o mais abundante aminoácido intracelular em seres humanos, atingindo concentrações de 20 -50 mM em leucócitos (SALZE e DAVIS, 2015). Quando estimulados, os neutrófilos liberam grandes quantidades de taurina, que são rapidamente cloradas por reação com o HOCl, gerando TauCl (equação 2) (KLAMT e SHACTER, 2005).



A presença de taurina e a formação de TauCl em locais inflamatórios promove um mecanismo de desintoxicação para HOCl, proporcionando proteção contra a citotoxicidade induzida por neutrófilos. A TauCl é mais estável e menos tóxica do que o HOCl, mas ainda mantém potencial oxidativo (KLAMT e SHACTER, 2005).

As cloraminas podem ter curta ou longa duração, apresentando caráter lipofílico ou hidrofílico, sendo que as lipofílicas de longa duração difundem-se através da membrana plasmática com maior facilidade, gerando danos oxidativos a grandes variedades de biomoléculas (VELLOSA et al., 2007).

TauCl desempenha um papel fundamental na modulação da resposta imune, promovendo uma redução na expressão de mediadores inflamatórios como as citocinas, quimiocinas, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e inibindo a transcrição intracelular de óxido nítrico sintase e a produção de óxido nítrico, permitindo com que o processo de morte celular seja via apoptose, sendo este considerado mais vantajoso, e não via necrose, com uma variedade de células (KIM et al., 2013).

2.6 A Nanotecnologia como estratégia para desenvolvimento de novos antimicrobianos

A nanotecnologia é uma ciência inovadora que inclui, em termos gerais, o desenvolvimento, a obtenção e a caracterização de sistemas em escala nanométrica. É considerada atualmente como um dos maiores avanços na área de conhecimento e é uma das principais atividades de pesquisa e desenvolvimento em diversos países (RAJ et al., 2012).

As aplicações da nanotecnologia em diversas áreas, principalmente na área da saúde, estão se tornando cada vez mais intensa. Alguns medicamentos tradicionais administrados pelos métodos convencionais de terapêutica farmacológica apresentam alguns problemas na sua absorção, além de possuírem alta toxicidade e efeitos adversos indesejáveis. Por esta razão, é de extrema importância a busca por um sistema de liberação controlada com o objetivo de maximizar a atividade do fármaco e reduzir os efeitos colaterais (RAJ et al., 2012).

Kesarwani e Gupta (2013) relatam que diversas plantas medicinais, apresentam um excelente potencial biológico *in vitro*, porém demonstram pouca ou nenhuma ação *in vivo* devido à sua baixa solubilidade lipídica e/ou tamanho molecular inadequado, resultando em uma baixa absorção e ao elevado metabolismo destes compostos.

A baixa biodisponibilidade é um dos principais problemas que limitam a investigação dos efeitos terapêuticos de muitas substâncias potencialmente valiosas (DANDEKAR et al., 2010). Por vezes, essa baixa disponibilidade é atribuída à baixa solubilidade de algumas substâncias em água, o que implica muitas vezes na degradação da substância no trato gastrointestinal e na rápida eliminação sistêmica (BHADORIYA et al., 2011). Assim sendo, para que essas substâncias alcancem os efeitos terapêuticos no corpo humano muitas vezes é necessário aumentar a dose de consumo, o que poderá originar características organolépticas indesejáveis e o aparecimento de problemas de toxicidade (DANDEKAR et al., 2010).

Novas estratégias de base nanotecnológica estão sendo estudadas a fim de melhorar a biodisponibilidade, além de outros fatores como a captação celular, as taxas de dissolução, a estabilidade e atividade farmacológica (BHADORIYA et al., 2011).

As estratégias tecnológicas que apresentam a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de princípios ativos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico, são promissoras para veiculação de extratos vegetais. Dentre estas estratégias, destaca-se a utilização de sistemas de liberação de fármacos, o que tem permitido o aumento da eficiência de uma série de substâncias, a reintrodução de outros princípios ativos anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis (MAINARDES et al., 2006; SAINI et al., 2014).

Deste modo, durante os últimos anos, têm sido desenvolvidos novos veículos com o objetivo não só de aumentar a seletividade e eficácia de princípios ativos, como, também, permitir a redução da dose total necessária, minimizando os efeitos colaterais tóxicos, possibilitando o controle da liberação (GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009). Além de melhorarem a solubilidade e a estabilidade dos fármacos, possibilitando maior biodisponibilidade, proporcionam ação prolongada, vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo, podendo veicular substâncias ativas com diferentes graus de hidrofília/lipofília na mesma formulação (SINTOV e SHAPIRO, 2004).

Em virtude do grande número de citações na literatura científica, as indústrias farmacêuticas têm se interessado no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, os quais apresentam vantagens relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação

controlada de fármacos, além de protegerem princípios ativos da degradação térmica ou fotodegradação (MOHANRAJ e CHEN, 2006; GUTERRES et al., 2007).

Considerando as propriedades terapêuticas dos produtos naturais e as diversas vantagens proporcionadas pelos sistemas nanoestruturados, muitos estudos mencionando o desenvolvimento de nanopartículas carreadoras de compostos naturais vêm sendo publicados (RAJENDRAN et al., 2013; TUBESHA et al., 2013; BIDONE et al., 2014). Um expressivo número de publicações abordando a inclusão de ativos naturais com propriedades biológicas em sistemas nanoparticulados pode ser observado (AHMED et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2013; GULER et al., 2014; BONIFÁCIO et al., 2014; SILVA et al., 2014).

A administração dos fármacos para o tratamento de doenças crônicas é preferencialmente realizada pela via oral, porém os compostos ativos quando administrados por essa via podem ser degradados pelo pH ácido, além de apresentar baixa solubilidade e consequentemente biodisponibilidade limitada (PLAPIED et al., 2011).

Dessa forma, os sistemas nanoestruturados vêm sendo desenvolvidos a fim de evitar tais problemas, como no trabalho realizado por Yen et al. (2010) onde a incorporação da curcumina em nanopartículas poliméricas melhorou a solubilidade dos compostos hidrofóbicos, possibilitando o aumento da biodisponibilidade dos ativos e consequentemente potencializando a ação biológica.

2.6.1 Microemulsões (ME)

Microemulsões são consideradas sistemas isotrópicos, transparentes, de baixa viscosidade, termodinamicamente estáveis de dois líquidos imiscíveis, geralmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água (DAMASCENO et al., 2011).

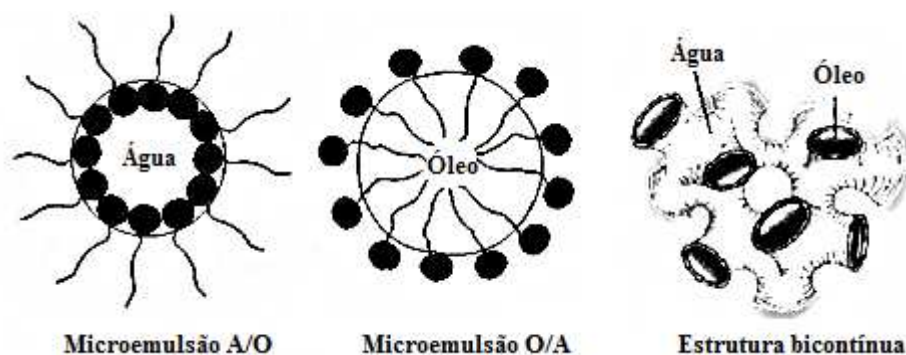
As ME foram primeiramente descritas por Hoar e Shulman em 1943, após evidenciarem a formação espontânea de sistemas transparentes quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico e um álcool graxo de cadeia média. Entretanto, o termo microemulsão foi utilizado somente no final da década de 1950 (OLIVEIRA et al., 2004).

As microemulsões se formam espontaneamente com um diâmetro médio de partícula de 100-500 nm (LOVELYN e ATTAMA, 2011). A mistura de água, óleo e tensoativos são capazes de formar uma grande variedade de estruturas e de fase, dependendo das proporções

de cada componente, como água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas (Figura 10), que podem exibir diferentes comportamentos para a liberação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos (NAZAR et al., 2009; MUZAFFAR et al., 2013).

A escolha, proporção e característica dos tensoativos são essenciais para a formação das MEs. Podem ser utilizados sozinhos, em forma de misturas ou em combinação com outros componentes, tornando a ME mais estável, por diminuir a tensão superficial entre as fases aquosa e oleosa (LOVELYN e ATTAMA, 2011). As regiões hidrofílicas e lipofílicas dos tensoativos são definidas principalmente pelo equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL). O EHL é apresentado em uma escala numérica de 1 a 50, que está diretamente ligado ao tamanho da cadeia polar do tensoativo. Valores de EHL inferiores a dez revelam prevalência da parte apolar nessas substâncias e valores superiores a dez demonstram a predominância na parte polar (LAWRENCE e REES, 2012). Valores de EHL entre três e oito promovem a formação de uma ME A/O, no entanto tensoativos com EHL entre oito e 18 favorecem a formação de uma ME O/A (DAMASCENO et al., 2011).

Figura 10. Representação esquemática da organização das microemulsões.



Fonte: adaptado de FORMARIZ et al., 2005.

As ME também podem proporcionar uma modificação no perfil da biodisponibilidade, estabilidade, melhorando a solubilidade e diminuindo a toxicidade dos fármacos, considerando que esses sistemas apresentam-se como reservatórios capazes de liberar e direcionar os princípios ativos para tecidos e células específicas do organismo. Além disso, dependendo de sua composição, podem ser aplicados, pelas vias de administração oral, parenteral, transdérmica e vaginal (DAMASCENO et al., 2011).

A via de administração mais aceita e conveniente para liberação de fármacos é a via oral. No entanto, muitos fármacos são insolúveis em água, proporcionando uma baixa

dissolução e absorção no trato gastrointestinal e, consequente diminuição na biodisponibilidade. Além disso, alguns fármacos são sensíveis às ações das enzimas digestivas e às alterações de pH. Assim, os sistemas nanoestruturados possuem a capacidade de melhorar a biodisponibilidade oral desses fármacos por meio da solubilização e proteção de tais substâncias, que corresponde a um grande avanço devido à facilidade e aceitação dessa via por parte dos pacientes (DAMASCENO et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial biológico das espécies *Astronium graveolens*, *Astronium urundeuva* e *Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a fitoquímica dos extratos hidroetanólicos do caule e das folhas de *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva*;
- ✓ Determinar a atividade antioxidante de extratos hidroetanólicos do caule e das folhas de *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva* sobre as espécies reativas não-radicalares geradas *in vivo*: ácido hipocloroso (HOCl) e taurina cloramina (TauCl) e radicalares não geradas *in vivo* como o 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH);
- ✓ Investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp utilizando as cepas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, com ênfase no *Helicobacter pylori*;
- ✓ Avaliar a atividade antiangiogênica dos extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp;
- ✓ Incorporar os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp em sistemas nanoestruturados;
- ✓ Testar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos vegetais incorporados nos sistemas nanoestruturados;
- ✓ Determinar o índice de citotoxicidade (IC₅₀) e de seletividade (IS) dos extratos incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados;
- ✓ Avaliar a atividade cicatrizante gástrica *in vivo* do extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporado ou não nos sistemas nanoestruturados;
- ✓ Determinar a atividade anti-*H. pylori* do extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporado ou não nos sistemas nanoestruturados em modelo *in vivo*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extratos vegetais

4.1.1 Obtenção

Os extratos de folhas e caules de *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva* foram obtidos do cerrado brasileiro como 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. graveolens* foram coletados em outubro de 2007 no Bosque dos Jequitibás - Campinas/SP, pela pós-graduanda Eliana Ramos. A autenticidade da amostra foi feita pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro, por comparação com arquivos do Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A exsicata de *A. graveolens* está depositada sob o registro n.º 148133.

As folhas e caules de *A. urundeuva* foram coletados em novembro de 2007 em viagens de campo nas cidades de Bálsamo e Votuporanga (SP), pelo pós-graduando Leonardo Perez de Souza. A autenticidade da amostra foi feita pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro, por comparação com arquivos do Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A exsicata de *A. urundeuva* está depositada sob o registro n.º 1446.

As folhas e caules de *A. fraxinifolium* foram coletados em dezembro de 2007 no Porto Nacional do Estado do Tocantins, pelo Prof. Dr. Cristiano B. Pereira. A autenticidade da amostra foi feita pelo Prof. Dr. Eduardo R. dos Santos, por comparação com arquivos do Herbário da Universidade de Tocantins. A exsicata de *A. fraxinifolium* está depositada sob o registro n.º 333.

4.1.2 Extração

Os extratos vegetais hidroetanólicos (EtOH) foram obtidos através do método de extração exaustivo de percolação simples segundo a Farmacopeia Brasileira (2010). O processo se inicia com o intumescimento prévio de certa quantidade do pó com etanol 70 % (v/v) durante 2 horas fora do percolado. Após esse período, o percolado foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70 %). O empacotamento foi feito de uma forma mais homogênea

possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção de 5:1 (cada 5 referente ao percolador, 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolado ficou em 1,0 a 2,0 mL/min/Kg de droga vegetal comum, tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. Após a extração, os percolados foram rotaevaporados sob pressão reduzida, em temperatura 50 °C. Os extratos foram transferidos para vidros tarados e foram deixados na capela até completa eliminação do solvente. Quando necessário, os extratos foram liofilizados para completa remoção da água.

4.2 Ensaios Químicos

4.2.1 Determinação de fenóis totais

A quantificação de compostos fenólicos foi determinada por meio do reagente Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Wang et al. (2008), que se baseia na redução dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico em solução alcalina. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida por espectrofotometria do UV/Visível, leituras à 750 nm. Construiu-se uma curva analítica do padrão ácido gálico (concentrações de 100, 80, 60, 40 e 20 µg/mL). Por meio desta curva de calibração foi possível quantificar os fenóis totais nos extratos vegetais. As concentrações utilizadas de ácido gálico foram 20 a 100 µg/mL, onde os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra em base seca.

4.2.2 Determinação de flavonoides

Os flavonoides totais foram determinados utilizando um método colorimétrico descrito por Meyers et al. (2003). Construiu-se uma curva analítica do padrão quercetina (concentrações de 250, 200, 150, 100 e 50 µg/mL). Por meio desta curva de calibração foi possível quantificar os flavonoides presentes nos extratos vegetais. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina (EQ) por grama de amostra em base seca. As amostras foram lidas a 510 nm. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão de três repetições.

4.2.3 Atividade *scavenging* sobre o ácido hipocloroso ou a taurina cloramina

A atividade antioxidante da amostra depende de sua capacidade em capturar o HOCl/OCl⁻ ou a taurina cloramina, prevenindo a oxidação do 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB). A oxidação do TMB pelo HOCl/OCl⁻ ou pela taurina cloramina gera um cromóforo azul com absorbância máxima em 655 nm (ASSIS et al., 2015).

A solução padrão de OCl⁻ foi obtida diluindo-se a massa adequada de NaOCl em NaOH 10mmol/L, pH 12,0. A concentração de OCl⁻ foi determinada pelo seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 292 nm) (ZGLICZYNSKI et al., 1971).

Para o HOCl/OCl⁻ utilizou-se a metodologia descrita por Assis et al. (2015), em temperatura ambiente, com modificações. A reação de captura foi realizado em 240 μL de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4 e HOCl/OCl⁻ 30 $\mu\text{mol/L}$, na ausência e na presença de diferentes concentrações de amostra. Após 10 minutos de incubação, adicionou-se 60 μL do reagente de revelação com: TMB 2,8 mmol/L, dissolvido em dimetilformamida (DMF) e diluído v/v em ácido acético 0,8 mol/L e subsequente adição de iodeto de potássio 0,01 mol/L, obtendo-se uma solução com 0,01 mol/L de iodeto de potássio, 50% de DMF, 0,4 mol/L de ácido acético e 14 mM de TMB. Incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz, a absorbância foi monitorada em 655 nm.

Para a taurina cloramina, utilizou-se as mesmas condições do ensaio supracitado, com a adição de taurina 5 mmol/L e incubação por 5 minutos com o HOCl/OCl⁻ antes da adição das amostras. A presença do iodeto no reagente de revelação catalisa a oxidação do TMB pela taurina cloramina (DYPBUKT et al., 2005). As amostras foram dissolvidas em etanol 70% e em seguida diluídas em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. Os resultados foram expressos como média do $\text{IC}_{50} \pm \text{EP}$ (erro padrão). Os ensaios foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti (Laboratório de Bioquímica Clínica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas).

4.2.4 Ensaio de captura do DPPH

A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos do caule e das folhas de *A. fraxinifolium* e *A. urundeuva* foi determinada usando o radical livre estável 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) de acordo com o procedimento previamente descrito por Mencherini et al. (2007). O sistema de reação foi constituído de 37,5 μL de solução teste (extrato) e 1,5

mL de DPPH (0,025 g/L). Após 10 minutos, o decréscimo da absorbância foi medido em um espectrofotômetro Thermo Scientific™ Evolution 201 UV-Vis systems. O α -tocoferol e ácido ascórbico foram utilizados como controles positivos do teste. Os extratos foram dissolvidos em etanol 70% para serem utilizados no teste. O ensaio foi realizado em triplicada e os resultados foram expressos como média do $IC_{50} \pm DP$ (desvio padrão). O ensaio foi realizado em um estágio no exterior (Doutorado Sanduíche - CAPES/PDSE) sob orientação da Prof.^a Dr.^a Nunziatina De Tommasi na Università degli Studi di Salerno (Itália).

4.3 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados

Para o desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados, foi utilizada metodologia baseada no trabalho de Formariz (2010), com adaptações. Os ensaios foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Marlus Chorilli (Laboratório de Farmacotécnica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas).

4.3.1 Preparo das formulações

O sistema 1 (S_1) foi preparado utilizando uma mistura de polioxietileno 20-oleil éter (Brij[®] 98) e fosfatidilcolina de soja (2:1) como tensoativo, colesterol como fase oleosa e tampão-fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4 (fase aquosa). Para o preparo do sistema 2 (S_2) utilizou-se a combinação de polioxietileno 20-cetil éter (Brij[®] 58) e fosfatidilcolina de soja (2:1) como tensoativo, colesterol como fase oleosa e dispersão de Pluronic F127[®] - 0,08% em tampão-fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa (Tabela 1). Construiu-se diagrama de fases para os sistemas, fixando-se a proporção de tensoativo (T) e fase oleosa (FO), e procedendo a titulação com a fase aquosa (FA). A mistura foi sonicada usando sonicador de haste (Q700 da QSonica[®]), com potência de 700 watts, operando de modo descontínuo, amplitude de 10%, por 10 minutos com intervalos de 30 segundos a cada dois minutos, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação. Todas as regiões dos sistemas foram classificadas visualmente como sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT), sistema viscoso semi-transparente (SVST), sistema viscoso opaco (SVO) e separação de fases (SF). Sendo assim, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases. A partir desses dados, foram selecionadas as regiões dos sistemas para a incorporação do extrato.

Tabela 1. Composição dos sistemas nanoestruturados.

Composição	Sistema 1 (S ₁)	Sistema 2 (S ₂)
Colesterol	10%	10%
Tampão fosfato pH 7,4	80%	-
Dispersão de Pluronic F127® - 0,08% em Tampão fosfato pH 7,4	-	80%
Tensoativo (Brij® 98 e fosfatidilcolina de soja - Epikuron® 200 - 2:1)	10%	-
Tensoativo (Brij® 58 e fosfatidilcolina de soja - Epikuron® 200 - 2:1)	-	10%

4.3.2 Incorporação dos extratos nos sistemas nanoestruturados

Para a incorporação dos extratos de *Astronium* sp primeiramente adicionou-se em um frasco 0,012 g do extrato em 6 mL dos sistemas. A mistura foi sonicada por 10 minutos, amplitude de 10% em modo descontínuo, com banho de gelo, havendo assim a incorporação da amostra nos sistemas na concentração de 2000 µg/mL.

4.3.3 Caracterização estrutural dos sistemas

4.3.3.1 Determinação do diâmetro das gotículas e índice de polidispersidade (IPD) por espalhamento de luz dinâmico

A determinação do diâmetro das gotículas foi realizada pela técnica de correlação de fótons, usando equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser - *Light Scattering* (Zetasizer Nano NS - Malvern Instruments®). Esta técnica é sensível para determinar pequenas mudanças no diâmetro médio, como aquelas devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando o feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. As flutuações tempos-dependentes na intensidade do espalhamento são observadas através de um detector que processa os dados e envia a um computador (OLIVEIRA, 2006). Por esta técnica, calculou-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais, segundo a equação de Einstein-Stokes (equação 3):

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h} \quad (3)$$

onde D = coeficiente de difusão das partículas; K = constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$); T = temperatura absoluta (293, 15 K); $\pi = 3,141592$; η = viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2\text{s}}$); R_h = raio hidrodinâmico.

Para analisar as gotículas dos sistemas estes foram colocados na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 20°C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro médio e índice de polidispersidade (IPD) das gotículas de cada amostra ($n=3$), com a duração total de 5 min.

4.4 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva dos sistemas nanoestruturados

A força mucoadesiva dos sistemas nanoestruturados foi avaliada *in vitro* através da medida da força necessária para remover a formulação da superfície da mucosa gástrica de ratos, utilizando o analisador de textura TA-XT Plus[®] (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Uma região com 2 mm de espessura da mucosa gástrica foi fixada na parte inferior da sonda do equipamento e hidratada com suco gástrico simulado por 30s. Em seguida, a sonda do equipamento foi abaixada a uma velocidade constante (1 mm s^{-1}) até entrar em contato com a superfície da amostra. A mucosa e a formulação foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este intervalo. Após 60 segundos, a sonda foi levantada a uma velocidade de $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ e a força necessária para remover a mucosa gástrica da formulação foi determinada com o valor resultante da curva força pelo tempo. Foram realizadas sete repetições a $37^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ (CALIXTO et al., 2014).

4.5 Ensaios biológicos

4.5.1 Preparo das soluções estoques

Os extratos foram diluídos na concentração de 2000 µg/mL em uma solução contendo 20 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e 80 % de caldo Müeller-Hinton (CMH).

4.5.2 Cepas microbianas

As cepas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella setubal* ATCC 19196, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (Gram-negativas) e *Candida albicans* ATCC 18804.

4.5.3 Estocagem e Manutenção

As bactérias foram conservadas em CMH acrescido de 20% de glicerol e mantidas a -20°C. Para o uso, foram repicadas do meio de conservação para CMH, incubando-se por 24 horas a 37°C, no qual foram utilizados para a padronização do inóculo.

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

A levedura foi mantida em caldo Sabouraud acrescido de 20% de glicerol e mantida a -20°C. Para o uso, foi repicada em 2 mL de caldo Sabouraud e incubada a 37°C por 48h.

4.5.4 Avaliação da atividade antibacteriana

4.5.5 Padronização da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, para as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, adicionando-se solução tampão fosfato (*phosphate buffer saline*: PBS) pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração das bactérias. Para realização dos ensaios de diluição em microplacas foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL (CLSI, 2006a).

Para *H. pylori*, a suspensão foi padronizada adicionando-se uma cultura de 72 horas em um tubo contendo solução tampão fosfato (PBS) estéril até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala de McFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Em

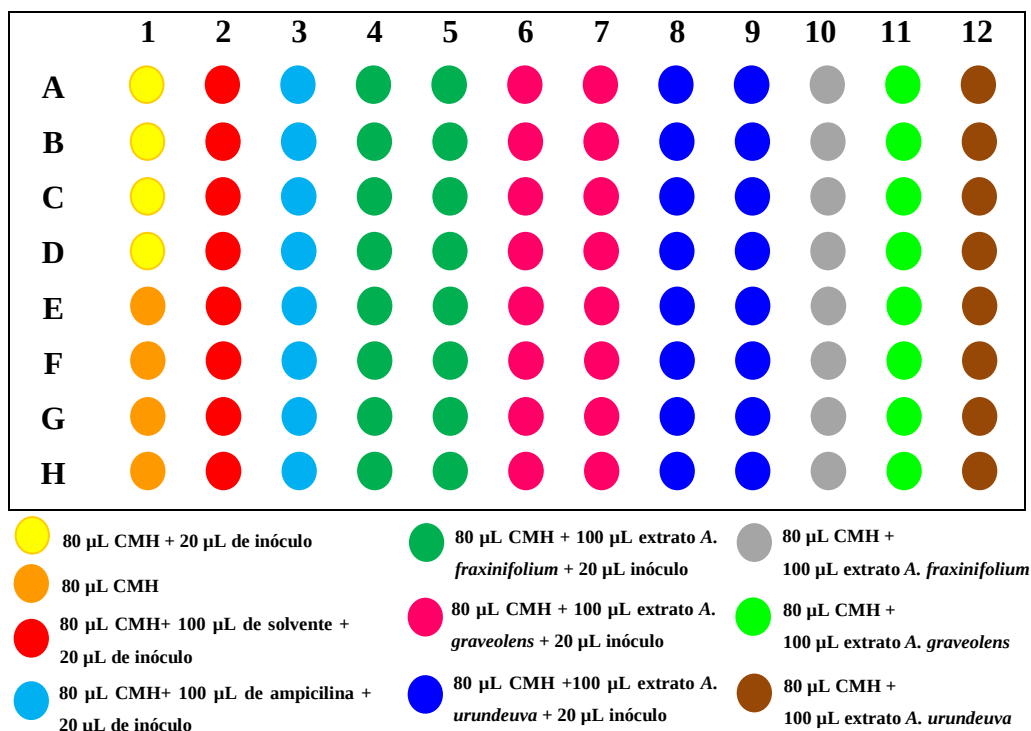
seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 570 nm para confirmação da concentração da bactéria. Para realização dos ensaios de diluição em microplacas foi realizada uma diluição 1:10 em CMH acrescido de 50% de SFB, obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL (CLSI, 2006b).

4.5.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

4.5.6.1 Realização do teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006a) para as bactérias aeróbicas e adaptada para as fastidiosas, seguindo suplemento M100-S16 do CLSI (2006b). Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH para *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, e 80 µL de CMH acrescido de 50% de SFB para *H. pylori*. Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções dos extratos vegetais (2000 µg/mL) e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões bacterianas em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados amoxicilina (100 µg/mL) para o *H. pylori* e a ampicilina (50 µg/mL) para as demais bactérias. Além dos controles de meio de cultura, crescimento bacteriano, extratos vegetais e solventes. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, e a 37°C por 72 horas sob condição de microaerofilia para *H. pylori*. Em cada microplaca foram testados três extratos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicata. A Figura 11 demonstra a representação esquemática da microplaca para a determinação da atividade antibacteriana e da CIM.

Figura 11. Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando resazurina como revelador.



4.5.6.2 Leitura espectrofotométrica

Após a incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas. A partir dos valores obtidos foram confeccionados os gráficos expressando a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos (GUDIÑA et al., 2010).

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

4.5.6.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

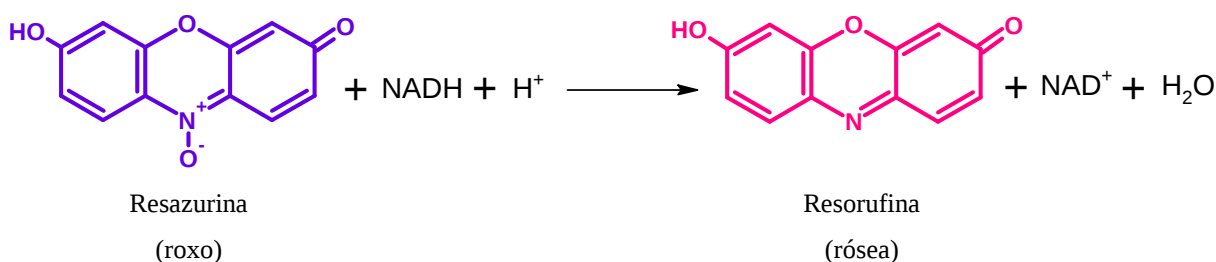
Após a leitura espectrofotométrica, foi realizada a determinação do CBM. Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de Ágar Müller-Hinton (AMH) acrescido de 5% de sangue de carneiro quando *H. pylori* e AMH para as demais bactérias. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas sob condição de microaerofilia para o *H. pylori* e 37°C por 24h para as demais bactérias.

4.5.6.4 Leitura com revelador

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

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea) (Figura 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 óxido-redução da resazurina.



Fonte: Autor.

4.5.7 Avaliação da atividade antifúngica

4.5.8 Padronização da suspensão fúngica

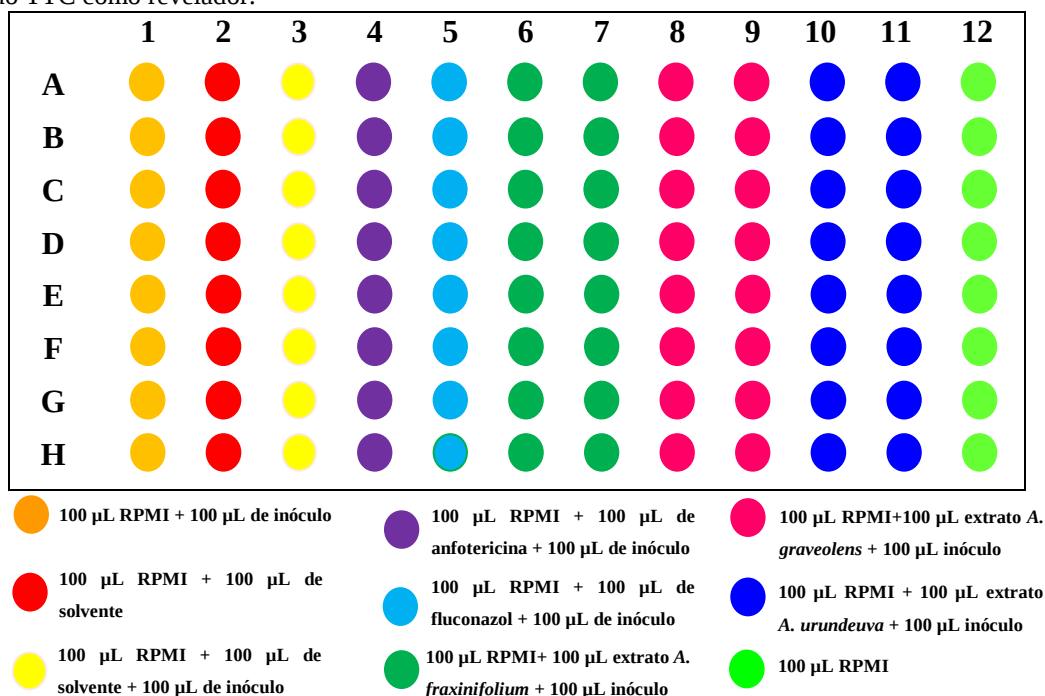
A suspensão fúngica foi padronizada adicionando-se uma cultura de 48 horas em um tubo contendo PBS estéril até atingir uma turvação igual à suspensão da escala 0,5 de McFarland (10⁶ UFC/mL) e em seguida foi confirmada a concentração por leitura espectrofotométrica a 530 nm. Desta suspensão foi realizada uma diluição de 1:100, seguida de outra diluição 1:20, em PBS, obtendo-se uma suspensão de 2,5 x 10³ UFC/mL, para utilização nos ensaios (CLSI, 2008).

4.5.9 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

4.5.9.1 Realização do teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com as metodologias descritas segundo a norma M27-A3 do CLSI (2008) e Duarte et al. (2005), com modificações. Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de RPMI-1640 (tamponado com MOP's). Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções dos extratos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Adicionalmente, foram distribuídos 100 µL da suspensão de levedura em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a anfotericina B (32 µg/mL) e o fluconazol (256 µg/mL), além dos controles de meio de cultura, crescimento bacteriano, extratos vegetais e solventes. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Em cada microplaca foram testados três extratos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicatas. A Figura 13 demonstra a representação esquemática da microplaca para a determinação da atividade antifúngica e da CIM.

Figura 13. Representação esquemática da microplaca na determinação da atividade antifúngica e da CIM utilizando TTC como revelador.



Fonte: Autor

4.5.9.2 Leitura espectrofotométrica

Após a incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas, a partir dos valores obtidos foram confeccionados os gráficos expressando a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos (GUDIÑA et al., 2010).

4.5.9.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

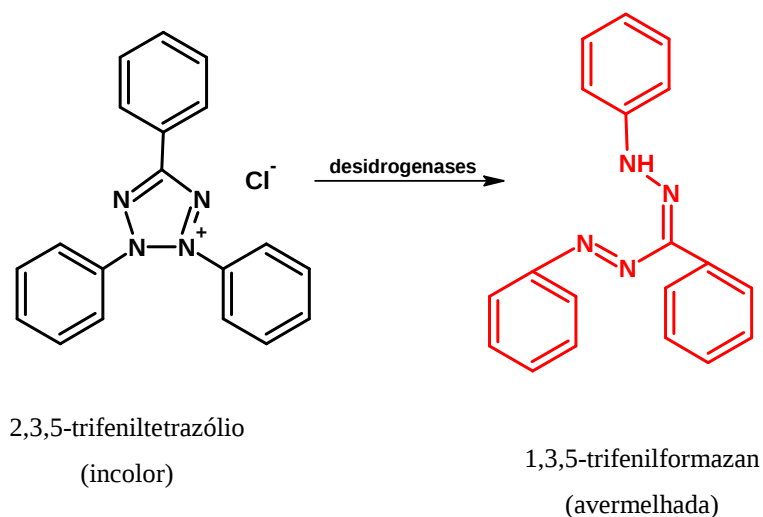
Após a leitura espectrofotométrica, foi realizada a determinação do CFM. Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de Ágar Sabouraud (AS). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

4.5.9.4 Leitura com revelador

Foram adicionados 20µL de solução aquosa de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em cada orifício das microplacas. A ausência de crescimento do micro-organismo mantém as misturas dos poços incolores e a coloração vermelha representa crescimento do mesmo (DUARTE et al., 2005).

O TTC é um indicador de óxido-redução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos, principalmente viabilidade celular. O composto incolor (2,3,5-trifeniltetrazólio) é reduzido enzimaticamente a 1,3,5-trifenilformazan, de cor avermelhada (Figura 14), em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e, portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

Figura 14. Reação de óxido-redução do TTC.



Fonte: Autor.

4.5.10 Determinação da atividade citotóxica *in vitro*

Para a determinação da citotoxicidade (IC₅₀) ou viabilidade celular foram utilizadas as linhagens celulares VERO (ATCC CCL-81TM - Células fibroblásticas renais de macaco), MRC5 (ATCC CCL-171TM - Células fibroblásticas normais de pulmão humano) e HeLa (ATCC CCL-2TM - Células de adenocarcinoma de cervix humano). As células foram mantidas incubadas a 37°C, com 5% de CO₂, em garrafas com superfície em torno de 12,50 cm², contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (Vitrocell[®]) enriquecido com 10% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L).

A técnica consistiu em coletar as células utilizando uma solução de tripsina/EDTA (Vitrocell[®]), centrifugação (2000 rpm por 5 min) e contagem do número de células em câmara de Neubauer ajustando para 7,5 x 10⁴ células/mL para HeLa, 3,4 x 10⁵ células/mL para VERO e 2,5 x 10⁵ células/mL para MRC5 em meio DMEM. Destas suspensões, foram depositados 200 µL em cada orifício de uma microplaca de 96 orifícios obtendo uma concentração celular de 1,5 x 10⁴ células/poço (HeLa) e 6,8 x 10⁴ células/poço (VERO), e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas para aderência celular a placa. A seguir foram preparadas diluições seriadas dos compostos em análise de maneira a se obter concentrações de 1000 a 3,90 µg/mL. As diluições foram adicionadas às células após a retirada de todo o meio e das células que não aderiram, sendo novamente incubadas por 24 horas. A citotoxicidade dos compostos foi determinada pela adição de 30 µL do revelador resazurina e leitura após 6 horas de incubação. A leitura foi realizada no leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN[®]), utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente. O IC₅₀ foi definido como a maior concentração do extrato capaz de inviabilizar pelo menos 50% das células. O ensaio de citotoxicidade foi realizado conforme padronizado por Pavan et al. (2010). Os ensaios foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan (Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo).

4.5.10.1 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) dos compostos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ sobre os valores de CIM. Quando o valor de IS é igual ou superior a 10 significa que

os extratos em análise podem ser aplicados na concentração de 10 ou mais vezes acima do valor de CIM sem apresentar citotoxicidade (ORME et al., 2001).

4.5.11 Determinação da atividade antiangiogênica

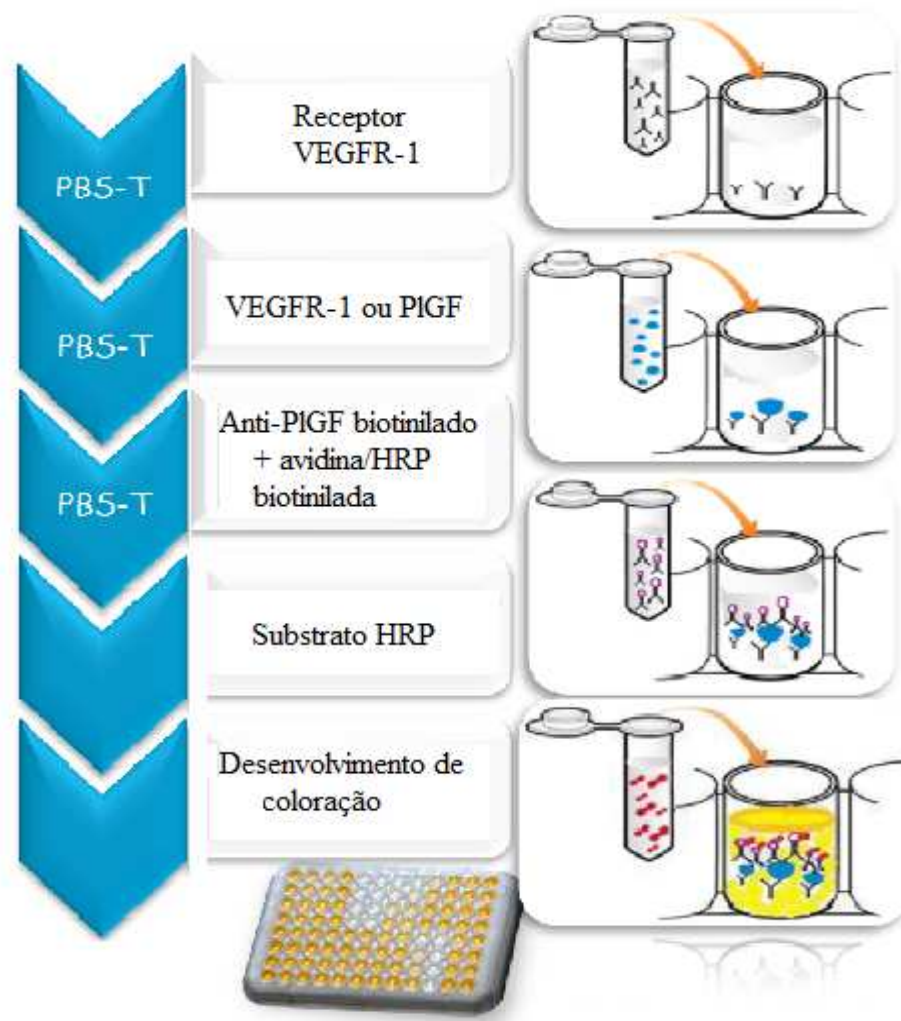
Os ensaios da determinação da atividade antiangiogênica foram realizados em um estágio no exterior (Doutorado Sanduíche - CAPES/PDSE) sob orientação da Prof^a. Dr^a. Nunziatina De Tommasi na Università degli Studi di Salerno (Itália).

4.5.11.1 Ensaio de inibição da ligação de PlGF e VEGF ao receptor Flt-1

O ensaio ELISA foi realizado utilizando uma microplaca com 96 poços sensibilizados com 100 µL/poço da forma recombinante de Flt-1 (VEGFR-1 - R&D Systems) na concentração de 0,5 µg/mL, essa solução ficou na microplaca por 16 h à temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com uma solução de PBS contendo 0,004 % de Tween-20 (PBS-T). Foi então adicionada a microplaca uma solução de PBS com 1 % de albumina de soro bovino para bloquear os sítios de ligações inespecíficas, ficando por 2 horas à temperatura ambiente. Os extratos dissolvidos em DMSO (Sigma) foram devidamente diluídos em PBS-T (para 10% de DMSO) e adicionados aos poços pré-misturados com o ligante (PlGF). Os poços foram lavados como indicado anteriormente, e foram adicionados 100 µL/poço da forma recombinante de PlGF (R&D Systems) na concentração de 10 ng/mL em PBS-T contendo albumina de soro bovino a 0,1%, EDTA 5 mM, 0,004 % Tween-20, a microplaca foi incubada por 1 h a 37°C seguida por 1 h à temperatura ambiente. A microplaca foi novamente lavada e adicionou-se 100 µL/poço do anticorpo policlonal PlGF biotilado (R&D Systems) diluído em PBS-T na concentração de 300 ng/mL. A microplaca foi incubada por 1 h a 37°C seguida por 1 h à temperatura ambiente. Os poços foram lavados e incubados com uma solução contendo um pré-formado de avidina e de um complexo macromolecular de HRP biotilada (Vectastain Elite ABC kit) durante 1 h à temperatura ambiente. Após a última lavagem, adicionou-se 100 µL do substrato de HRP composto por 1 mg/mL de ortofenilendiamina em 50 mM de tampão de fosfato-citrato pH 5, 0,006% de H₂O₂ e incubou-se durante 40 minutos no escuro à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 30 µL/poço de H₂SO₄ 4 N. A leitura das microplacas foi realizada em leitor de microplacas (BioradBenchMark) a 490 nm. Em cada microplaca foram testados os extratos

em triplicatas. Os ensaios foram realizados em duplicata (PONTICELLI et al., 2008; LEPORE et al., 2011). A Figura 15 demonstra o fluxograma do ensaio de inibição da ligação de PlGF e VEGF ao receptor Flt-1.

Figura 15. Fluxograma do ensaio de inibição da ligação de PlGF e VEGF ao receptor Flt-1.



4.5.11.2 Ensaio de angiogênese no modelo experimental Zebrafish

Os embriões de *Danio rerio* (peixe-zebra) foram obtidos a partir de peixes comprados em lojas de animais locais e mantidos em água (0,2 g/L Instant Ocean Salt, Aquarium Systems, Estados Unidos) a 28,5°C.

Os embriões de peixe-zebra saudáveis e normais foram selecionados para serem utilizados após 24 hpf da sua geração, e distribuídos individualmente em cada orifício da microplaca. Em seguida, foram pipetados em cada poço contendo os embriões 100 µL de

extratos *Astronium* sp (25 µg/mL). O DMSO na concentração de 0,2% v/v foi usado como controle de veículo para esses tratamentos. 2-metoxiestradiol (2ME) foi utilizada como substância antiangiogênica padrão (30 µg/mL). Todos os embriões (a partir de 24 hpf) tratados em poços individuais foram incubados a 72 hpf. Após o tratamento com os extratos por 72 hpf os embriões foram submetidos ao ensaio quantitativo de fosfatase alcalina endógena (EAP) descrito por He et al. (2009). Os embriões foram anteriormente desidratados com etanol em diferentes concentrações (50%; 70% e 96%). Em seguida, os embriões foram lavados três vezes com tampão de dietanolamina pH 9,8 e corados de acordo com o protocolo descrito no kit do substrato de fosfatase. Após a coloração, 50 µL de NaOH 2 M foram adicionados para parar a reação. A absorbância (Abs) do produto final solúvel foi medida a 405 nm usando um leitor de microplacas.

O crescimento dos vasos foi apresentado como porcentagem da densidade óptica em comparação com o controle, utilizando a seguinte equação (4):

$$\% \text{ de formação de vasos} = \frac{(\text{Abs tratados dia 3} - \text{Abs controle de 1 dia})}{(\text{Abs controle de 3 dias} - \text{Abs controle de 1 dia})} \times 100 \quad (4)$$

Os ensaios foram realizados em triplicata. Para a coloração dos vasos sanguíneos foi utilizado o substrato NBT/BCIP (nitro-blue tetrazolium e 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt). Posteriormente, os embriões foram incubados por 24 hpf em uma solução aquosa contendo PTU (N-fenil-tiourea, concentração final 0,2 mM) antes da administração dos extratos, a fim de prevenir o desenvolvimento de pigmentos para facilitar a observação do vaso sanguíneo. Após 72 hpf, os embriões foram fixados em paraformaldeído a 4% em PBST (solução salina tamponada com fosfato + 0,1% de Tween-20) durante 30 min. Em seguida, os embriões foram desidratados com etanol, lavados com PBST, e tamponados com NTMT (100 mM Tris pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, 0,1% de Tween-20). A reação de coloração foi iniciada por incubação dos embriões com uma solução de NBT/BCIP por 15-30 minutos de acordo com o protocolo descrito para o NBT/BCIP. Após a coloração ser concluída, os embriões foram lavados com PBST e foram examinados por um microscópio óptico (Leica DMLB) verificando a vitalidade ou os defeitos morfológicos.

4.6 Ensaios biológicos *in vivo*

4.6.1 Animais

Ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando 150-200 g foram obtidos do Biotério Central da UNESP - Universidade Estadual Paulista, e 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 disponível *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais (protocolo CEUA/FCF/CAr. 33/2013).

4.6.2 Determinação da atividade cicatrizante gástrica

A atividade cicatrizante gástrica foi determinada segundo Prabha et al. (2011) com modificações. Os animais foram divididos aleatoriamente em dez grupos (n=6). A tríade (amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg) foi utilizada como droga padrão e administrada por gavagem aos animais. Os extratos das folhas de *A. urundeuva* (100 mg/kg de peso corporal) foram utilizados como uma droga cicatrizante. A indometacina (40 mg/kg de peso corporal, usado como referência de anti-inflamatório não esteroide) foi administrada por gavagem para induzir lesões gástricas nos ratos. A garantia de que os animais estavam ulcerados foi avaliada através de exames físicos em comparação com o grupo controle. Assim foi possível identificar quais ratos realmente tiveram seus estômagos ulcerados. Para a realização desse ensaio foi utilizado somente o extrato das folhas de *A. urundeuva*, a escolha se justifica pelo fato de haver relatos na literatura que descrevem o uso popular dessa espécie, além de haver um estudo comprovando sua atividade antiúlcera gástrica para os extratos do caule dessa espécie (CARLINI et al., 2010). Os grupos do experimento estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais.

GRUPOS	TRATAMENTOS
1	Solução salina 0,9 %
2	Indometacina (controle positivo - 40 mg/kg de peso corporal);
3	Extrato não incorporado de <i>A. urundeuva</i> (100 mg/kg de peso corporal)
4	Extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 1 (100 mg/kg de peso corporal)
5	Extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 2 (100 mg/kg de peso corporal)
6	Tríade (amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg)
7	Indometacina + extrato não incorporado de <i>A. urundeuva</i>
8	Indometacina + extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 1
9	Indometacina + extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 2
10	Indometacina + tríade

Após a administração do tratamento (extratos hidroetanólicos das folhas de *A. urundeuva* incorporados ou não) que foi de 14 dias, os ratos foram mortos por CO₂, tendo seus estômagos removidos, lavados com solução salina, secos com papel filtro e abertos ao longo da maior curvatura. Além disso, no caso da existência de lesões, estas foram contadas e medidas através do programa LIDA user, obtendo-se o número de ulcerações com diferentes graus de lesão, seguindo o índice de ulcerogênese gástrica (I.U.G), que obedece a critérios numéricos para a classificação das lesões da mucosa gástrica (NABAVIZADEH et al., 2011): **Grau 0:** sem lesões; **Grau 1:** lesões superficiais; **Grau 2:** lesões profundas e **Grau 3:** lesões com perfurações. O I.U.G foi determinado utilizando a seguinte equação (5):

$$\text{I.U.G} = U_N + U_S + U_P \times 10^{-1} \quad (5)$$

onde I.U.G representa o índice de ulcerogênese gástrica; U_N o número médio de úlceras por animal; U_S o número médio do grau de classificação e U_P a porcentagem de animais com úlceras.

A porcentagem de inibição de ulceração (% I.U) foi calculada conforme a seguinte equação (6):

$$\% \text{ I.U} = \frac{(\text{índice de úlcera do controle} - \text{índice de úlcera do teste})}{\text{índice de úlcera do controle}} \times 100 \quad (6)$$

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

A atividade anti-*H. pylori* foi determinada segundo Souza et al. (2009) com modificações. Os animais foram divididos aleatoriamente em dez grupos (n=6) (Tabela 3).

Os animais receberam a indometacina (indutor de úlcera) após 12 horas receberam os extratos hidroetanólicos das folhas de *A. urundeuva* incorporados ou não, solução de *H. pylori* - 9×10^8 UFC/mL e tríade (amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg). Foi inoculada nos ratos uma solução de *H. pylori* - 9×10^8 UFC/mL por sete dias.

Para a realização desse ensaio foi utilizado o extrato das folhas de *A. urundeuva* pelo fato de que essa espécie apresentou atividade *in vitro* frente ao *H. pylori*.

Tabela 3. Divisão dos grupos experimentais.

GRUPOS	TRATAMENTOS
1	Solução de <i>H. pylori</i> (9×10^8 UFC/mL)
2	Indometacina (controle positivo - 40 mg/kg de peso corporal);
3	Tríade (amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg)
4	Indometacina + solução de <i>H. pylori</i> (9×10^8 células) + extrato não incorporado de <i>A. urundeuva</i> (100 mg/kg de peso corporal)
5	Indometacina + solução de <i>H. pylori</i> + extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 1
6	Indometacina + solução de <i>H. pylori</i> + extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 2
7	Indometacina + solução de <i>H. pylori</i> + tríade
8	Solução de <i>H. pylori</i> + extrato não incorporado de <i>A. urundeuva</i>
9	Solução de <i>H. pylori</i> + extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 1
10	Solução de <i>H. pylori</i> + extrato de <i>A. urundeuva</i> incorporado no sistema 2

Após a administração do tratamento que foi de 14 dias, os ratos foram mortos por CO₂, tendo seus estômagos removidos, lavados com solução salina e abertos ao longo da maior curvatura. A área ulcerada (mm²) foi medida e a inibição de ulceração (%) foi determinado de acordo com o método descrito por Nabavizadeh et al. (2011).

4.6.3.1 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 tomada 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).

4.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média e desvio padrão. A significância estatística foi determinada por análise unidirecional de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ou pós-teste de Dunnett, considerando-se $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaios químicos

5.1.1 Determinação de fenóis totais

O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu para doseamento de fenóis totais, descrito por Wang et al. (2008) fundamenta-se na redução dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico em solução alcalina.

As amostras vegetais apresentaram compostos fenólicos, sendo que a maior quantidade de fenóis foi encontrada nos extratos do caule de *A. fraxinifolium* (25,86 mgEAG/100g), *A. urundeuva* (26,50 mgEAG/100g) e das folhas de *A. urundeuva* (33,68 mgEAG/100g) (Tabela 4).

Tabela 4. Quantificação de compostos fenólicos dos extratos do caule e folhas de *Astronium* sp.

Extrato vegetal	Teor de compostos fenólicos (mgEAG/100g)*
AFC	25,86 ^A ±0,01
AFF	19,48 ^B ±0,01
AGC	22,76 ^B ±0,02
AGF	22,38 ^B ±0,01
AUC	26,50 ^A ±0,03
AUF	33,68 ^A ±0,02

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; AFF: extrato das folhas de *A. fraxinifolium*;

AGC: extrato do caule de *A. graveolens*; AGF: extrato das folhas de *A. graveolens*;

AUC: extrato do caule de *A. urundeuva*; AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

*Resultados expressos em base seca (média ± desvio padrão).

*Letras iguais na coluna significam que, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao nível de significância de 5% no teste de Tukey.

5.1.2 Determinação de flavonoides

Os flavonoides foram determinados utilizando o método colorimétrico, que tem como princípio a reação dos flavonoides presentes na amostra com o cloreto de alumínio.

O extrato do caule de *A. urundeuva* (107,19 mgEQ/100g) apresentou maior concentração de flavonoides dentre os extratos estudados, seguido do extrato do caule de *A. fraxinifolium* (68,59 mgEQ/100g) e juntamente com o extrato das folhas de *A. urundeuva* (59,75 mgEQ/100g). Observa-se que houve diferença significativa entre os extratos do caule das três espécies, enquanto que os extratos das folhas somente o *A. urundeuva* (59,75 mgEQ/100g) apresentou distinção estatística (Tabela 5).

Tabela 5. Quantificação de flavonoides dos extratos do caule e folhas de *Astronium* sp.

Extrato vegetal	Teor de flavonoides (mgEQ/100g)*
AFC	68,59 ^A ±0,03
AFF	42,08 ^B ±0,03
AGC	39,75 ^B ±0,02
AGF	30,45 ^B ±0,03
AUC	107,19 ^C ±0,03
AUF	59,75 ^A ±0,02

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; AFF: extrato das folhas de *A. fraxinifolium*;

AGC: extrato do caule de *A. graveolens*; AGF: extrato das folhas de *A. graveolens*;

AUC: extrato do caule de *A. urundeuva*; AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

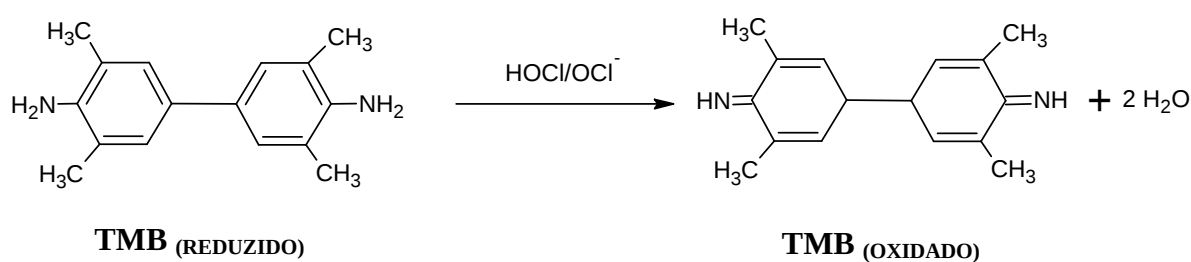
*Resultados expressos em base seca (média ± desvio padrão).

*Letras iguais na coluna significam que, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao nível de significância de 5% no teste de Tukey.

5.1.3 Atividade *scavenger* de radicais pelo ácido hipocloroso

A ação das amostras sobre o HOCl foi avaliada por meio da capacidade dos extratos em sequestrar o HOCl, impedindo que ele oxide o TMB (Figura 16).

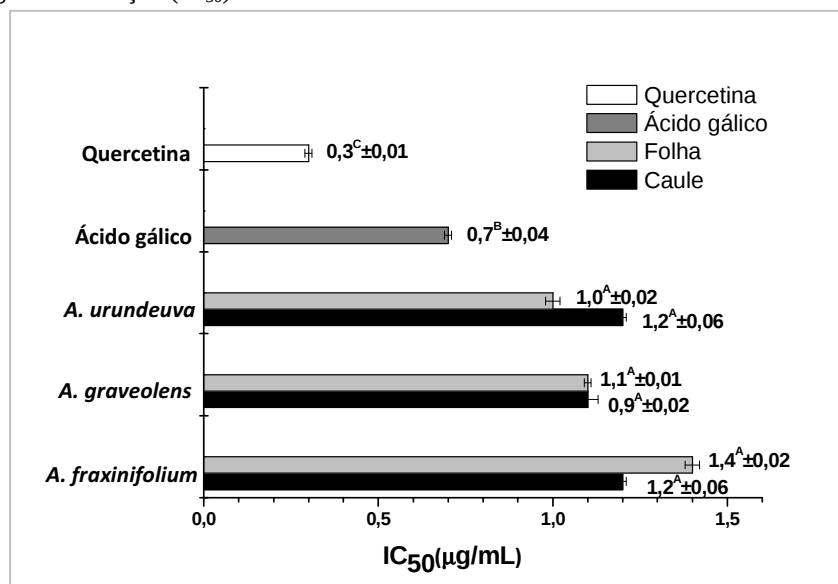
Figura 16. Reação de óxido-redução do TMB.



Fonte: Autor.

Os resultados neste ensaio foram expressos em IC_{50} . Este foi calculado a partir da quantidade do extrato vegetal que foi capaz de sequestrar metade da espécie reativa presente na solução. Quanto menor o valor do IC_{50} apresentado, menor a quantidade da amostra necessária para reduzir em 50% o HOCl. As análises foram feitas em triplicata, e os resultados são médias das inibições. As amostras estudadas se mostraram efetivas no sequestro do ácido hipocloroso (Figura 17), apresentando valores de IC_{50} muito próximos. Porém o extrato do caule de *A. graveolens* ($IC_{50} = 0,9 \mu\text{g/mL}$) foi o mais eficiente. O pior potencial *scavenger* de HOCl foi desempenhado pelo extrato da folha de *A. fraxinifolium* ($IC_{50} = 1,4 \mu\text{g/mL}$).

Figura 17. Capacidade de captura do HOCl/OCl⁻ pelos extratos do caule e das folhas de *Astronium* sp, expressa em porcentagem de inibição (IC_{50}).



5.1.4 Atividade *scavenger* sobre taurina cloramina

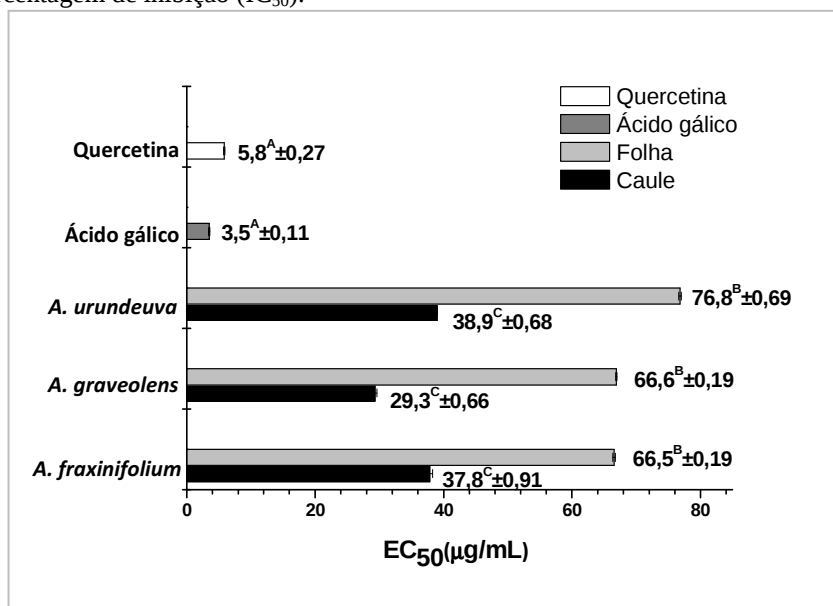
Dentre as alterações que o ácido hipocloroso provoca está a oxidação de grupos amino livres de aminoácidos levando à formação de cloraminas, outro grupo de oxidantes não radicalares. As cloraminas são componentes importantes, por exemplo, na lesão observada para a formação de úlcera gástrica quando a bactéria *Helicobacter pylori* se faz presente. Tal bactéria promove um processo inflamatório na mucosa gástrica onde neutrófilos produzem através do *burst oxidative* o HOCl, e libera grandes quantidades de taurina e estas são rapidamente cloradas por reação com o HOCl (KLAMT e SHACTER, 2005).

A bactéria ainda produz amônia que, ao reagir com o HOCl, gera monoclорamina, a qual é bastante lesiva. As cloraminas são desta forma, alvos farmacológicos importantes a

serem avaliadas na presença dos extratos vegetais, substâncias ricas em flavonoides. Para tanto, estudou-se a ação *scavenger* de taurina cloramina frente a esses extratos.

Os extratos das espécies de *Astronium* sp foram efetivos sequestradores da taurina cloramina (Figura 18). Os extratos do caule apresentaram melhor atividade que o das folhas, o extrato do *A. graveolens* ($IC_{50} = 29,3 \mu\text{g/mL}$) foi o mais eficiente. Já o extrato da folha de *A. urundeuva* ($IC_{50} = 76,8 \mu\text{g/mL}$) foi o menos eficiente.

Figura 18. Capacidade de captura da taurina cloramina pelos extratos do caule e das folhas de *Astronium* sp, expressa em porcentagem de inibição (IC_{50}).



5.1.5 Atividade *scavenger* de DPPH[•]

O DPPH é um radical estável muito utilizado nos estudos com antioxidantes. Neste ensaio o antioxidante reage com o radical DPPH[•], convertendo-o em sua forma reduzida (1,1-difenil-2-picrilhidrazina). Na reação, a solução etanólica de DPPH[•], inicialmente de coloração violeta, torna-se amarelada e o grau deste descolorimento indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Os extratos das espécies de *Astronium* sp apresentaram uma potente atividade antioxidante frente ao radical DPPH. O mais ativo foi o extrato da folha de *A. urundeuva* com $IC_{50} = 3,28 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 6. Capacidade de captura do radical DPPH pelos extratos do caule e das folhas de *Astronium* sp, expressa em porcentagem de inibição (IC₅₀).

Extrato vegetal	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)*
AFC	6,06 ±1,43
AFF	14,38 ±2,63
AUC	6,04 ±1,09
AUF	3,28 ±0,09
α-tocoferol ^a	10,10 ±1,30
Ácido Ascórbico ^a	5,85 ±0,92

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; AFF: extrato das folhas de *A. fraxinifolium*;

AUC: extrato do caule de *A. urundeuva*; AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

*Resultados foram expressos em média ± desvio padrão de três repetições.

^aControles positivos.

5.2 Determinação da atividade biológica

5.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana das amostras foi avaliada a partir da capacidade dos extratos em inibirem o crescimento bacteriano. Os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp não apresentaram atividade antibacteriana frente a *E. coli* (CIM >1000 µg/mL), *S. setubal* (CIM >1000 µg/mL) e *H. pylori* (CIM >1000 µg/mL). *S. aureus* e *C. albicans* se mostraram sensíveis para o extrato da folha de *A. urundeuva* (CIM = 125 µg/mL). O extrato das folhas de *A. graveolens* (CIM = 250 µg/mL) apresentou atividade antibacteriana apenas contra *S. aureus* (Tabela 7).

Tabela 7. Determinação da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos, pela técnica de diluição em microplaca.

Extratos vegetais	Concentração inibitória mínima (CIM) µg/mL				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. setubal</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>
AFC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
AFF	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
AGC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
AGF	>1000	250	>1000	>1000	>1000
AUC	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
AUF	>1000	125	>1000	>1000	125
Ampicilina*	6,25	0,15	2,5	-	-
Amoxicilina*	-	-	-	1,56	-
Anfotericina B*	-	-	-	-	0,06
Fluconazol*	-	-	-	-	8

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; AFF: extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; AGC: extrato do caule de *A. graveolens*; AGF: extrato das folhas de *A. graveolens*; AUC: extrato do caule de *A. urundeuva*; AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

*Controles positivos.

As Figuras 19 e 20 ilustram os resultados (na qual a coloração indica presença ou ausência de atividade) da atividade antimicrobiana pelo método de diluição em microplaca com o uso da resazurina e do TTC, respectivamente.

Figura 19. Ensaio da atividade antibacteriana pela técnica de diluição em microplaca (extratos hidroetanólicos frente à *S. aureus*) revelado por resazurina 0,01%.

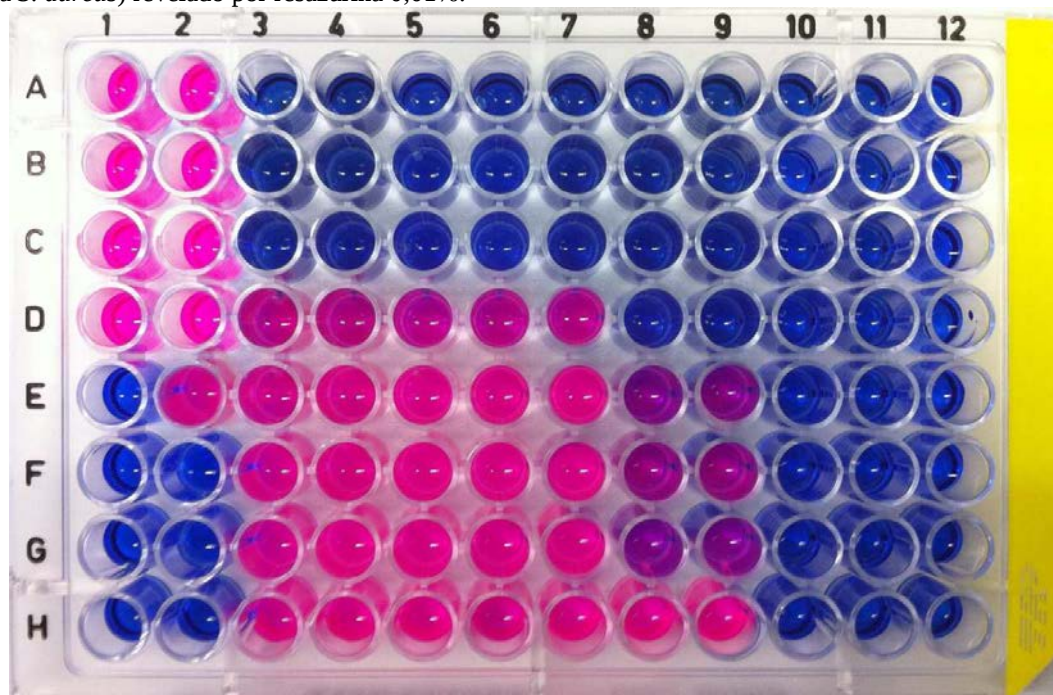
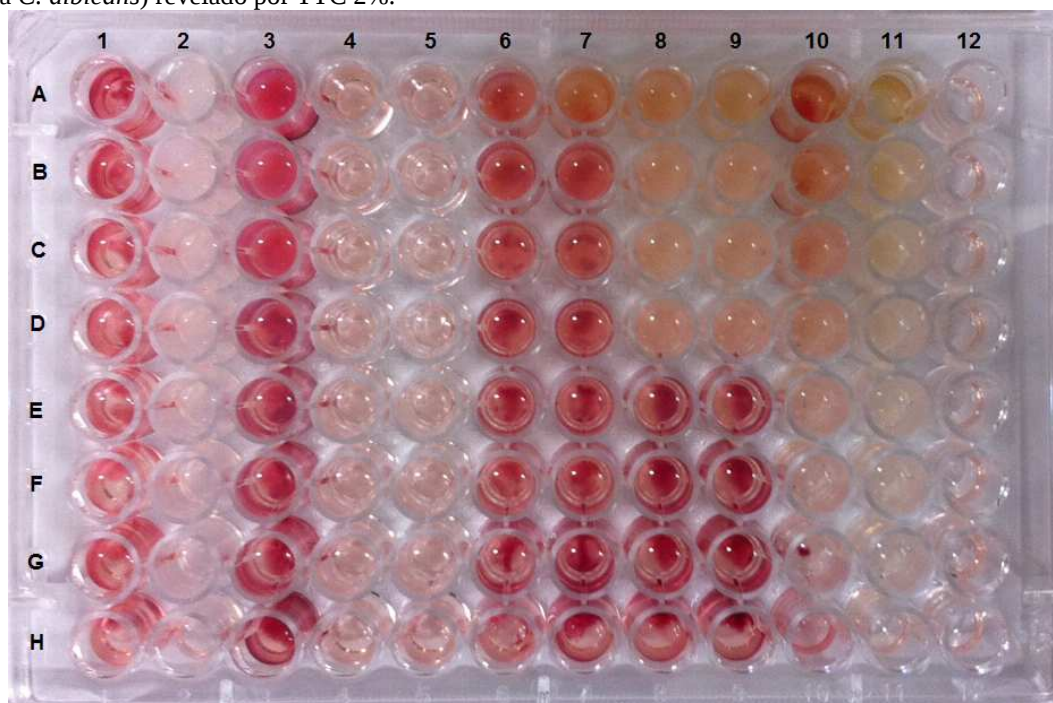


Figura 20. Ensaio da atividade antifúngica pela técnica de diluição em microplaca (extratos hidroetanólicos frente à *C. albicans*) revelado por TTC 2%.



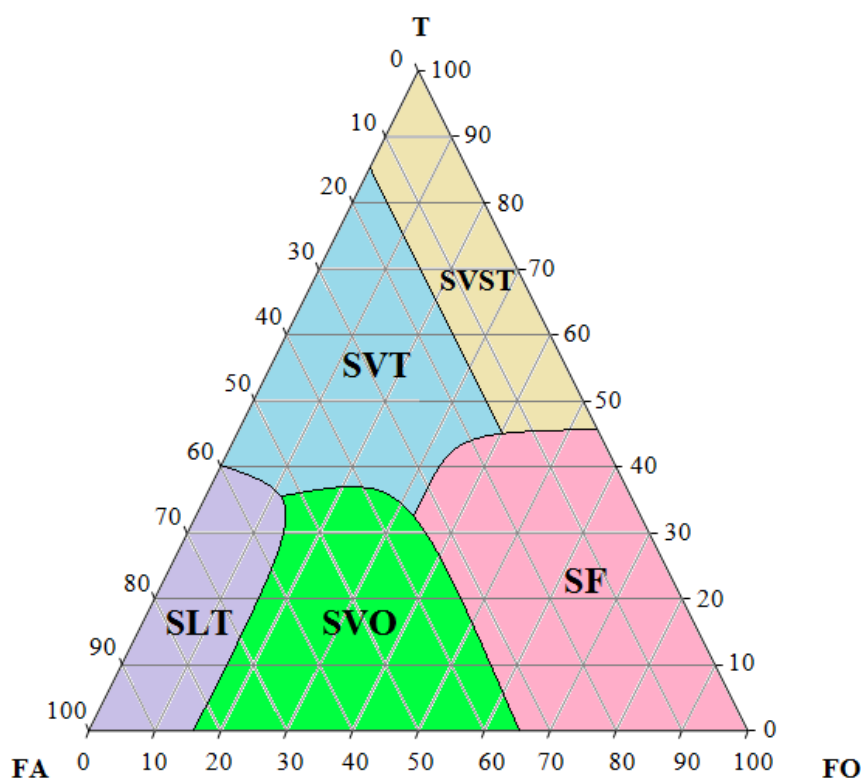
5.3 Incorporação dos extratos nos sistemas nanoestruturados

5.3.1 Desenvolvimento dos sistemas

Os sistemas foram preparados utilizando em diferentes concentrações uma mistura de tensoativos, óleo (colesterol) e água (tampão fosfato pH 7,4; dispersão de Pluronic F127® - 0,08% em tampão-fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4). As concentrações de cada componente da formulação foram calculadas, obtendo-se misturas que foram utilizadas na delimitação das diferentes regiões existentes no diagrama de fases. De acordo com a variação do óleo e água foram obtidos pontos com diferentes características estruturais.

O diagrama de fases correspondente ao S₁ apresenta características com pontos nas regiões SLT [fase oleosa (10%) e tensoativo (10-30%)]; SVO [fase oleosa (20-50%) e tensoativo (10-30%)] encontrados na região inferior e central do diagrama; SF [alta concentração de fase oleosa (40-80%) e tensoativo (10-40%)]; SVT (fase oleosa em torno de 10 a 30% e tensoativo entre 40 a 70%); SVST [alta concentração de fase oleosa (85-100%) e de tensoativo (50-100%)] (Figura 21).

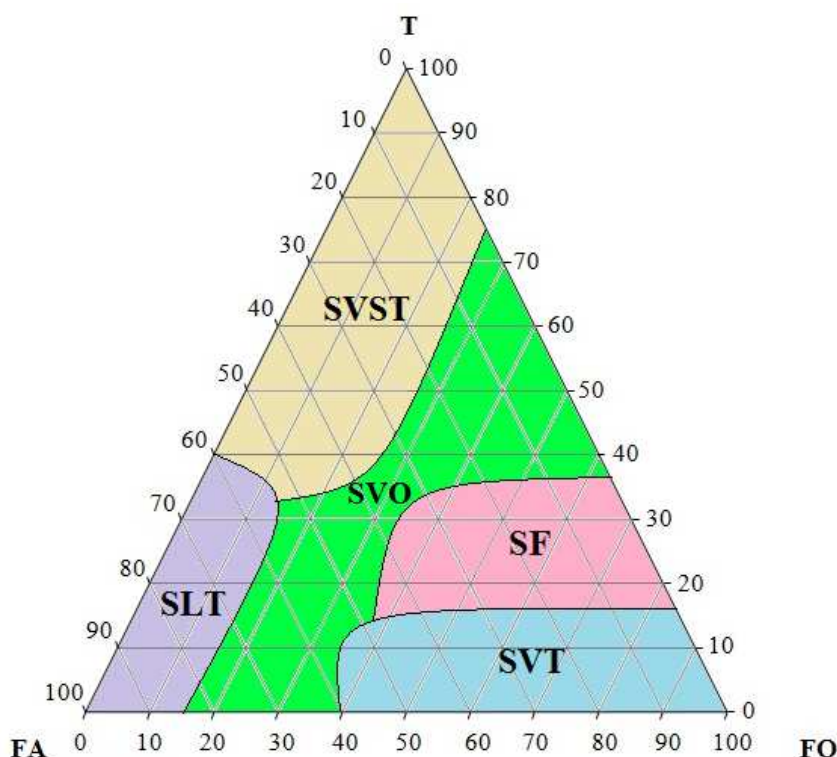
Figura 21. Diagrama de fases do sistema S₁, no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVO = sistema viscoso opaco; SF = separação de fases; SVT = sistema viscoso transparente; SVST = sistema viscoso semi-transparente.



Do sistema S_1 , constituído por mistura de polioxietileno 20-oleil éter (Brij[®] 98) e fosfatidilcolina de soja (2:1) como tensoativo, colesterol como fase oleosa e tampão-fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4 (fase aquosa) e do sistema S_2 , constituído por mistura de polioxietileno 20-cetil éter (Brij[®] 58) e fosfatidilcolina de soja (2:1) como tensoativo, colesterol como fase oleosa e uma dispersão de Pluronic F127[®] - 0,08% em tampão-fosfato 50 mmol.L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa, foi selecionado de ambos a formulação 1, sendo esta da região do diagrama de fases chamado de sistema líquido transparente, composta por 10% de colesterol, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa.

O diagrama de fases correspondente ao S_2 apresenta características com pontos semelhantes aos encontrados no S_1 como SLT que apresenta baixa concentração de óleo (10-15%) e de tensoativo (10-40%); SVT [alta concentração de fase oleosa (40-100%) e baixa concentração de tensoativo (10%)]; SVST [baixa concentração de fase oleosa (10-30%) e altas concentrações de tensoativo (80-100%)]; SVO [fase oleosa (10-60%) e de tensoativo (40-70%)]; SF [fase oleosa (40-80%) e tensoativo (20-30%)] (Figura 22). Tais formulações foram escolhidas para incorporação dos extratos vegetais por serem as mais límpidas, translúcidas e homogêneas dos diagramas de fases.

Figura 22. Diagrama de fases do sistema S_2 , no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVO = sistema viscoso opaco; SF = separação de fases; SVT = sistema viscoso transparente; SVST = sistema viscoso semi-transparente.



5.3.2 Caracterização estrutural dos sistemas

A estrutura das microemulsões é grandemente influenciada pelas propriedades físico-químicas dos componentes, e as proporções entre eles. Sendo assim, a caracterização estrutural dos sistemas é importante, pois através delas pode-se avaliar se houve alterações no comportamento destes sistemas com a incorporação do fármaco. As características estruturais dos sistemas 1 e 2 foram avaliadas através da determinação da distribuição do diâmetro das gotículas, com o objetivo de verificar se as formulações apresentavam tamanho nanométrico e IDP que revela a homogeneidade da população das gotículas. A Tabela 8 mostra os valores do diâmetro das gotículas e o IPD dos extratos incorporados nos sistemas nanoestruturados.

Tabela 8. Determinação do diâmetro das gotículas e índice de polidispersidade (IPD) dos extratos de *Astronium* sp incorporados nos sistemas nanoestruturados.

Formulação	Diâmetro das gotículas (nm)*		Índice de polidispersidade (IPD)*	
	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 1	Sistema 2
AFC	123,28 ^A ±1,808	126,68 ^A ±1,504	0,182 ^A ±0,009	0,208 ^A ±0,013
AFF	145,87 ^A ±1,720	135,98 ^A ±0,464	0,205 ^A ±0,008	0,215 ^A ±0,007
AGC	139,87 ^A ±1,657	129,50 ^A ±0,609	0,222 ^A ±0,023	0,190 ^A ±0,041
AGF	145,10 ^A ±0,034	130,27 ^A ±0,164	0,206 ^A ±0,024	0,202 ^A ±0,009
AUC	146,57 ^A ±1,950	127,62 ^A ±0,305	0,187 ^A ±0,022	0,225 ^A ±0,013
AUF	144,90 ^A ±1,350	124,63 ^A ±0,881	0,216 ^A ±0,052	0,181 ^A ±0,282
Base	121,85 ^A ±1,282	117,90 ^B ±0,143	0,200 ^A ±0,031	0,167 ^A ±0,015

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; **AFF:** extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; **AGC:** extrato do caule de *A. graveolens*; **AGF:** extrato das folhas de *A. graveolens*; **AUC:** extrato do caule de *A. urundeuva*; **AUF:** extrato das folhas de *A. urundeuva*.

*Resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

*Letras iguais na coluna significam que, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao nível de significância de 5% no teste de Tukey.

As formulações (bases) apresentaram diferença significativa em relação ao diâmetro das gotículas, a medida das partículas dos sistemas 1 e 2 (bases) apresentaram o diâmetro de 121,85±1,282 e 117,90±0,143, respectivamente. A incorporação dos extratos nos sistemas 1 e 2 promoveram um discreto aumento no diâmetro das gotículas, com variação de 123,28 ± 1,808 e 146,57 ± 1,950, porém elas mantiveram sua isotropia e homogeneidade com um pequeno IDP. Os extratos incorporados nos sistemas nanoestruturados apresentaram um tamanho médio de partícula inferior a 150 nm.

5.4 Avaliação *in vitro* do trabalho e da força mucoadesiva

A força mucoadesiva dos sistemas nanoestruturados é a força necessária para remover a formulação da superfície da mucosa gástrica. A incorporação do extrato das folhas de *A. urundeuva* nos sistemas nanoestruturados 1 e 2 não modificou a força mucoadesiva, não havendo diferença significativa entre as formulações (Tabela 9).

Tabela 9. Trabalho e força mucoadesiva do extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporado nos sistemas microemulsionados 1 e 2.

FORMULAÇÕES	TRABALHO DA FORÇA MUCOADESIVA (N)*	FORÇA MUCOADESIVA (N)*
S1	0,013±0,001	0,004±0,001
AUF S1	0,003±0,003	0,003±0,002
S2	0,008±0,003	0,004±0,004
AUF S2	0,012±0,004	0,004±0,004

AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*; S1: sistema nanoestruturado 1; S2: sistema nanoestruturado 2.

*Resultados expressos em média e desvio padrão de três repetições.

*Não houve diferença significativa entre as formulações.

5.5 Determinação da CIM dos extratos de *Astronium* sp incorporados nos sistemas nanoestruturados

A incorporação dos extratos hidroetanólicos do caule e das folhas de *Astronium* sp nos sistemas nanoestruturados desenvolvidos potencializaram a ação antimicrobiana (Tabela 6).

Os extratos de *Astronium* sp não tiveram sua atividade contra *S. setubal* (CIM >1000 µg/mL) potencializada mesmo após serem incorporados. Anteriormente a incorporação a espécie de *A. graveolens* não apresentava a atividade frente ao *H. pylori* (CIM >1000 µg/mL) e *E. coli* (CIM >1000 µg/mL). Com a incorporação dos extratos do caule e das folhas nos sistemas 1 e 2 obtiveram valores de CIM de 1000 µg/mL. Destacam-se os resultados obtidos com o extrato das folhas de *A. graveolens* (AGF) que quando incorporado no sistema 2 teve sua atividade potencializada em 32 vezes frente ao *S. aureus* (AGF não incorporado - CIM = 250 µg/mL e AGF incorporado sistema 2 - CIM = 7,81 µg/mL). Além deste, o extrato das folhas de *A. urundeuva* (AUF) que quando incorporado no sistema 2 apresentou CIM = 1,95 µg/mL, enquanto que o não incorporado apresentou CIM = 125 µg/mL, ou seja, a atividade frente ao *S. aureus* melhorou 64 vezes quando o extrato foi solubilizado no sistema nanoestruturado estudado.

Em relação à atividade contra *C. albicans* somente os extratos do caule de *A. graveolens* (AGC - CIM >1000 µg/mL) e das folhas de *A. fraxinifolium* (AFF - CIM >1000 µg/mL) não tiveram suas atividades potencializadas. Ressalta-se os resultados obtidos com o extrato do caule de *A. fraxinifolium* (AFC) que antes da incorporação obteve-se um CIM >1000 µg/mL, após a sua solubilização nos sistemas 1 e 2, as CIMs obtidas foram de 62,50 e 7,81 µg/mL, respectivamente, tendo sua atividade potencializada em 16 e 128 vezes, respectivamente. No que diz respeito ao extrato das folhas de *A. graveolens* quando incorporado no sistema 2 apresentou CIM = 250 µg/mL, enquanto que o não incorporado apresentou CIM >1000 µg/mL, tendo sua atividade frente a *C. albicans* potencializada em 4 vezes. E o extrato do caule de *A. urundeuva* (AUC) que ao ser incorporado no sistema 2 apresentou uma CIM = 500 µg/mL, e o não incorporado uma CIM >1000 µg/mL, ou seja, duas vezes mais ativo frente a levedura.

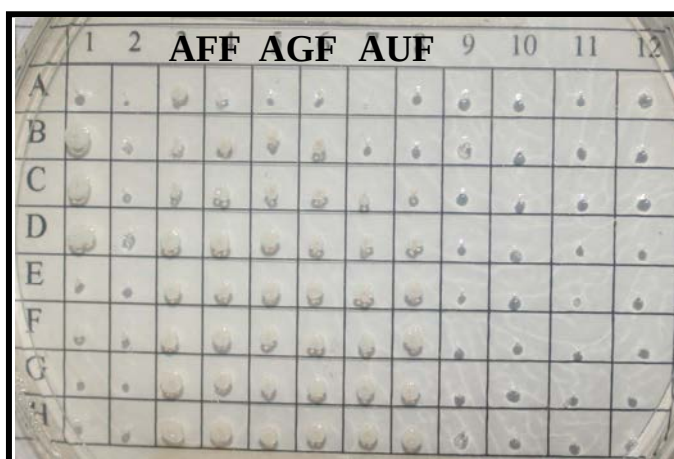
Tabela 10. Determinação da atividade antimicrobiana e da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos, pela técnica de diluição em microplaca.

Extratos vegetais				Concentração inibitória mínima (CIM) µg/mL				
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. setubal</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>
<i>A. fraxinifolium</i>	AFC	não incorporado		> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
		incorporado	Sistema 1	> 1000	1000	> 1000	> 1000	62,5
			Sistema 2	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	7,81
	AFF	não incorporado		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
		incorporado	Sistema 1	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
			Sistema 2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>A. graveolens</i>	AGC	não incorporado		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
		incorporado	Sistema 1	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
			Sistema 2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	AGF	não incorporado		>1000	250	>1000	>1000	>1000
		incorporado	Sistema 1	1000	250	>1000	>1000	1000
			Sistema 2	1000	7,81	>1000	>1000	250
<i>A. urundeuva</i>	AUC	não incorporado		>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
		incorporado	Sistema 1	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
			Sistema 2	>1000	>1000	>1000	>1000	500
	AUF	não incorporado		>1000	125	>1000	>1000	125
		incorporado	Sistema 1	>1000	125	>1000	500	125
			Sistema 2	>1000	1,95	>1000	>1000	125
BASE - SISTEMA 1				>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
BASE - SISTEMA 2				>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; AFF: extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; AGC: extrato do caule de *A. graveolens*; AGF: extrato das folhas de *A. graveolens*; AUC: extrato do caule de *A. urundeuva*; AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

A determinação da CBM foi realizada somente para os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp que apresentaram atividade antimicrobiana. Os resultados da determinação da CBM são apresentados nas Figuras de 23 a 31.

Figura 23. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas das espécies de *Astronium* sp frente ao *S. aureus*.

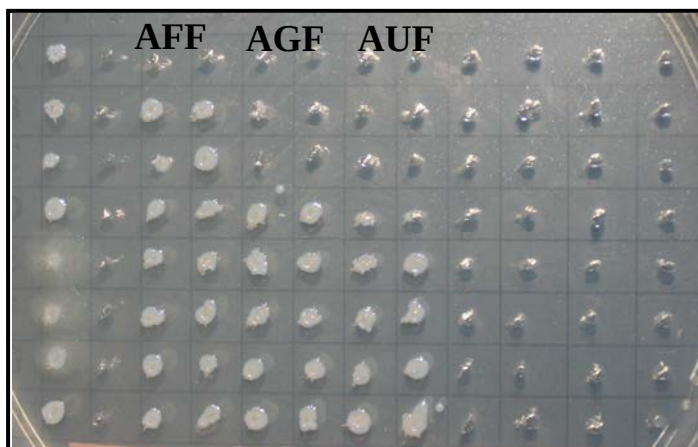


Fonte: Autor.

Os extratos das folhas de *A. graveolens* e *A. urundeuva* foram bactericidas nas concentrações de 1000 µg/mL e 125 µg/mL (CBM = CIM), respectivamente contra *S. aureus*.

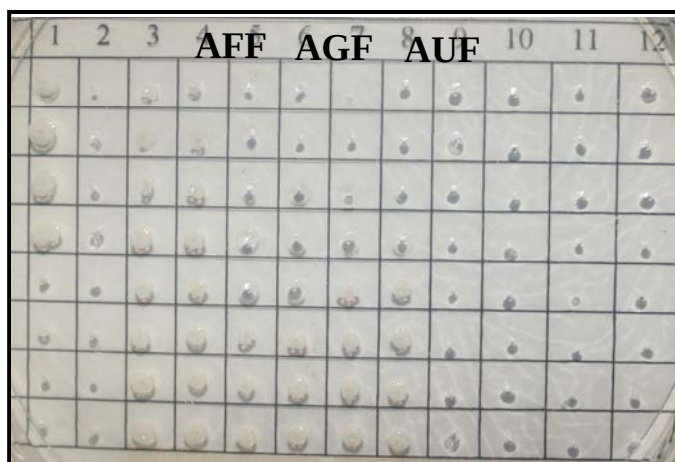
Os extratos das folhas das espécies mencionadas foram bactericidas nas concentrações de 250 µg/mL quando incorporados no sistema 1, onde o valor da CBM foi semelhante ao encontrado no CIM. Ao serem incorporados no sistema 2 foram bactericidas nas concentrações de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente.

Figura 24. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Astronium* sp incorporados no sistema 1 frente ao *S. aureus*.



Fonte: Autor.

Figura 25. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Astronium* sp incorporados no sistema 2 frente ao *S. aureus*.



Fonte: Autor.

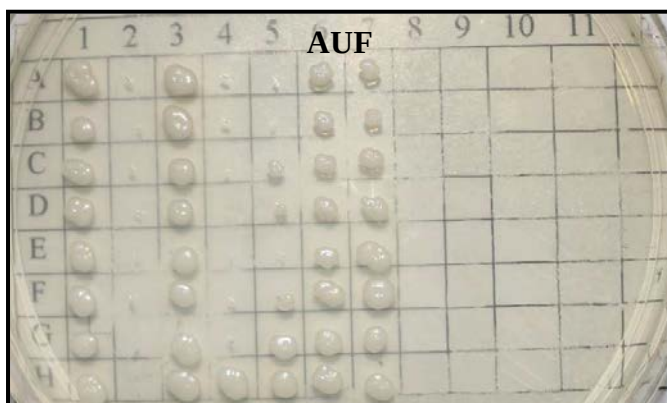
Figura 26. CBM dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Astronium* sp incorporados no sistema 1 frente ao *H. pylori*.



Fonte: Autor.

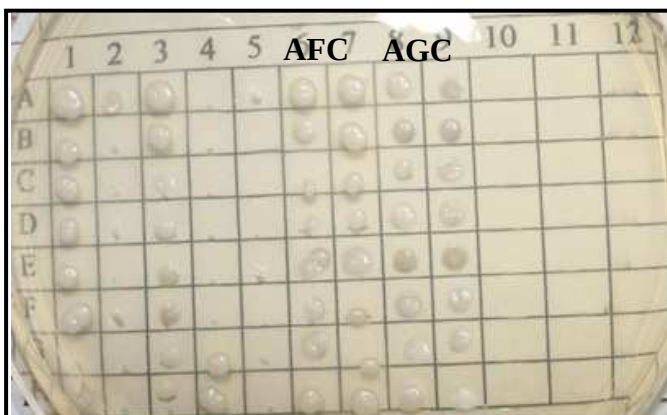
Para o *H. pylori* os extratos do caule e das folhas de *Astronium* sp incorporado ou não nos sistemas microemulsionados apresentaram efeito bacteriostático, e para *C. albicans* ação fungistática.

Figura 27. CFM dos extratos hidroetanólicos das folhas das espécies de *Astronium* sp frente a *C. albicans*.



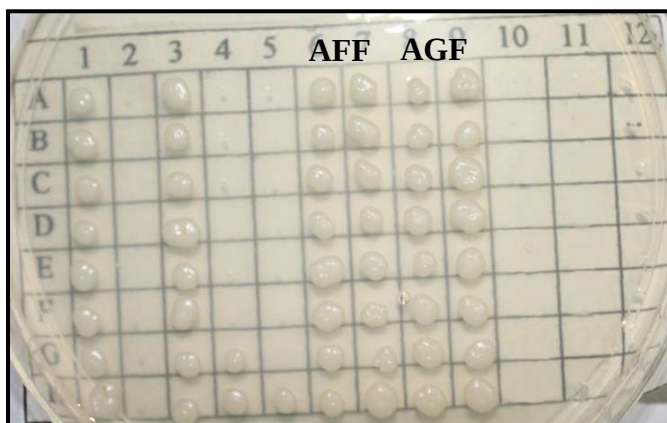
Fonte: Autor.

Figura 28. CFM dos extratos hidroetanólicos do caule de *Astronium* sp incorporados no sistema 1 frente a *C. albicans*.



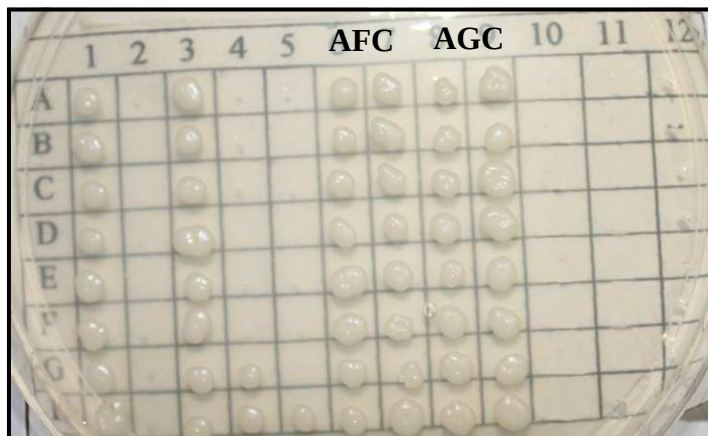
Fonte: Autor.

Figura 29. CFM dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Astronium* sp incorporados no sistema 1 frente a *C. albicans*.



Fonte: Autor.

Figura 30. CFM dos extratos hidroetanólicos do caule de *Astronium* sp incorporados no sistema 2 frente a *C. albicans*.



Fonte: Autor.

Figura 31. CFM dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Astronium* sp incorporados no sistema 2 frente a *C. albicans*.



Fonte: Autor.

A inibição do crescimento microbiano promovido pelos extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp expressos em porcentagem estão apresentados nas Figuras 32 a 36. De uma forma geral, os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp quando incorporados nos sistemas nanoestruturados 1 e 2 apresentaram uma melhora significativa na inibição do crescimento microbiano, e consequentemente em uma melhor ação antimicrobiana.

Os extratos do caule e das folhas de *Astronium* sp mesmo após a incorporação nos sistemas 1 e 2 não tiveram sua atividade potencializada frente a *E. coli* permanecendo com valores de inibição que variaram de 90 a 20%. Os extratos do caule de *A. fraxinifolium* e da folha de *A. urundeuva* incorporados ou não nos sistemas 1 e 2 inibiram 50% do crescimento bacteriano nas concentrações de 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente (Figura 32).

A incorporação dos extratos de *Astronium* sp potencializou a inibição do crescimento de *S. aureus*. A inibição de 50% sobre o crescimento dessa bactéria pelos extratos das folhas das espécies de *A. fraxinifolium* (AFF não incorporado - 250 µg/mL) e *A. urundeuva* (AUF não incorporado - 250 µg/mL) incorporados nos sistema 1 e 2 foi obtida na concentração de 31,25 µg/mL. E o extrato do caule de *A. graveolens* (AGC não incorporado - 1000 µg/mL) que ao ser incorporado no sistema 2 apresentou uma inibição 50% na concentração de 15,62 µg/mL (Figura 33).

A incorporação no sistema 2 resultou em melhor atividade inibitória quanto comparado com o sistema 1. Esse resultado é bastante evidenciado em relação à bactéria *S. setubal*. Os extratos do caule de *A. fraxinifolium* e *A. urundeuva* não incorporados e incorporados no sistema 1 apresentaram inibição de 50% na concentração de 62,5 µg/mL e incorporados no sistema 2 na concentração de 7,81 µg/mL e 15,62 µg/mL, respectivamente. Entretanto, os extratos das folhas foram mais eficazes em inibir o crescimento da *S. setubal*. Os extratos das folhas de *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva* incorporados no sistema 2 tiveram inibição de 50% na concentração de 7,81 µg/mL. Estes mesmos extratos antes de serem incorporados apresentaram inibição de 50% nas concentrações de 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 15,62 µg/mL, respectivamente (Figura 34).

É importante destacar que os extratos do caule e das folhas de *A. urundeuva* frente à *H. pylori* tiveram sua atividade inibitória potencializada após a incorporação nos sistemas nanoestruturados. Uma vez que o extrato dessa espécie antes da incorporação apresentou inibição de 50% na concentração de 660 µg/mL e ao ser incorporado no sistema 1 inibiu 65% do crescimento da bactéria *H. pylori* em uma concentração menor (7,81 µg/mL). A incorporação dos extratos nos sistemas nanoestruturados promoveu uma inibição maior (100 a 60%) em relação aos extratos não incorporados nestes sistemas (85 a 7%) (Figura 35).

O extrato das folhas de *A. graveolens* não incorporados e incorporados nos sistemas 1 e 2 apresentaram inibição de 50% no crescimento de *C. albicans* na concentração de 250 µg/mL. No entanto, o extrato das folhas *A. urundeuva* antes de ser incorporado apresentou inibição de 50% na concentração de 15,62 µg/mL e ao ser incorporado nos sistemas nanoestruturados 1 e 2 apresentou inibição de 50% na concentração de 7,81 µg/mL (Figura 36).

Figura 32. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a *E. coli*.

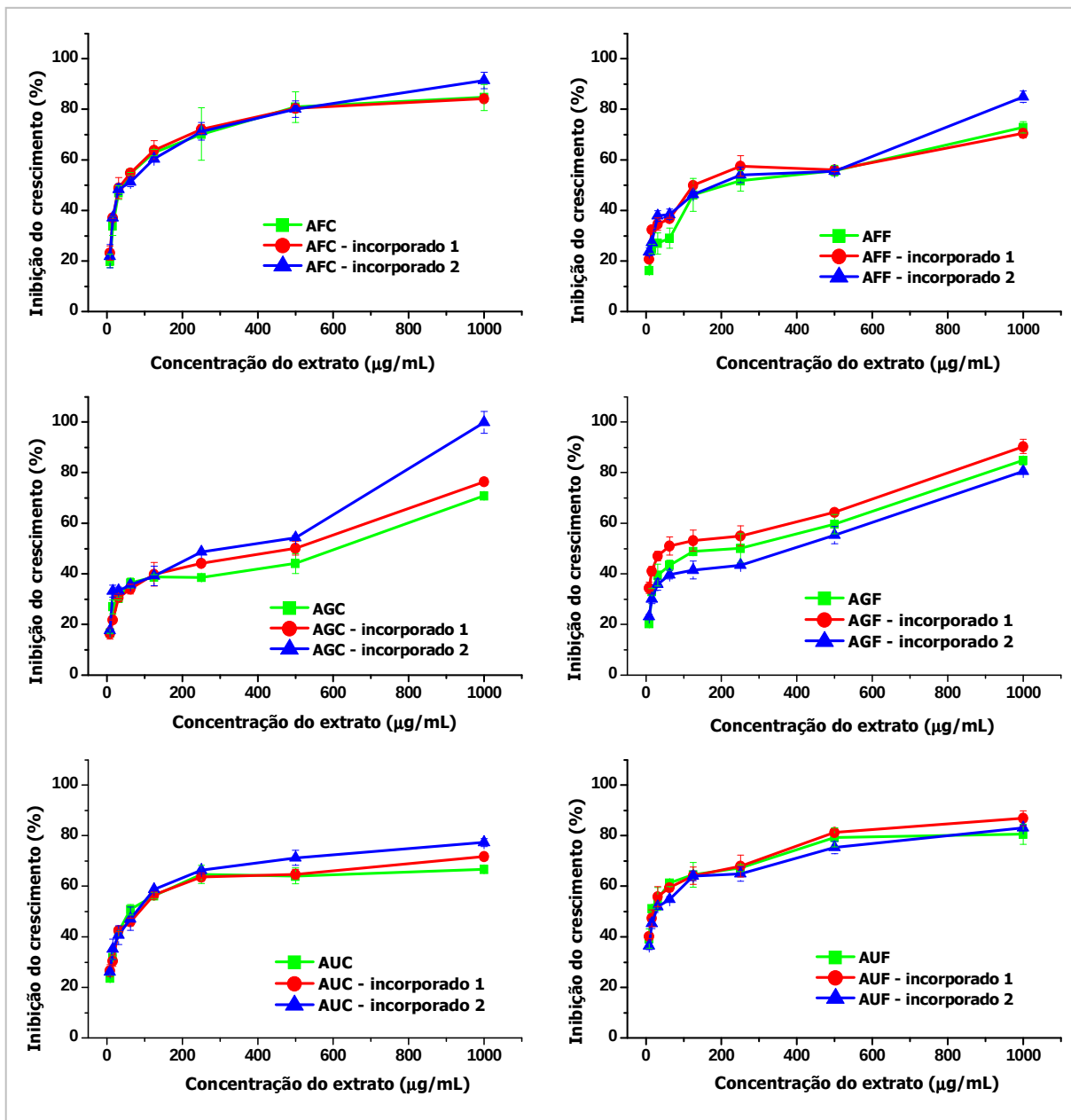


Figura 33. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a *S. aureus*.

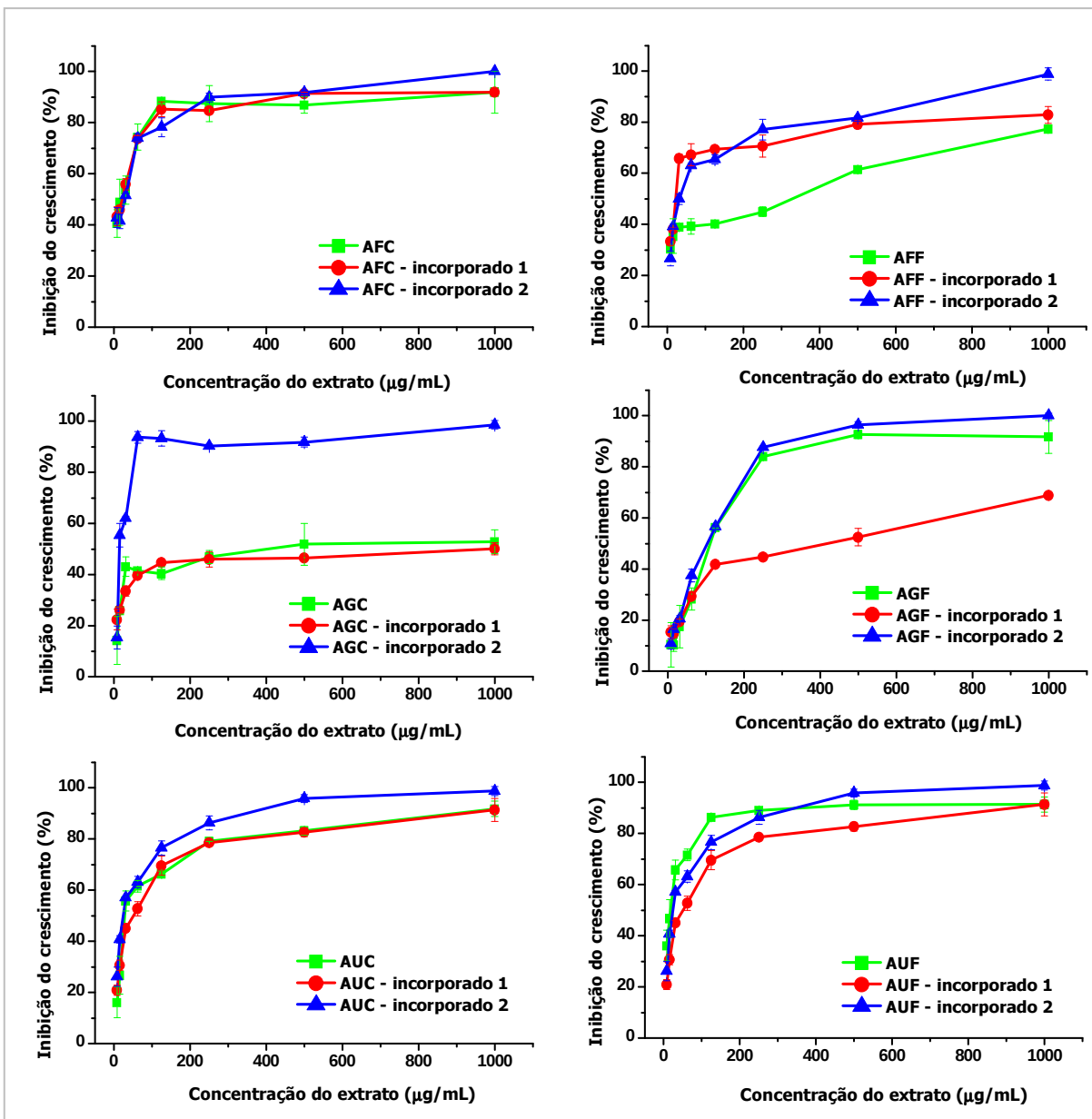


Figura 34. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a *S. setubal*.

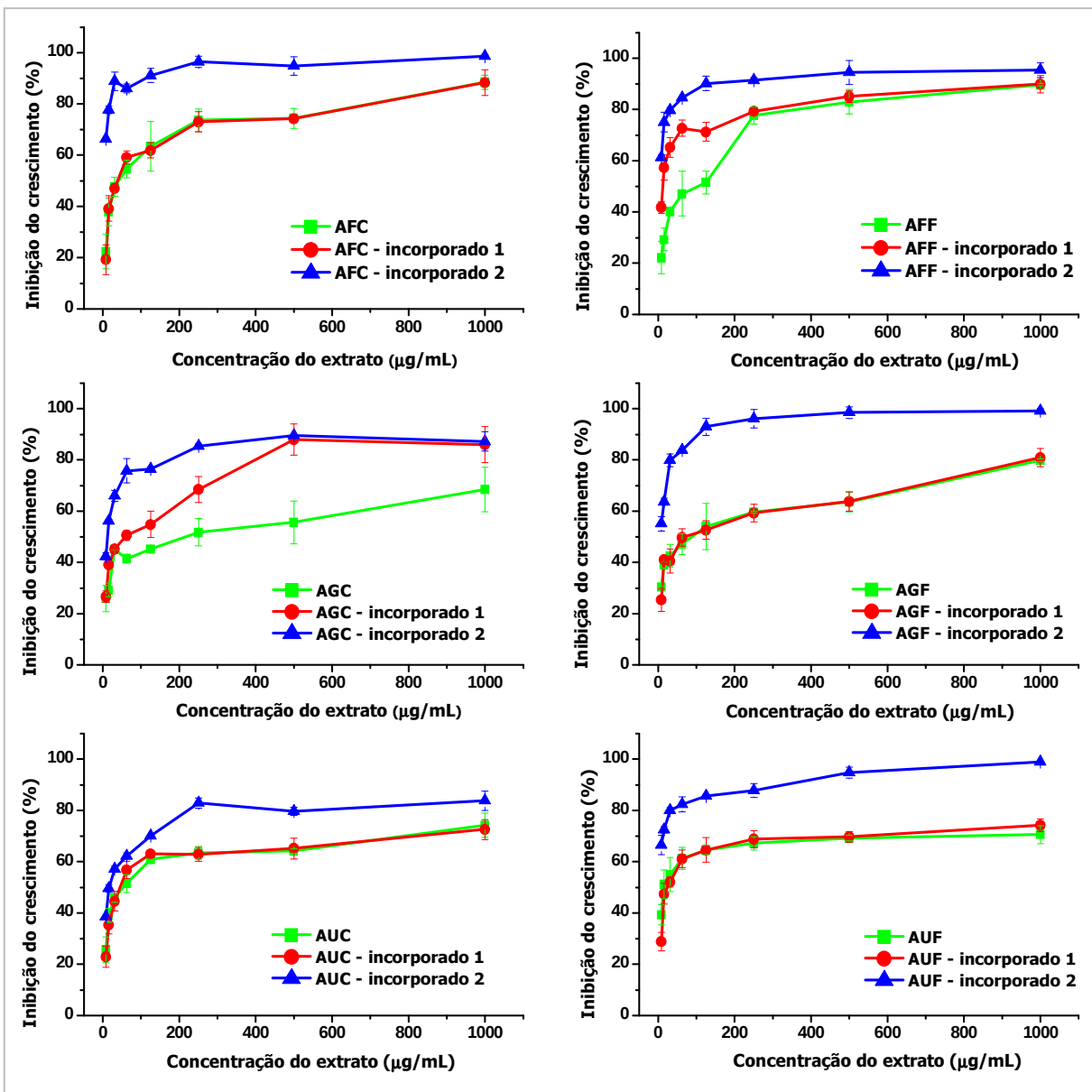


Figura 35. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a *H. pylori*.

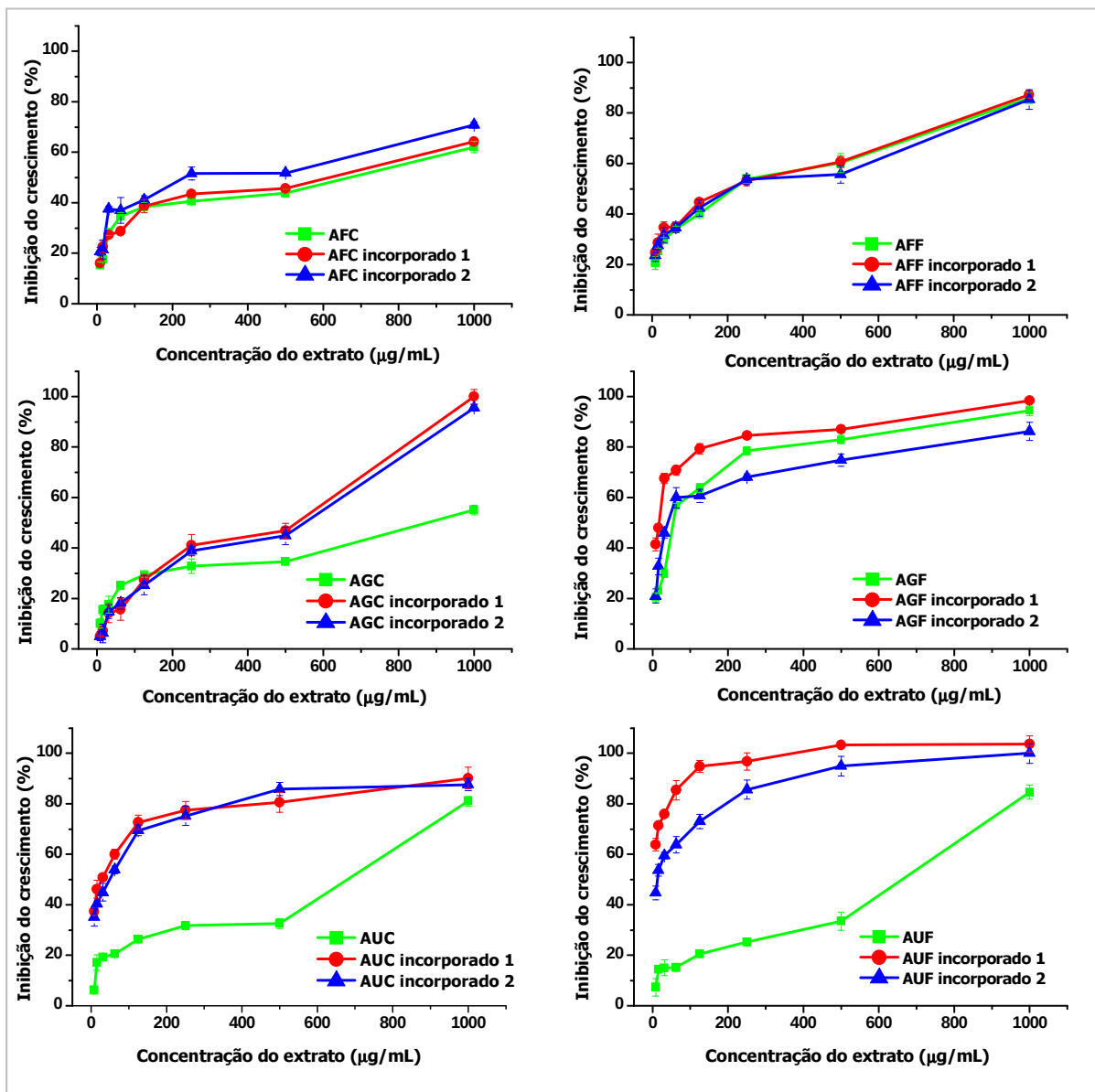
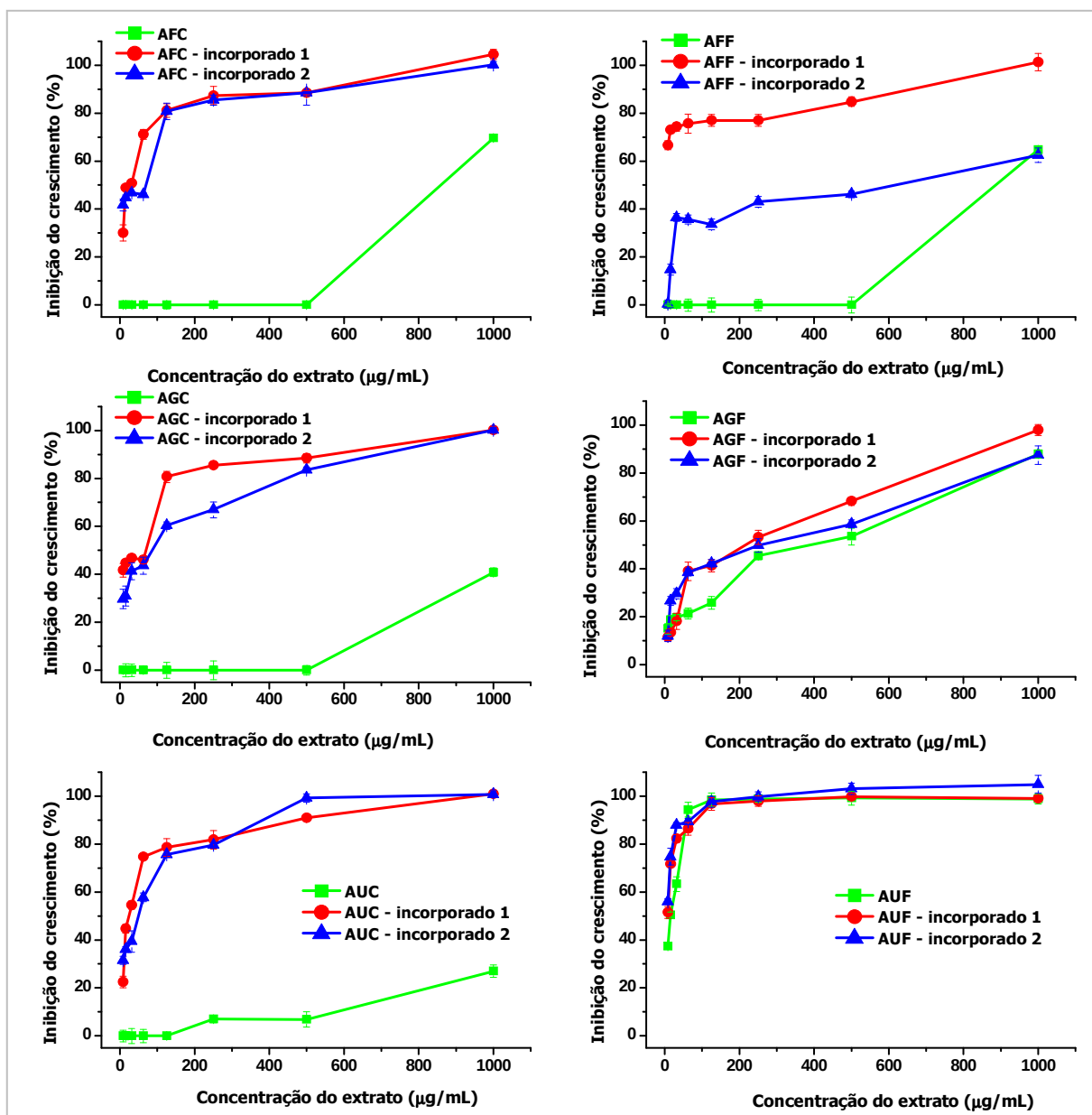


Figura 36. Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados frente a *C. albicans*.



5.6 Determinação do IC₅₀ e IS

Os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp foram avaliados quanto a sua citotoxicidade (IC₅₀) utilizando as linhagens celulares VERO (células fibroblásticas renais) e HeLa (células de adenocarcinoma de cervix humano), onde foi determinada a maior concentração do extrato capaz de inviabilizar pelo menos 50% das células. O índice de seletividade (IS) foi determinado através da razão entre o IC₅₀ e o CIM.

Os resultados das determinações do IC₅₀ e IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados são apresentados nas Tabelas 11 a 16.

Tabela 11. Determinação do IC₅₀ e IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para *E. coli*.

Extratos			Parâmetros				
			VERO			HeLa	
			CIM (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AFC	não incorporado		>1000	767	< 0,76	544	1,41
	incorporado	S ₁	>1000	83	0	30	2,77
		S ₂	>1000	824	< 0,82	381	2,16
AFF	não incorporado		>1000	950	< 0,95	388	2,45
	incorporado	S ₁	>1000	176	< 0,17	53	3,32
		S ₂	>1000	426	< 0,42	67	6,36
AGC	não incorporado		>1000	>1000	NR*	950	<1,05
	incorporado	S ₁	>1000	902	< 0,90	77	11,71
		S ₂	>1000	903	< 0,90	205	4,40
AGF	não incorporado		>1000	833	< 0,83	403	2,07
	incorporado	S ₁	1000	124	0,12	48	2,58
		S ₂	1000	362	0,36	52	6,96
AUC	não incorporado		>1000	900	< 0,90	556	1,62
	incorporado	S ₁	>1000	459	< 0,45	113	4,06
		S ₂	>1000	311	< 0,31	58	5,36
AUF	não incorporado		>1000	536	< 0,53	359	1,49
	incorporado	S ₁	>1000	191	< 0,19	58	3,29
		S ₂	>1000	240	< 0,24	64	3,75
BASE	S ₁		NR*	107	NR*	41	NR*
	S ₂		NR*	28	NR*	13	NR*

* NR - Não calculado.

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; **AFF:** extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; **AGC:** extrato do caule de *A. graveolens*; **AGF:** extrato das folhas de *A. graveolens*; **AUC:** extrato do caule de *A. urundeuva*; **AUF:** extrato das folhas de *A. urundeuva*.

Os extratos de *Astronium* sp não incorporados e incorporados nos sistemas nanoestruturados sistemas 1 e 2 apresentaram uma CIM >1000 µg/mL frente ao micro-organismo *E. coli*, e após a incorporação na microemulsão obteve-se apenas para o AGF uma CIM igual a 1000 µg/mL em ambos os sistemas estudados.

No que diz respeito ao ensaio de citotoxicidade, para a linhagem VERO, observou-se que após a incorporação dos extratos nos sistemas obtidos, os valores de IC₅₀ foram menores em relação aos extratos não incorporados, ou seja, houve um aumento da toxicidade, entretanto, diante dos resultados obtidos quando comparados com o da literatura, pode-se afirmar que esses produtos naturais não são tóxicos (MUHAMMAD et al., 2011; AHMED et al., 2014; MOUSTAFA et al., 2014; EL-HALLOUTY et al., 2015; REMILA et al., 2015).

Quando os extratos não incorporados foram avaliados frente às células HeLa, observou-se que esses produtos foram mais tóxicos (valores menores de IC₅₀) para essa linhagem e mais ainda após a incorporação em ambos os sistemas estudados.

Diante dos dados obtidos a partir da CIM e do IC₅₀ calculou-se o IS, e para essas linhagens estudadas, nenhum extrato não incorporado e incorporado em ambos os sistemas foram seletivos frente a *E. coli*, pois os valores de IS foram < 10.

Tabela 12. Determinação do IC₅₀ e IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para *S. aureus*.

Extratos			Parâmetros				
			VERO			HeLa	
			CIM (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AFC	não incorporado		>1000	767	< 0,76	544	<0,54
	incorporado	S ₁	1000	83	0	30	0
		S ₂	>1000	824	< 0,82	381	<0,38
AFF	não incorporado		>1000	950	< 0,95	388	<0,38
	incorporado	S ₁	>1000	176	< 0,17	53	0
		S ₂	>1000	426	< 0,42	67	0
AGC	não incorporado		>1000	>1000	NR*	950	<0,95
	incorporado	S ₁	>1000	902	< 0,90	77	0
		S ₂	>1000	903	< 0,90	205	<0,21
AGF	não incorporado		250	833	3,33	403	1,61
	incorporado	S ₁	250	124	0,50	48	0,19
		S ₂	7,81	362	46,35	52	6,66
AUC	não incorporado		>1000	900	< 0,90	556	<0,56
	incorporado	S ₁	>1000	459	< 0,45	113	<0,11
		S ₂	>1000	311	< 0,31	58	0
AUF	não incorporado		125	536	4,29	359	2,87
	incorporado	S ₁	125	191	1,53	58	0,46
		S ₂	1,95	240	123,08	64	32,82
BASE	S ₁		>1000	107	NR*	41	NR*
	S ₂		>1000	28	NR*	13	NR*

* NR - Não realizado.

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; AFF: extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; AGC: extrato do caule de *A. graveolens*; AGF: extrato das folhas de *A. graveolens*; AUC: extrato do caule de *A. urundeuva*; AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

Os extratos das folhas de *A. graveolens* (AGF) e *A. urundeuva* (AUF) mostraram-se eficazes na inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* com uma CIM igual a 250 e 125 µg/mL, respectivamente, enquanto que os outros extratos apresentaram valores de CIM >1000 µg/mL. Após a incorporação, no S₁ o extrato do caule de *A. fraxinifolium* (AFC) obteve uma CIM de 1000 µg/mL e os extratos das folhas de *A. graveolens* (AGF) e *A. urundeuva* (AUF) uma CIM de 250 e 125 µg/mL, respectivamente e, no S₂ o extrato das folhas de *A. graveolens* e *A. urundeuva* apresentou CIM de 7,81 e 1,95 µg/mL.

Em relação à citotoxicidade, para a linhagem celular VERO o valor do IC₅₀ para o extrato do caule de *A. fraxinifolium* (AFC) quando incorporado aumentou, ou seja, houve uma redução da toxicidade.

Para as células HeLa observou-se que os extratos não incorporados apresentaram uma menor citotoxicidade (valores maiores de IC₅₀) quando comparados com os produtos naturais incorporados em ambos os sistemas. Entretanto, mesmo esses extratos tendo as suas respectivas toxicidades aumentadas após a incorporação nos respectivos sistemas nanoestruturados, não são considerados tóxicos.

Os extratos das folhas de *A. graveolens* (AGF) e *A. urundeuva* (AUF) quando incorporados no S₂ foram seletivos para linhagem VERO com valores de IS iguais a 46,35 e 123,08, respectivamente, ou seja, esses produtos naturais tiveram suas respectivas toxicidades reduzidas em 14 e 29 vezes. O extrato das folhas de *A. urundeuva* quando incorporado no S₂ também foi seletivo para a linhagem HeLa com um IS de 32,82, tendo a toxicidade reduzida em 11 vezes.

Tabela 13. Determinação do IC₅₀ e IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para *S. setubal*.

Extratos			Parâmetros				
			VERO			HeLa	
			CIM (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AFC	não incorporado		>1000	767	< 0,76	544	< 0,54
	incorporado	S ₁	>1000	83	0	30	0
		S ₂	>1000	824	< 0,82	381	< 0,38
AFF	não incorporado		>1000	950	< 0,95	388	< 0,39
	incorporado	S ₁	>1000	176	< 0,17	53	0
		S ₂	>1000	426	< 0,42	67	0
AGC	não incorporado		>1000	>1000	NR*	950	< 0,95
	incorporado	S ₁	>1000	902	< 0,90	77	0
		S ₂	>1000	903	< 0,90	205	< 0,21
AGF	não incorporado		>1000	833	< 0,83	403	< 0,40
	incorporado	S ₁	>1000	124	< 0,12	48	0
		S ₂	>1000	362	< 0,36	52	0
AUC	não incorporado		>1000	900	< 0,90	556	< 0,56
	incorporado	S ₁	>1000	459	< 0,45	113	< 0,11
		S ₂	>1000	311	< 0,31	58	0
AUF	não incorporado		>1000	536	< 0,53	359	< 0,36
	incorporado	S ₁	>1000	191	< 0,19	58	0
		S ₂	>1000	240	< 0,24	64	0
BASE	S ₁		>1000	107	NR*	41	NR*
	S ₂		>1000	28	NR*	13	NR*

* NR - Não realizado.

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; AFF: extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; AGC: extrato do caule de *A. graveolens*; AGF: extrato das folhas de *A. graveolens*; AUC: extrato do caule de *A. urundeuva*; AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

Os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp não incorporados e incorporados nos sistemas nanoestruturados (S₁ e S₂) apresentaram uma CIM >1000 µg/mL frente a *S. setubal*.

Na avaliação da citotoxicidade para as linhagens VERO e HeLa, verificou-se que após a incorporação dos extratos nos sistemas, os valores de IC₅₀ foram reduzidos, havendo assim um aumento na toxicidade, porém, ao se comparar os resultados obtidos com os da literatura observa-se que os extratos não podem ser considerados tóxicos, uma vez que todos os valores obtidos foram maiores que 20 µg/mL (AHMED et al., 2014).

A partir dos dados obtidos da CIM e do IC₅₀ calculou-se o índice de seletividade (IS), e para as linhagens estudadas nenhum dos extratos não incorporados e incorporados nos sistemas 1 e 2 foram seletivos frente a *S. setubal*, ou seja, todos tiveram IS <10.

Tabela 14. Determinação do IC₅₀ e IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para *H. pylori*.

Extratos			Parâmetros				
			VERO			HeLa	
			CIM (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AFC	não incorporado		>1000	767	< 0,76	544	< 0,54
	incorporado	S ₁	>1000	83	0	30	0
		S ₂	>1000	824	< 0,82	381	< 0,38
AFF	não incorporado		>1000	950	< 0,95	388	< 0,38
	incorporado	S ₁	>1000	176	< 0,17	53	0
		S ₂	>1000	426	< 0,42	67	0
AGC	não incorporado		>1000	>1000	NR*	950	< 0,95
	incorporado	S ₁	1000	902	0,90	77	0
		S ₂	>1000	903	< 0,90	205	< 0,21
AGF	não incorporado		>1000	833	< 0,83	403	< 0,40
	incorporado	S ₁	>1000	124	< 0,12	48	0
		S ₂	>1000	362	< 0,36	52	0
AUC	não incorporado		>1000	900	< 0,90	556	< 0,55
	incorporado	S ₁	1000	459	0,45	113	0,11
		S ₂	>1000	311	< 0,31	58	0
AUF	não incorporado		>1000	536	< 0,53	359	< 0,35
	incorporado	S ₁	500	191	0,38	58	0,12
		S ₂	>1000	240	< 0,24	64	0
BASE	S ₁		>1000	107	NR*	41	NR*
	S ₂		>1000	28	NR*	13	NR*

* NR - Não realizado.

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; **AFF:** extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; **AGC:** extrato do caule de *A. graveolens*; **AGF:** extrato das folhas de *A. graveolens*; **AUC:** extrato do caule de *A. urundeuva*; **AUF:** extrato das folhas de *A. urundeuva*.

Os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp não apresentaram atividade antimicrobiana frente a *H. pylori* (CIM >1000 µg/mL), e após a incorporação no S₁ apenas os extratos do caule de *A. graveolens* (AGC) e *A. urundeuva* (AUC) apresentaram CIM de 1000 µg/mL para ambas espécies e o extrato das folhas de *A. urundeuva* (AUF) obteve CIM de 500 µg/mL.

No ensaio de citotoxicidade para as linhagens VERO e HeLa, observou-se que após a incorporação dos extratos nos sistemas, houve uma diminuição dos valores de IC₅₀, ou seja, um aumento na toxicidade, entretanto, ao se comparar estes dados com os da literatura mais uma vez pode-se afirmar que os extratos não tóxicos (MUHAMMAD et al., 2011; AHMED et al., 2014; MOUSTAFA et al., 2014; EL-HALLOUTY et al., 2015; REMILA et al., 2015).

Para as linhagens estudadas os extratos não incorporados e incorporados nos sistemas 1 e 2 não foram seletivos frente a *H. pylori* (IS <10).

Tabela 15. Determinação do IC₅₀ e IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados para *C. albicans*.

Extratos			Parâmetros				
			VERO			HeLa	
			CIM (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
AFC	não incorporado		>1000	767	< 0,76	544	< 0,54
	incorporado	S ₁	62,5	83	1,33	30	0,48
		S ₂	7,81	824	105,51	381	48,78
AFF	não incorporado		>1000	950	< 0,95	388	< 0,39
	incorporado	S ₁	>1000	176	< 0,17	53	0
		S ₂	>1000	426	< 0,42	67	0
AGC	não incorporado		>1000	>1000	NR*	950	< 0,95
	incorporado	S ₁	>1000	902	< 0,90	77	0
		S ₂	>1000	903	< 0,90	205	< 0,21
AGF	não incorporado		>1000	833	< 0,83	403	< 0,40
	incorporado	S ₁	1000	124	0,12	48	0
		S ₂	250	362	1,45	52	0,21
AUC	não incorporado		>1000	900	< 0,90	556	< 0,56
	incorporado	S ₁	>1000	459	< 0,45	113	< 0,11
		S ₂	500	311	0,62	58	0,12
AUF	não incorporado		125	536	4,29	359	2,87
	incorporado	S ₁	125	191	0,19	58	0
		S ₂	125	240	1,92	64	0,51
BASE	S ₁		>1000	107	NR*	41	NR*
	S ₂		>1000	28	NR*	13	NR*

* NR - Não realizado.

AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; **AFF:** extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; **AGC:** extrato do caule de *A. graveolens*; **AGF:** extrato das folhas de *A. graveolens*; **AUC:** extrato do caule de *A. urundeuva*; **AUF:** extrato das folhas de *A. urundeuva*.

O extrato das folhas de *A. urundeuva* (AUF) antes da incorporação foi o único que apresentou atividade antimicrobiana frente a *C. albicans* (CIM = 125 µg/mL). Após a solubilização, no S₁ o extrato do caule de *A. fraxinifolium* (AFC) obteve uma CIM de 62,5 µg/mL e os extratos das folhas de *A. graveolens* (AGF) e *A. urundeuva* (AUF) uma CIM de 1000 e 125 µg/mL, respectivamente, e no S₂ os extratos do caule de *A. fraxinifolium* (AFC) e

A. urundeuva (AUC) apresentou CIM de 7,81 e 500 µg/mL, respectivamente, e o extrato das folhas de *A. graveolens* (AGF) e *A. urundeuva* (AUF) apresentou CIM de 250 e 125 µg/mL.

A citotoxicidade foi avaliada para as linhagens VERO e HeLa, onde se observou que após a incorporação dos extratos nos sistemas, ocorreu uma redução nos valores de IC₅₀, havendo assim o aumento na toxicidade. Mas, como citado anteriormente os valores obtidos de IC₅₀ para esses extratos são maiores que 20, não sendo considerados tóxicos frente a essas linhagens celulares (AHMED et al., 2014).

O extrato do caule de *A. fraxinifolium* (AFC) quando incorporado no sistema 2 foi seletivo para linhagem VERO e HeLa com IS igual a 105,51 e 48,78, respectivamente. Diante desses resultados pode-se afirmar que a seletividade desse produto natural foi potencializada em 139 e 90 vezes para linhagens celulares VERO e HeLa, respectivamente, quando solubilizado no S₂.

Tabela 16. Determinação do IC₅₀ e IS do extrato das folhas de *A. urundeuva* (AUF) incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados.

Extrato		Parâmetros										
		MRC5										
		<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		<i>S. setubal</i>		<i>H. pylori</i>		<i>C. albicans</i>	
		IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS	CIM (µg/mL)	IS	CIM (µg/mL)	IS	CIM (µg/mL)	IS	CIM (µg/mL)	IS
AUF não incorporado		375	>1000	<0,37	125	3	>1000	<0,37	>1000	<0,37	125	3
AUF incorporado	S ₁	25	>1000	<0,02	125	0,2	>1000	<0,02	500	0,05	125	0,2
	S ₂	400	>1000	<0,40	1,95	205	>1000	<0,4	>1000	<0,4	125	3,2
BASE	S ₁	25	>1000	NR*	>1000	NR*	>1000	NR*	>1000	NR*	>1000	NR*
	S ₂	375	>1000	NR*	>1000	NR*	>1000	NR*	>1000	NR*	>1000	NR*

* NR - Não realizado.

AUF: extrato das folhas de *A. urundeuva*.

A citotoxicidade quando avaliada para a linhagem MRC5, verificou-se que após a solubilização do extrato no sistema 1, ocorreu uma diminuição do valor de IC₅₀, havendo assim o aumento na toxicidade.

O extrato das folhas de *A. urundeuva* (AUF) quando incorporados no S₂ foi seletivo para linhagem MRC5 apresentando um IS de 205, tendo a toxicidade reduzida em 68 vezes frente ao *S. aureus*.

5.7 Determinação da atividade antiangiogênica

5.7.1 Ensaio de inibição da ligação de PlGF e VEGF ao receptor Flt-1

Um ensaio baseado em ELISA foi desenvolvido para identificar substâncias capazes de inibir a interação do PlGF e VEGF-A com o receptor Flt-1 imobilizado (DE FALCO et al., 2001). Uma consideração importante para uma triagem é a quantidade de amostra consumida no ensaio. A ligação do VEGF-A e PlGF foi avaliada na presença de 500 mg/L de cada um dos extratos de *Astronium* sp. Os resultados foram expressos em % de ligação em relação ao controle positivo, que consiste na ligação do fator de crescimento na ausência dos extratos de *Astronium* sp (Tabela 17). O peptídeo 4-23-23 um inibidor de VEGF/Flt-1 foi utilizado como controle negativo na concentração de 30 mg/L. Os dados apresentados na Tabela 17 mostram que os extratos de *Astronium* sp não inibiram a ligação de PlGF e VEGF-A ao receptor Flt-1.

Tabela 17. Resumo da % de ligação a 500 mg/mL dos extratos de *Astronium* sp.

Extrato	hPlGF	hVEGF
AFC	88(12)	92(8)
AFF	87(13)	92(8)
AGC	50(50)	45(55)
AGF	52(48)	45(55)
AUC	93(7)	97(3)
AUF	97(3)	94(6)

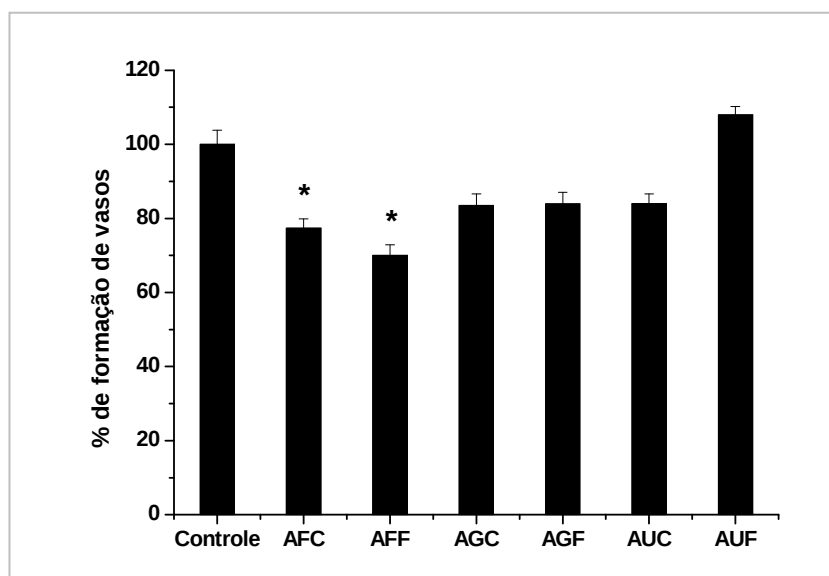
AFC: extrato do caule de *A. fraxinifolium*; **AFF:** extrato das folhas de *A. fraxinifolium*; **AGC:** extrato do caule de *A. graveolens*; **AGF:** extrato das folhas de *A. graveolens*; **AUC:** extrato do caule de *A. urundeuva*; **AUF:** extrato das folhas de *A. urundeuva*.

5.7.2 Ensaio de angiogênese no modelo experimental Zebrafish

A angiogênese e a metástase tumoral são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem a proliferação celular, levando à formação de novos vasos a partir de vasos pré-existent (STOCKMANN et al., 2014). A fim de avaliar a atividade dos extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp na formação de vasos sanguíneos foi utilizado o ensaio de Zebrafish.

Os extratos de *Astronium* sp apresentaram potencial antiangiogênico na dose de 25 µg/mL (Figura 37). O extrato que apresentou a maior atividade antiangiogênica foi o extrato da folha de *A. fraxinifolium* com inibição de 30% na formação dos vasos. O extrato do caule dessa mesma espécie apresentou inibição de 22,6 %. Em contrapartida, o extrato das folhas de *A. urundeuva* apresentou atividade pro-angiogênica, ou seja, estimulando a formação dos vasos. O tratamento com 0,2% DMSO não teve efeito sobre a formação de vasos e foi utilizado como controle de veículo.

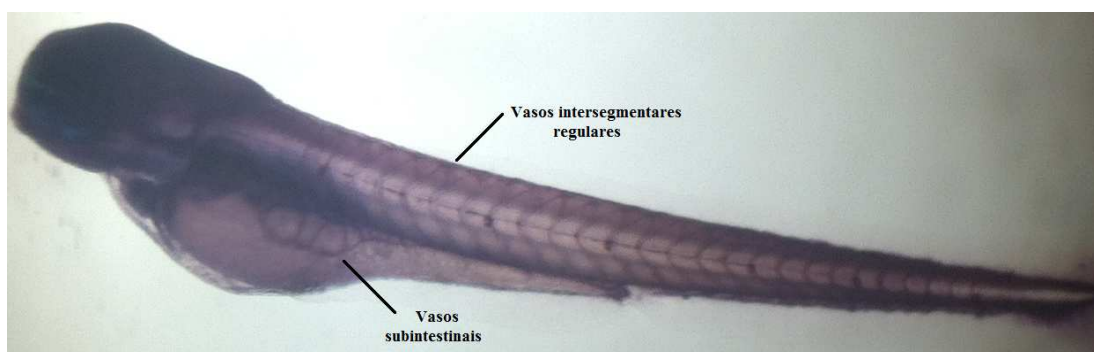
Figura 37. Efeito dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp sobre a angiogênese embrionária, no ensaio de Zebrafish.



* difere do controle pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

A Figura 38, mostrou a presença de vasos subintestinais na superfície do saco vitelino do embrião dorsolateral na forma de uma cesta que se estende a partir da borda ventral da protovértebra através do saco vitelino, e a formação de vasos intersegmentares regulares. Os embriões expostos ao extrato de *Astronium fraxinifolium* a 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma inibição visível tanto na formação dos vasos subintestinais e quanto dos vasos intersegmentares regulares, confirmando seus efeitos antiangiogênicos. A inibição da formação dos vasos está associado também com o aparecimento do edema de pericárdio nos embriões de peixe-zebra tratados com extrato de *A. fraxinifolium*.

Figura 38. Vista lateral do embrião de Zebrafish corado com EAP.



5.8 Determinação da atividade cicatrizante gástrica

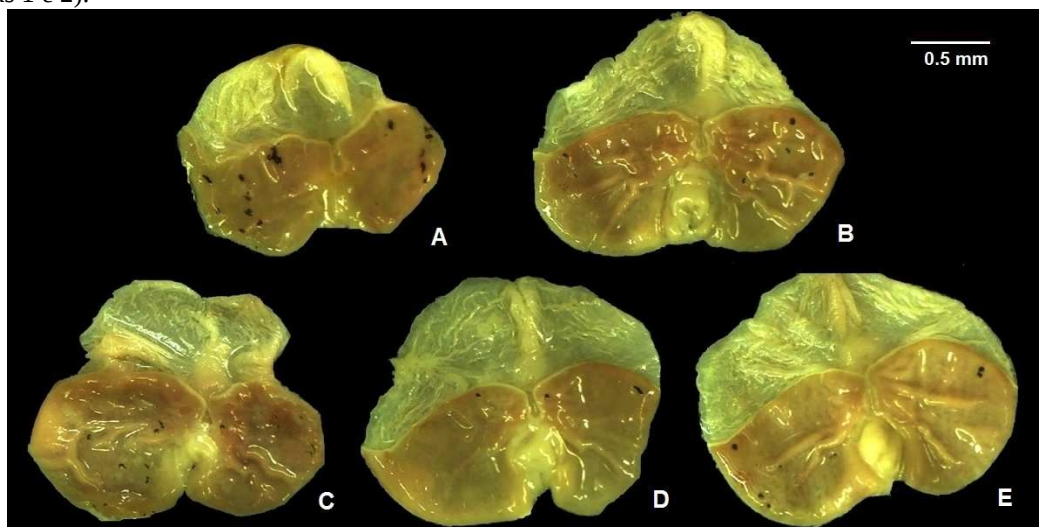
O extrato das folhas de *A. urundeuva* não incorporado reduziu em 60,10% a área da lesão, enquanto que o extrato incorporado no sistema 1 reduziu 79,70% e o incorporado no sistema 2 reduziu 78,80% à área da lesão (Tabela 18). No modelo utilizado, os extratos incorporados apresentaram valores significativos em comparação com o grupo controle reduzindo em aproximadamente 80% a área total da lesão ulcerativa. No grupo administrado somente indometacina (40 mg/kg) a área ulcerada foi de $21,0 \pm 4,1 \text{ mm}^2$ e quando tratados com a tríade a área ulcerada reduziu para $6,5 \pm 0,6 \text{ mm}^2$. Os tratamentos com extratos de *A. urundeuva* não incorporado (100 mg/kg) e incorporado nos sistemas 1 e 2 nas mesmas concentrações reduziram $5,4 \pm 0,5$; $4,5 \pm 1,0$ e $4,6 \pm 1,4 \text{ mm}^2$, respectivamente. Porém não houve diferença significativa entre os sistemas nanoestruturados. A Figura 38 ilustra a comparação da mucosa gástrica após tratamento com a indometacina (controle negativo), controle positivo (tríade - amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg) e tratamentos (*A. urundeuva* não incorporado, *A. urundeuva* incorporado nos sistemas 1 e 2). A presença de lesões gástricas de dimensões maiores pode ser visualizada no estômago do grupo não tratado, entretanto nos grupos tratados verifica-se poucas e pequenas lesões gástricas em pontos isolados.

Tabela 18. Análise do efeito do extrato de *A. urundeuva* incorporados ou não nos sistemas nanoestruturados S₁ e S₂ em úlcera gástrica induzida por indometacina (40 mg/kg).

Grupo	Dose	Área da úlcera (mm ²)	Inibição da ulceração (%)
Controle (indometacina)	40 mg/kg	21,0±2,6	-
Controle (tríade)	20 mg/kg	6,5 ^A ±0,6*	52,40
Extrato não incorporado	100 mg/kg	5,4 ^A ±0,5*	60,10
Extrato incorporado S₁	100 mg/kg	4,5 ^A ±1,0*	79,70
Extrato incorporado S₂	100 mg/kg	4,6 ^A ±1,4*	78,80

*Letras iguais na mesma coluna significam que, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao nível de significância de 5% no teste de Tukey e seguidas com * na linha diferem dos controles pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Figura 39. Comparação da mucosa gástrica após tratamento entre: controle negativo (A, solução salina), controle positivo (B, amoxicilina 50 mg/kg + claritromicina 25 mg/kg + esomeprazol 20 mg/kg), tratamentos (C, *A. urundeuva* não incorporado 100mg/Kg e D e E, respectivamente *A. urundeuva* 100mg/Kg incorporado nos sistemas 1 e 2).



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

No grupo administrado somente indometacina sem a inoculação *H. pylori*, a área ulcerada foi de $21,0 \pm 4,1 \text{ mm}^2$. A inoculação do *H. pylori* nos animais com úlceras induzida por indometacina aumentou significativamente a área ulcerada para $58,2 \pm 1,6 \text{ mm}^2$ ($p < 0,05$). Os tratamentos com extratos das folhas de *A. urundeuva* não incorporado (100 mg/kg) e incorporado nos sistemas 1 e 2 nas mesmas concentrações reduziram $25,3 \pm 0,8$; $17,5 \pm 1,2$ e $13,8 \pm 1,1 \text{ mm}^2$, respectivamente (Tabela 19).

Todos os tratamentos administrados aos animais ulcerados apresentaram urease positiva, exceto o controle com a tríade. Sendo assim, os extratos das folhas de *A. urundeuva* não foram capazes de eliminar a bactéria *H. pylori*.

Tabela 19. Efeito do extrato das folhas de *Astronium urundeuva* incorporados ou não em sistemas nanoestruturados sobre a produção de urease por *Helicobacter pylori* e atividade cicatrizante.

Grupo	Área da úlcera (mm ²)*	Inibição da ulceração (%)	Urease
Controle (indometacina)	21,0±2,6	-	Positiva
Controle (indometacina + <i>H. pylori</i>)	58,2 ± 1,6	-	Positiva
Controle (triade)	27,2±0,7	55,20	Negativa
Extrato não incorporado	25,3 ^A ±0,8*	58,80	Positiva
Extrato incorporado S ₁	17,5 ^B ±1,2*	75,50	Positiva
Extrato incorporado S ₂	13,8 ^C ±1,1*	70,70	Positiva

*Letras iguais na mesma coluna significam que, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao nível de significância de 5% no teste de Tukey e seguidas com * na linha diferem dos controles pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

As plantas são produtoras de metabólitos secundários, substâncias químicas que podem ser úteis no tratamento de uma grande diversidade de doenças humanas. Estes compostos possuem várias funções no desenvolvimento fisiológico das plantas e também atuam como mediadores de interações entre elas e outros organismos (MATEUS et al., 2014). Uma das funções dos metabólitos secundários é fornecer proteção contra o ataque de organismos patogênicos. Sendo assim, as plantas medicinais e aromáticas possuem uma variedade de componentes, tais como alcalóides, ácidos graxos e compostos fenólicos, que possuem propriedades biológicas.

Os compostos fenólicos têm sido alvo de várias pesquisas em relação aos seus efeitos biológicos, bem como de seus potenciais efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversos problemas de saúde (MAZID et al., 2011).

A análise fitoquímica dos extratos do caule e das folhas de *Astronium* sp revelou a presença de fenóis e flavonoides. Os flavonoides e taninos condensados e hidrolisáveis são os principais constituintes químicos do gênero *Astronium*, cuja função na planta é agir como antifúngico além de apresentar características como adstringência e precipitação de proteínas (SILVA et al., 2012a).

É bem provável que os mecanismos de ação dos taninos no organismo estejam relacionados com a complexação de íons metálicos como o alumínio, cálcio, cobre, ferro, manganês, entre outros, à atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a habilidade de se complexar com macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos (PEREIRA e CARDOSO, 2012; MELONE et al., 2013).

Muitos dos efeitos farmacológicos dos compostos fenólicos são atribuídos a sua atividade antioxidante, na qual resulta da sua capacidade para capturar espécies oxidantes não radicalares como HOCl e os radicais DPPH e taurina cloramina. As espécies de *Astronium* sp foram mais efetivas na captura de HOCl do que de taurina cloramina, resultado este muito significativo devido ao fato de que o HOCl é um agente oxidante extremamente forte gerado nos neutrófilos pela reação de oxidação de íons cloreto (Cl^-) com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisado pela enzima mieloperoxidase (MPO) (MIYAMOTO et al., 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2010). As diferenças nos valores de IC_{50} entre as espécies de *Astronium* sp pode estar relacionada a natureza química e a estrutura dos compostos fenólicos presentes nos extratos. Além disso, um sinergismo entre as substâncias presentes no extrato

da planta pode também estar envolvido nas diferentes ações desses extratos, pois estes são formados por misturas complexas de muitos compostos diferentes com atividades distintas e, portanto estes constituintes podem influenciar significativamente nas diferenças da atividade antioxidante das espécies (ŠKROVÁNKOVÁ et al., 2012).

Nos ensaios realizados neste trabalho, os extratos com maiores teores fenólicos apresentaram maior potencial antioxidante, essa atividade é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização das espécies reativas de oxigênio.

A significativa ação antioxidante dos extratos de *Astronium* sp pode estar correlacionada à presença de taninos (HOSU et al., 2014; FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2015), e flavonoides (EMBUSCADO, 2015), demonstrando que os extratos desse gênero contém componentes antioxidantes que podem sequestrar ou inibir os radicais livres em condições *in vitro*, sugerindo a possibilidade de diferentes mecanismos responsáveis pela potencialidade.

Em pesquisa realizada por Jandú et al. (2013) os extratos metanólicos do caule de *A. urundeuva* apresentaram uma excelente atividade antioxidante. Algumas espécies da mesma família também apresentaram potencial antioxidante comprovado como *Anarcadium occidentale* (TAN e CHAN, 2014; AJILEYE et al., 2015), *Mangifera indica* L. (SULTANA et al., 2012), *Spondias purpurea* L. (SILVA et al., 2012b), *Schinus terebinthifolius* Raddi (BENDAOUD et al., 2010) corroborando os resultados obtidos neste trabalho, sugerindo prováveis atividades relacionadas à família.

Uma das propriedades que determina a capacidade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp é a presença de flavonoides, sendo que este, entretanto, não é o único fator para tal atividade. O mecanismo de ação deste extrato pode ser influenciado pela presença de vários componentes ativos, que podem ou não apresentar atividades físico-químicas que aumentam ou reduzam a atividade antimicrobiana.

Os extratos avaliados nesta pesquisa apresentaram diferentes comportamentos contra bactérias de naturezas diferentes (diferenças morfotintoriais), o que indica que o mecanismo de ação pode ser dependente da estrutura organizacional do micro-organismo, o que limitaria o acesso ao sítio de ação das moléculas presentes nos diferentes extratos.

A atividade antimicrobiana pode ser prejudicada por diversos fatores que podem influenciar no conteúdo de compostos fenólicos presentes em um extrato como o método de extração escolhido, tamanho das partículas, as condições de armazenamento, a estrutura

química e a presença de substâncias interferentes, como gorduras, terpenos e clorofilas. Sendo assim, dificilmente há um procedimento de extração apropriado para todos os compostos fenólicos. Os extratos fenólicos de extratos vegetais são constituídos de uma mistura de diversos compostos solúveis no sistema solvente utilizado (CHEYNIER et al., 2013).

Bonifácio et al. (2015) relatam que foram realizados ensaios preliminares e que estes mostraram que uma solução hidroetanólica a 70% pode extrair a maioria dos compostos do *Astronium* sp, porém alguns dos compostos apresentam dificuldade de solubilização e geralmente podem precipitar ao longo do tempo.

A fim de aumentar a solubilidade, seletividade e eficácia dos princípios ativos, como, também, potencializar a ação biológica dos extratos vegetais, minimizando os efeitos colaterais tóxicos, e permitir o controle de liberação (GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009), os extratos hidroetanólicos do caule e das folhas de *Astronium* sp foram incorporados nos sistemas nanoestruturados como as microemulsões.

Os sistemas nanoestruturados apresentam capacidade de compartimentalizar o extrato vegetal nas gotículas da fase interna, que apresentam propriedades físico-químicas bastante diferentes das do meio dispersante, induzindo modificações nas propriedades biológicas dos extratos incorporados, permitindo a liberação controlada em várias vias de administração, tais como oral, nasal, parenteral, entre outras (GRAMPUROHIT et al., 2011).

A incorporação dos extratos de *Astronium* sp nos sistemas lipídicos nanoestruturados reduziram os valores do CIM. Tal fato pode estar associado à presença dos tensoativos na composição dos sistemas, que interagem com as moléculas presentes na membrana citoplasmática das bactérias aumentando a sua permeabilidade, facilitando o fluxo de cátions, ânions e água, e consequentemente provocando edema e lise celular. O aumento da capacidade antifúngica após a incorporação pode ser atribuída à presença de colesterol na composição dos sistemas, que pode ter interagido com o ergosterol presente na membrana da célula fúngica, liberando o ativo diretamente no alvo específico.

Um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais em comparação aos antibióticos padrões ainda não foi estabelecido, sendo assim muitos autores consideram níveis de atividade aceitável os semelhantes aos de antimicrobianos padrões. Saraiva et al. (2011) caracterizam que os extratos vegetais com valores de CIM menores que 100 µg/mL, são considerados agentes antimicrobianos altamente ativos, aqueles com CIM de 100 a 500 µg/mL são definidos como ativos, extratos com CIM de 500 a 1000 µg/mL são moderadamente ativos e com CIM >1000 µg/mL não apresentam atividade antimicrobiana.

Desta forma, considerando os resultados obtidos pode-se considerar que o extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporado no sistema 2 (CIM = 1,95 µg/mL) e o extrato das folhas de *A. graveolens* incorporado no sistema 2 (CIM = 7,81 µg/mL) inibiu fortemente o crescimento da bactéria *S. aureus*. O mesmo comportamento foi observado no extrato do caule de *A. fraxinifolium* incorporado nos sistemas 1 (CIM = 62,5 µg/mL) e 2 (CIM = 7,81 µg/mL) que promoveu uma forte ação antimicrobiana frente a *C. albicans*, sendo classificados como altamente ativos. Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por Gehrke et al. (2013) que estudaram a ação antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *Schinus lentiscifolius*, planta pertencente à família Anacardiaceae e obtiveram um excelente potencial antifúngico frente a *C. albicans* com CIM de 25 µg/mL.

Ahmed et al. (2014) determinaram a CIM do extrato das folhas de *Searsia pendulina* (Anacardiaceae) frente a *S. aureus* e *C. albicans*, obtendo valores superiores aos apresentados no presente trabalho - 312 e 625 µg/mL, respectivamente.

Bonifácio et al. (2015) avaliou a atividade anti-*C. albicans* do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* não incorporado e obteve um CIM de 125 µg/mL e ao solubilizá-lo na microemulsão lipídica, o CIM reduziu para 15,62 µg/mL, ou seja, a incorporação do extrato das folhas de *A. urundeuva* potencializou em 8 vezes a ação antimicrobiana.

A ausência de atividade antimicrobiana exercida pelos extratos de *Astronium* sp frente à *S. setubal* (CIM >1000µg/mL) pode indicar um possível padrão não seletivo das plantas pertencentes à família Anacardiaceae frente a bactérias de caráter Gram negativo, visto que a ausência de potencial antibacteriano também foi observada quando os extratos foram empregados contra *E. coli*. Entretanto, a incorporação potencializou discretamente a atividade antibacteriana para uma única espécie no caso o *A. graveolens*. Simonatto et al. (2010) também observaram este comportamento ao analisarem o potencial antibacteriano do óleo essencial das folhas de *Mangifera indica* Var. *coquinho*, planta também pertencente à família Anacardiaceae. Os autores não evidenciaram o potencial biológico proposto, quando obtiveram resultados de inibição (CIM) maiores que 20 mg/mL, o qual foi considerado como pouco promissor no emprego como possível agente antimicrobiano.

As bactérias Gram-negativas demonstraram percentual de resistência aos extratos de *Astronium* sp bem mais elevado quando comparadas às Gram-positivas, indicando assim que os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp apresentam ação antibacteriana seletiva quanto à estrutura bioquímica da parede celular bacteriana, podendo estar relacionado com o fato de que as bactérias Gram-positivas possuem parede celular quimicamente menos complexa, com

menor teor de lipídios devido à ausência de uma membrana externa quando comparadas com as bactérias Gram-negativas, dificultando e impedindo o acesso a célula bacteriana.

Em relação à atividade antifúngica relacionada aos extratos das folhas e do caule de *Astronium* sp, foi observado um excelente potencial antifúngico exercido pelo extrato do caule de *A. fraxinifolium* e das folhas de *A. urundeuva*. Estes mesmos extratos estão entre os que apresentaram a maior concentração de flavonoides. Assim, essa atividade bem sucedida pode ser justificada pela quantidade de flavonoides na constituição dessa espécie, visto que muitos estudos atribuem o potencial antimicrobiano exercido por produtos naturais à presença destes componentes (CHOI et al., 2006; ARAÚJO et al., 2012).

A presença de compostos fenólicos nas plantas medicinais pode constituir um modelo promissor para se avaliar mecanismos envolvidos na atividade antifúngica, visto às suas propriedades lipofílicas que determinam a capacidade de penetrar na membrana plasmática da levedura e induzir mudanças nas propriedades físico-químicas da parede, membrana e/ou organelas celulares (ARAÚJO et al., 2012).

O efeito bacteriostático dos sistemas nanoestruturados depende principalmente do seu tamanho nanométrico, ou seja, o tamanho da partícula do sistema microemulsionado desenvolvido está diretamente relacionado com a sua capacidade de penetrar na membrana bacteriana, causando danos. Além disso, o diâmetro das partículas desempenha um papel fundamental na difusão dos sistemas nanoestruturados na mucosa gástrica, local onde se encontra o *H. pylori*; sabe-se que partículas maiores que 200 nm apresentam uma diminuição da difusão (LOPES et al., 2014).

A incorporação dos extratos nos sistemas 1 e 2 promoveu um discreto aumento no diâmetro das gotículas (123,28 nm a 146,57 nm), entretanto elas mantiveram sua isotropia e homogeneidade com um pequeno índice de polidispersidade (IPD). Os extratos incorporados nas microemulsões apresentaram um tamanho médio de partícula inferior a 150 nm. Saini et al. (2014) considera que um sistema disperso para ser considerado uma microemulsão é necessário que o tamanho de suas gotículas da fase interna esteja entre 10 e 200 nm. Desse modo, as microemulsões desenvolvidas neste trabalho apresentaram as propriedades desejadas em relação ao diâmetro das gotículas e o IDP.

Um dos fatores que se deve levar em consideração é a baixa biodisponibilidade, que é ocasionada muitas vezes pela baixa solubilidade dos compostos presentes no extrato quando administrados por via oral. Este fato pode ser atribuído a dois fatores, a sua possível degradação no aparelho digestivo e a baixa permeabilidade do composto nas paredes do

aparelho digestivo ou biotransformação intestinal (DURÁN et al., 2010). Assim, para impedir que tais problemas ocorram e a fim de melhorar a ação, o extrato das folhas de *A. urundeuva* foi incorporado nos sistemas nanoestruturados e administrados aos ratos Wistar com o objetivo de verificar a atividade cicatrizante e anti-*H. pylori*.

O extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* apresentou capacidade de melhoria no processo de cicatrização das úlceras provocadas pela indometacina. A incorporação dos extratos potencializou a ação cicatrizante, obtendo resultados estatisticamente significativos. Essa ação pode ser explicada pela atividade dos constituintes presentes nesta espécie como flavonoides, bem como as chalconas favorecendo o aumento da quantidade de prostaglandinas, causando a diminuição da secreção de histamina e a inibição da bomba de prótons; e aos taninos que aumentam a resistência a agente necrosantes e agem protegendo a mucosa gástrica, ou ainda pelo potencial antioxidante dessa espécie por apresentar substâncias reguladoras da produção de radicais livres (JESUS et al., 2012).

Além disso, a atividade cicatrizante pode estar relacionada com as propriedades mucoadesivas das microemulsões. Uma vez que a incorporação do extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* nos sistemas estudados não alterou a força mucoadesiva. Os valores obtidos de mucoadesividade foram semelhantes a outras formulações mucoadesivas conhecidas no mercado como o Carbomer homopolymer (Carbopol[®] C974P) e o Polycarbophil (Noveon[®] AA-1) que na concentração de 0,5% apresentam força mucoadesiva de 0,04 N (CALIXTO et al., 2014).

A cicatrização é considerada um fator essencial na resposta protetora da lesão através da reparação tecidual, sendo um processo dinâmico e complexo que envolve uma série de acontecimentos coordenados, incluindo a inflamação aguda, a migração celular, a proliferação, diferenciação, angiogênese, entre outros (MAXSON et al., 2012). Estudos têm relatado evidências da ação das espécies reativas nos distúrbios microvasculares, danos teciduais e processos inflamatórios que antecedem à cicatrização tecidual, portanto a atividade antioxidante do extrato das folhas de *A. urundeuva* pode estar relacionada com o processo de cicatrização (CUZZOCREA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009).

Alguns estudos foram realizados com essa espécie com o objetivo de buscar alternativas para os distúrbios gastrointestinais (VIANA et al., 2003; SOUZA et al., 2007; CARLINI et al., 2010), e todos eles afirmam que a atividade antiúlcera e cicatrizante de *A. urundeuva* está diretamente ligada à presença dos compostos fenólicos, resultados estes que corroboram os obtidos no presente trabalho, uma vez que o extrato das folhas de *A. urundeuva* escolhido para

realizar o experimento *in vivo* de atividade cicatrizante foi também o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos.

No estudo realizado por Souza et al. (2007) a atividade antiúlcera e cicatrizante da fração enriquecida de taninos isolada do caule de *A. urundeuva* foi avaliada em modelo experimental em ratos com úlcera induzida por indometacina, demonstrando que a fração reduziu 56,9 % as ulcerações gástricas na concentração de 50 mg/kg por via oral, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho. Evidenciando assim, que a atividade antiúlcera e cicatrizante pode ser atribuída aos taninos.

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos e é essencial no processo de cicatrização de feridas. Os extratos de *Astronium* sp foram capazes de inibir a formação dos vasos, exceto o extrato das folhas de *A. urundeuva* que apresentou efeito pró-angiogênico, ou seja, promoveu a estimulação da formação de novos vasos. Essa estimulação no processo de angiogênese está diretamente ligada ao processo de cicatrização, uma vez que a angiogênese é uma etapa fundamental no processo de cura das úlceras gástricas. As prostaglandinas promovem a cicatrização das úlceras gastrointestinais, aumentando a angiogênese através da estimulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e este por sua vez promove a cicatrização da úlcera, através da estimulação da formação de novos vasos, e em contrapartida com a indometacina, um AINE, que interfere neste processo através de uma regulação negativa da sua expressão (TARNAWSKI e JONES, 2003; TAKEUCHI et al., 2010).

Recente pesquisa indica que o extrato metanólico da espécie *A. graveolens* apresenta componentes capazes de inibir a ligação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), um importante mediador da angiogênese, com seu receptor o VEGFR-1 (HERNÁNDEZ et al., 2014). Neste sentido, o presente estudo agrega evidências aos dados da literatura que demonstraram efeito antiangiogênico de *Astronium* sp.

A administração oral do extrato das folhas de *A. urundeuva* não incorporados e incorporados nos sistemas 1 e 2 para ratos, ulcerados por indometacina e inoculados com *H. pylori*, aumentou a cicatrização das lesões ulceradas, de forma mais intensa do que o tratamento com drogas convencionais. Entretanto, o extrato das folhas de *A. urundeuva* não apresentou a capacidade de eliminar a bactéria *H. pylori*, provavelmente pelo fato do extrato apresentar efeito bacteriostático, promovendo a interrupção do crescimento e reprodução da bactéria *H. pylori*. O resultado obtido no ensaio de anti-*H. pylori* *in vitro* reforça a hipótese de que o extrato das folhas de *A. urundeuva* apresenta efeito bacteriostático.

A incorporação de substâncias em sistemas nanoestruturados é uma alternativa para aumentar a seletividade desse composto às células neoplásicas e reduzir a sua citotoxicidade nas células sadias (REJINOLD et al., 2011). Os extratos de *Astronium* sp não incorporados não apresentaram citotoxicidade, porém observou-se que após a solubilização dos extratos nos sistemas nanoestruturados 1 e 2, os valores de IC₅₀ foram menores em relação aos extratos não incorporados para ambas as linhagens, ou seja, houve um aumento da toxicidade.

Os extratos de *Astronium* sp não incorporados e incorporados nos sistemas nanoestruturados S₁ e S₂ não foram tóxicos quando comparados com o estudo realizado por Suleiman et al. (2013) que utilizou o alcaloide berberina como controle positivo de citotoxicidade e este exibiu um IC₅₀ de 6,36 µg/mL frente a linhagem celular VERO.

O extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporado no sistema 2 apresentou a maior atividade antimicrobiana (CIM = 1,95 µg/mL - *S. aureus*), sendo seletivo para células normais e tumorais. Demonstrando ser mais ativo contra *S. aureus* e menos citotóxico para linhagem normal em relação ao extrato não incorporado, em até 29 vezes. O extrato do caule *A. fraxinifolium* incorporado no sistema 2 (IS = 105,51) foi altamente seletivo para a linhagem VERO, apresentando-se aproximadamente 139 vezes mais seletivo em relação ao extrato não incorporado (IS<0,76) para *C. albicans*. Diante do exposto, observou-se que os extratos de *Astronium* sp não incorporados e incorporados nos sistemas estudados não apresentaram toxicidade celular para as linhagens estudadas.

7. CONCLUSÃO

A análise fitoquímica dos extratos do caule e das folhas de *Astronium* sp revelou a presença de fenóis e flavonoides. A maior quantidade de fenóis e flavonoides foram encontradas no extrato das folhas e do caule de *A. urundeuva*. Os extratos apresentaram potencial antioxidante, mostrando-se efetivos sequestradores de DPPH, HOCl e taurina cloramina. Os extratos do caule de *A. graveolens* e das folhas *A. urundeuva* foram os mais eficientes.

A incorporação dos extratos de *Astronium* sp nos sistemas nanoestruturados potencializaram a atividade antimicrobiana. O extrato da folha de *A. urundeuva* quando incorporado no sistema 2 mostrou ser o melhor inibidor frente a *S. aureus* e o extrato do caule de *A. fraxinifolium* incorporado no sistema 2 apresentou melhor potencial antifúngico frente à *C. albicans*. O extrato das folhas de *A. graveolens* quando incorporado no sistema 1 e 2 apresentou atividade contra *E. coli*. A incorporação dos extratos de *Astronium* sp não potencializou a atividade antibacteriana contra *S. setubal*.

Em relação à atividade citotóxica os extratos de *Astronium* sp não incorporados e incorporados nos sistemas estudados não foram citotóxicos frente às linhagens celulares testadas. O extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporado no sistema 2 demonstrou ser o mais seletivo para *S. aureus*.

A melhor ação na angiogênese embrionária, no ensaio de *Zebrafish* foi demonstrada pelo extrato do caule de *A. fraxinifolium*. E os extratos do caule e das folhas de *A. graveolens* mostraram uma boa atividade na inibição de VEGF-A/Flt-1.

O extrato de *A. urundeuva* apresentou um excelente potencial na cicatrização das úlceras gástricas, entretanto, estes não foram capazes de erradicar a bactéria *H. pylori*.

Desta forma, o uso da nanotecnologia promoveu um aumento da atividade antimicrobiana e cicatrizante. Estes dados são promissores e incentivam mais pesquisas sobre aspectos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos desta espécie, a fim de apoiar a sua possível utilização racional na aplicação da terapia antimicrobiana, particularmente, na terapia anti-*H. pylori*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 março 2004. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf>. Acesso em: 23 set. 2013.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 113-123, 2001.

AHMED, H. A. M.; RAJENDRAN, R.; BALAKUMAR, C. Nanoherbal coating of cotton fabric to enhance antimicrobial durability. **Applied Chemistry**, v. 45, p. 7840-7843, 2012.

AHMED, F. Natural products: social impact and future requirements. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 4, n. 1, p. 1-2, 2013.

AHMED, A. S.; MCGAW, L. J.; MOODLEY, N.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, antilipoxygenase activities and phenolic composition of *Ozoroa* and *Searsia* species (Anacardiaceae) used in South African traditional medicine for treating diarrhea. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 9-18, 2014.

AJILEYE, O. O.; OBUOTOR, E. M.; AKINKUNMI, E.O.; ADEROGBA, M. A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, p. 244-252, 2015.

ALVES, P. M., QUEIRÓZ, L. M. G., PEREIRA, J. V., PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente, antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microorganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Cândida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ARAKAWA, T., WATANABE, T.; TANIGAWA, T.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; MORIMOTO, K. Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: its pathophysiology and clinical relevance. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, p. 4811-4822, 2012.

ARAÚJO, M. G. F.; HILÁRIO, F.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C., BRUNETTI, I. L.; SOTOMAYOR, C. H.; BAUAB, T. M. Correlation among antioxidant, antimicrobial, aemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 9260-9277, 2012.

ARAÚJO, D.; SEBBENN, A. M.; ZANATTO, A. C. S.; ZANATA, M.; MORAIS, E.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M. Variação genética para caracteres silviculturais em progênies de polinização aberta de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae). **Cerne**, v. 20, n. 1, p. 61-67, 2014.

ASSIS, R. P.; CASTRO, J. F. A.; GUTIERRES, V. O.; ARCARO, C. A.; BROTTTO, R. S.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species *in vitro* model systems as a possibility of support the renal function management. **BMC Nephrology**, v. 16, n. 50, p. 1-13, 2015.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27-36, 2005.

AUERBACH, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis assays: a critical overview. **Clinical Chemistry**, v. 49, p. 32-40, 2003.

AZUERO EARTH PROJECT. *Astronium graveolens*. Disponível em: < <https://azueroearthproject.org/trees/astronium-graveolens/>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

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.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 467-472, 2010.

BHADORIYA, S. S.; MANGAL, A.; MADORIYA, N.; DIXIT, P. Bioavailability and bioactivity enhancement of herbal drugs by “Nanotechnology”: a review. **Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2011.

BI, W. P.; MAN, H. B.; MAN, M. Q. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: a review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 45, p. 17020-17028, 2014.

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.

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines - a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

BONIFÁCIO, B. V.; RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; NEGRI, K. M. S.; LOPES, E. O.; SOUZA, L. P.; VILEGAS, W.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanostructured lipid system as a strategy to improve the anti-*Candida albicans* activity of *Astronium* sp. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p. 5081-5092, 2015.

BRAZ, D. C.; OLIVEIRA, L. R. S.; VIANA, A. F. S. C. Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso da *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n.1, p. 86-90, 2013.

CALDEIRA-JÚNIOR, C. F.; SOUZA, R. A.; MARTINS, E. R.; SAMPAIO, R. A. Capacidade de recuperação de área degradada pelo gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium* schott) sob adubação com lodo de esgoto e silicato. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 480-482, 2007.

CALIXTO, G.; YOSHII, A. C.; ROCHA e SILVA, H.; CURY, B. S. F.; CHORILLI M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development Technology**, v. 20, n. 4, p. 490-496, 2014.

CALOU, I.; BANDEIRA, M. A.; AGUIAR-GALVÃO, W.; CERQUEIRA, G.; SIQUEIRA, R.; NEVES, K. R.; BRITO, G.A.; VIANA, G. Neuroprotective properties of a standardized extract from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira-do-sertão), as evaluated by a Parkinson's disease model in rats. **Parkinson's Disease**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, A. C. B.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503-506, 2014.

CHAHADE, W. H.; GIORGI, R. D. N.; SZAJUBOK, J. C. M. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. S166-S74, 2008.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013.

CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of própolis from several regions of Korea. **LWT**, v. 39, p. 756-761, 2006.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

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

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards-6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006b.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA., 2008.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287-1300, 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*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUZZOCREA, S.; THIEMERMANN, C.; SALVEMINI, D. Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n. 9, p. 1147-1162, 2004.

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 Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v, 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DANDEKAR, P. P.; JAIN, R.; PATIL, S.; DHUMAL, R.; TIWARI, D.; SHARMA, S.; VANAGE, G.; PATRAVALE, V. Curcumin-loaded hydrogel nanoparticles: application in anti-malarial therapy and toxicological evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4992-5010, 2010.

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.

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

DE FALCO, S.; RUVOLETTA, M. G.; VERDOLIVA, A.; RUVO, M.; RAUCCI, A.; MARINO, M.; SENATORE, S.; CASSANI, G.; ALBERTI, A.; PONTISSO, P.; FASSINA, G. Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36613-36623, 2001.

- DEY, Y. N.; OTA, S.; SRIKANTH, N.; JAMAL, M.; WANJARI, M. A. phytopharmacological review on an important medicinal plant - *Amorphophallus paeoniifolius*. **An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda**, v. 33, n. 1, p. 27-32, 2012.
- DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1, p. 89-94, 2009.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.
- DURÁN, N.; DURÁN, M.; TASIC, L.; MARCATO, P. D. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 151-158, 2010.
- DYPBUKT, J. M.; BISHOP, C.; BROOKS, W. M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, p. 1468-1477, 2005.
- EMBRAPA PANTANAL. **Base de Dados Plantas do Pantanal**. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/plantas/fichanc.php?topbusca=Astronium+fraxinifolium+Schott>>. Acesso em: 29 dez. 2014.
- EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants - a mini review. **Journal of Functional Foods**, In press. 2015.
- ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A.; WOUTERSEN, R.; GROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: a mini review. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, p. 545-553, 2012.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Fiocruz, 2010, v. 1, p. 236-253.
- FEITOSA, D. G.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R.; PAIANO, M. O. Crescimento de mudas de gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium*) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2011.
- FERNANDES, M. H. V.; SILVA, D. S.; CASTRO, C. C.; CORRÊA, R. A.; VARGAS, G. D.; FISHER, G.; MOTTA, A. S.; HÜBNER, S. O. Avaliação da citotoxicidade do peptídeo antimicrobiano P34. **Science and Animal Health**, v. 1, n. 1, p. 2-10, 2013.
- FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; ZAFIMAHOVA, A.; ALVARADO, P. G. M.; DUBREUCQ, E.; PONCET-LEGRAND, C. Grape seed and apple tannins: emulsifying and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 178, p. 38-44, 2015.
- FISCHER, C.; MAZZONE, M.; JONCKX B.; CARMELIET, P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 942-956, 2008.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, n. 1, p. 27-31, 1995.

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

FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; EGITO, E. S. T.; TERRUGI, C. H. B.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; OLIVEIRA, A. G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v.77, n. 1, p. 47-53, 2010.

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.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiology Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GEHRKE, I. T. S.; NETO, A. T.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C. P.; CRUZ, I. B. M.; SILVA, U. F.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 486-491, 2013.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA, R. Microemulsions for topical use - a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, n. 1, p. 100-107, 2011.

GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 2009.

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.

GULER, E.; BARLAS, F. B.; YAVUZ, M.; DEMIR, B.; GUMUS, Z. P.; BASPINAR, Y.; COSKUNOL, H.; TIMUR, S. Bio-active nanoemulsions enriched with gold nanoparticle, marigold extracts and lipoic acid: *in vitro* investigations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 299-306, 2014.

GÜRBÜZ, A. K.; KÜÇÜKKARDALI, Y.; YAZGAN, Y.; ÖZEL, M.; POLAT, T. Does eradication of *Helicobacter pylori* infection reduce hypergastrinemia during long term therapy with proton pump inhibitors? **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 3, p. 159-163, 2002.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford, 2010. 888 p.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

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

HE, Z. H.; HE, M. F.; MA, S. C.; BUT, P. P. H. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 313-317, 2009.

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

HERNÁNDEZ, V.; MALAFRONTÉ, N.; MORA, F.; PESCA, M. S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T. Antioxidant and antiangiogenic activity of *Astronium graveolens* Jacq. leaves. **Natural Product Research**, v. 28, n. 12, p. 917-922, 2014.

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

HOSU, A.; CRISTEA, V. M.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113-118, 2014.

INGLIS, P. W.; CIAMPI, A. Y.; SALOMÃO, A. N.; COSTA, T. S. A.; AZEVEDO, V. C. R. Expression of stress-related genes in zebrawood (*Astronium fraxinifolium*, Anacardiaceae) seedlings following germination in microgravity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 81-92, 2014.

JANDÚ, J. J. B.; SILVA, L. C. N.; PEREIRA, A. P. C.; SOUZA, R. M.; SILVA-JÚNIOR, C. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 8, p. 413-418, 2013.

JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. A.; LIMA, G. R. de M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BATISTA, L. M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3203-3228, 2012.

JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; LIMA, G. R. M.; CALDAS FILHO, M. R. D.; SALES, I. R. P.; GOMES, I. F.; SANTOS, S. G.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 982-988, 2013.

KARTHIK, G.; ANGAPPAN, M.; VIJAYAKUMAR, A.; NATARAJAPILLAI, S. Syringic acid exerts antiangiogenic activity by downregulation of VEGF in zebrafish embryos. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, p. 203-208, 2014.

KATO, S.; UMEDA, M.; TAKEEDA, M.; KANATSU, K.; TAKEUCHI, K. Effect of taurine on ulcerogenic response and impaired ulcer healing induced by monochloramine in rat stomachs. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 35-42. Suppl. 2

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.

KIM, S. Y.; JOO, Y. M.; LEE, H. S.; CHUNG, I.; YOO, Y.; MERRELL, D. S.; CHA, J. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional rdxA. **Journal Antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 43-50, 2009.

KIM, S. K.; JI, H. I.; CHUNG, H.; KIM, C.; LEE, S. H.; LEE, Y. A.; YANG, H. I.; YOO, M. C.; HONG, S. J. Taurine chloramine modulates the expression of adipokines through inhibition of the STAT-3 signaling pathway in differentiated human adipocytes. **Amino Acids**, v. 45, p. 1415-1422, 2013.

KLAMT, F.; SHACTER, E. Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human b lymphoma cells through mitochondrial damage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21346-21352, 2005.

KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; SUNDERAM, R. S.; GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; SARAVANAN, S.; KUMAR, M. S.; MURUGESH, K.; KUMAR, K. A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1015-1024, 2005.

KUREK, A.; NADKOWSKA, P.; PLISZKA, S.; WOLSKA, K. I. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. **Phytomedicine**, v. 19, p. 515-519, 2012.

LALL, N.; KISHORE, N. Are plants used for skin care in South Africa fully explored? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 61-84, 2014.

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO, M.; HMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial

activity in the peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 279-281, 2004.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 175-193, 2012. Suppl. S.

LEPORE, L.; MALAFRONT, N.; CONDERO, F. B.; GUALTIERI, M. J.; ABDO, S.; DAL PIAZ, F.; DE TOMMASI, N. Isolation and structural characterization of glycosides from an anti-angiogenic extract of *Monnina obtusifolia* H.B.K. **Fitoterapia**, v. 82, p. 178-183, 2011.

LIMA, Z. P.; SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C. dos.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; MORAIS, H. P. de.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 149-160, 2008.

LIMA, S. C. G.; TEIXEIRA, M. J.; LOPES JÚNIOR, J. E. G.; MORAIS, S. M.; TORRES, A. F.; BRAGA, M. A.; RODRIGUES, R. O.; SANTIAGO, G. M. P.; MARTINS, A. C.; NAGAO-DIAS, A. T. *In Vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of *Astronium fraxinifolium* (Schott) and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

LOKMAN, N. A.; ELDER, A. S. F.; RICCIARDELLI, C.; OEHLER, M. K. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 9959-9970, 2012.

LOPES, D.; NUNES, C.; MARTINS, M. C. L.; SARMENTO, B.; REIS, S. Eradication of *Helicobacter pylori*: past, present and future. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 169-186, 2014.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current state of nanoemulsions in drug delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 626-639, 2011.

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

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 3, p. 275-285, 2006.

MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 39, n. 3, p. 154-161, 2011.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 374, p. 1449-1461, 2009.

MATEUS, M. A. F.; FARIA, C. M. D. R.; BOTELHO, R. V.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERREIRA, S. G. M.; ZALUSKI, W. L. Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne incognita* (Kofoed e White, 1919) Chitwood, 1949. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 730-736, 2014.

MAXSON, S.; LOPEZ, E. A.; YOO, D.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; LEROUX, M. A. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, p. 142-149, 2012.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 232-249, 2011.

MAZZOLIN, L. P.; NASSER, A. L. M.; MORAIS, T. M.; SANTOS, R. C.; NISHIJIMA, C. M.; SANTOS, F. V.; VARANDA, E. A.; BAUAB, T. M.; ROCHA, L. R. M. da.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Qualea parviflora* Mart.: an integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 508-514, 2010.

MEHROTRA, S.; JAMWAL, R.; SHYAM, R.; MEENA, D. K.; MISHRA, K.; PATRA, R.; DE, R.; MUKHOPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, A. K.; NANDI, S. P. Anti-*Helicobacter pylori* and antioxidant properties of *Embllica officinalis* pulp extract: a potential source for therapeutic use against gastric ulcer. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2577-2583, 2011.

MELONE, F.; SALADINO, R.; LANGE, H.; CRESTINI, C. Tannin structural elucidation and quantitative ³¹P NMR analysis. 2. hydrolyzable tannins and proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9316-9324, 2013.

MENTES LÚCIDAS. **Plantas arbóreas nativas do Brasil** Disponível em: < <http://menteslucidas.wordpress.com/plantas-arboreas-nativas-do-brasil/>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

MENCHERINI, T.; PICERNO, P.; SCESA, C.; AQUINO, R. Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 1889-1884, 2007.

MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6887-6892, 2003.

MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G. R.; RETTORI, D.; AUGUSTO, O.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 103, n. 2, p. 293-298, 2006.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

- MOLEIRO, F. C.; ANDREO, M. A.; SANTOS, R. C.; MORAIS, T. M.; RODRIGUES, C. M.; CARLI, C. B. A.; LOPES, F. C. M.; PELLIZZON, C. H.; CARLOS, I. Z.; BAUAB, T. M. *Mouriri elliptica*: validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 359-368, 2009.
- MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; ANDRADE, N. J.; ISMAIL, F. M. D.; BARBOSA, M. C. A. Exposure to *Anacardiaceae* volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, v. 17, p. 9728-9740, 2012.
- MOUSTAFA, S.M. A.; MENSRAWI, B. M.; WASSEL, G. M.; MAHMOUD, K.; MOUNIER, M. M. Screening of some plants in egypt for their cytotoxicity against four human cancer cell lines. **International Journal of PharmTech Research**, v.6, n.3, p. 1074-1084, 2014.
- MUHAMMAD, A.; RAHMAN, M. S.; KABIR, A. N. M. H.; KABIR, S.; HOSSAIN, M. K. Antibacterial and cytotoxic activities of *Spondias pinnata* (Linn. f.) Kurz fruit extract. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 2, p. 265-267, 2011.
- MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, p. 517-531, 2009.
- MUZAFFAR, F.; SINGH, U. K.; CHAUHAN, L. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 39-53, 2013.
- NABAVIZADEH, F.; ALIZADEH, A. M.; ADELI, S.; GOLESTAN, M.; MOLOUDIAN, H.; KAMALINEJAD, M. Gastroprotective effects of *Stachys Lavandulifolia* extract on experimental gastric ulcer. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 155-159, 2011.
- NAZAR, F.; KHAN, A. M.; SHAH, S. S. Microemulsion system with improved loading of piroxicam: a study of microstructure. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, n. 4, p. 1286-1294, 2009.
- NEERAJ, J. P.; SINGH, S.; SINGH, J. Role of free radicals and antioxidants in human health and disease. **International Journal of Current Research and Review**, v. 5, n. 19, p. 14-22, 2013.
- NOBRE-JÚNIOR, H. V.; OLIVEIRA, R. A.; MAIA, F. D.; NOGUEIRA, M. A. S.; MORAES, M. O.; BANDEIRA, M. A. M.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 1066-1075, 2009.
- NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M.; ALMEIDA, H. S.; VELOSO, M. D. M. Aspectos ecológicos da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão Anacardiaceae): fenologia e germinação de sementes. **Revista Árvore**, v. 32, n. 2, p. 233-243, 2008.

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 NORDESTE. **Aroeira, Aroeira-do-sertão, Aroeira-verdadeira**. Disponível em: <http://www.onordeste.com/onordeste/enciclopediaNordeste/index.php?titulo=Aroeira,+Aroeira-d0-sert%C3%A3o,+Aroeira-verdadeira<r=A&id_perso=3442>. Acesso em: 29 dez. 2014.

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

OLIVEIRA, L. C. **Ciprofloxacino encapsulado em lipossomas revestidos com ácido polilático co-glicólico ou veiculados em gel de copolímero de bloco 'PLURONIC® F127'**. 2006. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

OLIVEIRA, L. B. O.; GOMES, C. F.; BAMPI, V.; RHEINGANTZ, M. G.; SOUZA, M. A. L. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Vitalle**, v. 22, n. 2, p. 11-22, 2010.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

ORME, I. et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M. SUZANA, O.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, 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). **Revista 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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAN, S. Y.; LITSCHER, G.; GAO, S. H.; ZHOU, S. F.; YU, Z. L.; CHEN, H. Q.; ZHANG, S. F.; TANG, M. K.; SUN, J. N.; KO, K. M. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-20, 2014.

PANORAMIO. **GUSTAVO ASCIUTTI**. Disponível em: <<http://www.panoramio.com/photo/63597682>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

- PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.
- PEEK, R. M.; FISKE, C.; WILSON, K. T. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 831-858, 2010.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PESCA, M. S.; DAL PIAZ, F.; SANOGO, R.; VASSALLO, A.; ABREU, M. B.; RAPISARDA, A.; GERMANÒ, M. P.; CERTO, G.; DE FALCO, S.; DE TOMMASI, N.; BRACA, A. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antiangiogenic activities. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 29-35, 2013.
- PLAPIED, L.; DUHEM, N.; DES RIEUX, A.; PRÉAT, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, p. 228-237, 2011.
- PONTICELLI, S.; BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; DE FALCO, S. Competitive ELISA-based screening of plant derivatives for the inhibition of VEGF family members interaction with vascular endothelial growth factor receptor 1. **Planta Med**, v. 74, p. 401-406, 2008.
- PRABHA, P.; KARPAGAM, T.; VARALAKSHMI, B.; PACKIAVATHY, A. S. Indigenous anti-ulcer activity of *Musa sapientum* on peptic ulcer. **Pharmacognosy Research**, v. 3, n. 4, p. 232-238, 2011.
- PROCTOR, M. J.; DEANS, C. Complications of peptic ulcers. **Oesophagus and stomach**, v. 32, n. 11, p. 599-607, 2014.
- PULLI, B.; ALI, M.; FORGHANI, R.; SCHOB, S.; HSIEH, K. L. C.; WOJTKIEWICZ, G.; LINNOILA, J. J.; CHEN, J. W. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-10, 2013.
- RAJ, S.; JOSE, S.; SUMOD, U. S.; SABITHA, M. Nanotechnology in cosmetics: opportunities and challenges. **Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 186-193, 2012.
- RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 613-617, 2013.
- RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332-347, 2014.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 219 p.

- REJINOLD, N. S.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly(N-vinylcaprolactam) nanoparticles as a 5-fluorouracil carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 776-786, 2011.
- REMILA, S.; ATMANI-KILANI, D.; DELEMASURE, S.; CONNAT, J. L.; AZIB, L.; RICHARD, T.; ATMANI, D. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, p. 274-286, 2015.
- RIBEIRO, A. F.; RESENDE, R. L. O.; CABRAL, L. M.; SOUSA, V. P. Poly ϵ -caprolactone nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract: preparation, characterization, and optimization using the Box-Behnken design. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 431-442, 2013.
- RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; SILVA, M. A. P.; LACERDA, S. R.; SOUZA, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1522-1533, 2014.
- RODRIGUEZ-BURBANO, D.; QUIJANO-CELIS, C. E.; PINO, J. A. Composition of the essential oil from leaves of *Astronium graveolens* Jacq grown in Colombia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 6, p. 488-489, 2010.
- ROSA, L. M.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 967-974, 2003.
- ROY, S.; KIRANMAYEE, R.; BHUVANESWARI, C.; GIRI, A.; MANGAMOORI, L. N. Phytochemical analysis of *Andrographis paniculata* extract and its antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 85-91, 2010.
- SAINI, J. K.; NAUTIYAL, U.; KUMAR, S. M.; SINGH, D.; ANWAR, F. Microemulsions: a potential novel drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2014.
- SALZE, G. P.; DAVIS D. A. Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. **Aquaculture**, v. 437, p. 215-229, 2015.
- SANTOS, S. B.; LIMA, A. C. A.; MELO, A. R. S.; FRAZÃO, C. S.; CHERPAK, G. L. Comparação da eficácia da aroeira oral (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com omeprazol em pacientes com gastrite e sintomas dispépticos: estudo randomizado e duplo-cego. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, v. 29, n. 4, p. 118-125, 2010.
- SARAIVA, A. M.; CASTRO, R. H. A.; CORDEIRO, R. P.; PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; CASTRO, V. T. N. A.; AMORIM, E. L. C.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANO, M. N. C. *In vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724-1731, 2011.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Helicobacter pylori* bacteria, SEM. Disponível em: <http://www.sciencephoto.com/search?subtype=contributors&searchstring=JBX&media_type=images#>. Acesso em: 29 dez. 2014.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Helicobacter pylori* bacteria, SEM. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/83891/view>>. Acesso em: 06 jul. 2015.

SCODITTI, E.; CALABRISO, N.; MASSARO, M.; PELLEGRINO, M.; STORELLI, C.; MARTINES, G.; DE CATERINA, R.; CARLUCCIO, M. A. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 527, p. 81-89, 2012.

SGONC, R.; GRUBER, J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. **Gerontology**, v. 59, p. 159-164, 2013.

SILVA, R. M. G.; SARAIVA, T. S.; SILVA, R. B.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, L. P. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* e *Astronium graveolens*. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 632-637, 2010.

SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2011.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012a.

SILVA, A. R.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G.; GUEDES, M. I. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740-746, 2012b.

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, p. 2218-2243, 2014.

SILVEIRA, P. C.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, n. 3, p. 279-282, 2007.

SILVEIRA, P. C. L.; SILVA, L. A.; TUON, T.; FREITAS, T. P.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Efeitos da laserterapia de baixa potência na reposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.13, n.4, p. 281-287, 2009.

- SIMONATTO, E.; PERES, M. T. L. P.; HESS, C. B.; SILVA, C. B.; CHAGAS, M. O. Chemical composition and cytotoxic activity of leaves essential oil from *Mangifera indica* var. *coquinho* (Anacardiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 596-599, 2010.
- SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 173-183, 2004.
- ŠKROVÁNKOVÁ, S.; MIŠURCOVÁ, L.; MACHŮ, L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 67, p. 75-139, 2012.
- SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 121-132, 2010.
- SOUZA, S. M. C.; AQUINO, L. C. M.; MILACH, A. C.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 220-225, 2007.
- SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 452-458, 2009.
- SOUZA, T. M.; CUNHA, A. P.; FARIAS, D. F.; MACHADO, L. K.; MORAIS, S. M.; RICARDO, N. M. P. S.; CARVALHO, A. F. U. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of *m*-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1380-1384, 2012.
- SRIKANTA, B. M.; SATHISHA, U. V.; DHARMESH, S. M. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E₂ levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. **Biochimie**, v. 92, p. 194-203, 2010.
- STANNER, S.; WEICHSELBAUM, E. Antioxidants. **Encyclopedia of Human Nutrition**, v. 1, p. 88-99, 2013.
- STEWART, D. J.; ACKROYD, R. Peptic ulcers and their complications. **Surgery**, v. 29, n. 11, p. 568-574, 2011.
- STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The impact of the 3immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. 69, p. 1-13, 2014.
- STREET, R. A.; PRINSLOO, G. Commercially important medicinal plants of South Africa: a review. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

SUGIMOTO, M.; YAMAOKA, Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 1, p. 45-56, 2009.

SULEIMAN, M. M.; ELGORASHI, E. E.; SAMUEL, B. B.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Biological activities of compounds isolated from *Loxostylis alata* (Anacardiaceae) leaf extract. **Biochemistry & Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 1-6, 2013.

SULTANA, B.; HUSSAIN, Z.; ASIF, M.; MUNIR, A. Investigation on the antioxidant activity of leaves, peels, stems bark, and kernel of mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, 2012.

SUZUKI, H.; SETO, K.; MORI, M.; SUZUKI, M.; MIURA, S.; ISHII, H. Monochloramine induced DNA fragmentation in gastric cell line MKN45. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 275, p. 712-716, 1998.

SUZUKI, R. B.; COLA, R. F.; COLA, L. T. B.; FERRARI, C. G.; ELLINGER, F.; THEREZO, A. L.; SILVA, L. C.; ETEROVIC, A.; SPERANÇA, M. A. Different risk factors influence peptic ulcer disease development in a brazilian population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 38, p. 5404-5411, 2012.

SUZUKI, H.; MOAYYEDI, P. *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 168-174, 2013.

TAKEUCHI, K.; TANIGAMI, M.; AMAGASE, K.; OCHI, A.; OKUDA, S.; HATAZAWA, R. Endogenous prostaglandin E2 accelerates healing of indomethacin-induced small intestinal lesions through upregulation of vascular endothelial growth factor expression by activation of EP4 receptors. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, n. 1, p. S67-S74, 2010.

TAN, Y. P.; CHAN, E. W. C. Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and *Piper betle*. **Food Bioscience**, v. 6, p. 17-23, 2014.

TARNAWSKI, A. S.; JONES, M. K. Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: molecular mechanisms and clinical implications. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 81, p. 627-636, 2003.

TARALLO, V.; LEPORE, L.; MARCELLINI, M.; DAL PIAZ, F.; TUDISCO, L.; PONTICELLI, S.; LUND, F. W.; ROEPSTORFF, P.; ORLANDI, A.; PISANO, C.; DE TOMMASI, N.; DE FALCO, S. The biflavonoid amentoflavone inhibits neovascularization preventing the activity of proangiogenic vascular endothelial growth factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 19641-19651, 2011.

THORSEN, K.; SØREIDE, J. A.; KVALØY, J. T.; GLOMSAKER, T.; SØREIDE, K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender adjusted analysis of incidence and mortality. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 347-354, 2013.

TUBESHA, Z.; IMAM, M. U.; MAHMUD, R.; ISMAIL, M. Study on the potential toxicity of a thymoquinone-rich fraction nanoemulsion in sprague dawley rats. **Molecules**, v. 18, p. 7460-7472, 2013.

URS, A. N.; NARULA, P.; THOMSON, M. Peptic ulcer disease. **Paediatrics and Child Health**, v. 24, n. 11, p. 485-490, 2014.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F. de; KHALIL, N. M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 447-453, 2007.

VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; DEV, V. R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytochemistry**, v. 10, p. 189-195, 2003.

WANG, H.; GAO, X. D.; ZHOU, G. C.; CAI, L.; YAO, W. B. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. **Food Chemistry**, v. 106, p. 888-895, 2008.

WEEKS, D. L.; SACHS, G. Sites of pH regulation of the urea channel of *Helicobacter pylori*. **Journal Molecular Microbiology**, v. 40, n. 6, p.1249-1259, 2001.

WEX, T.; MALFERTHEINER, P. Proteases in *Helicobacter pylori* infection. **European Gastroenterology Review**, v. 387, n. 7, p. 56-58, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world medicines situation traditional medicines: global situation, issues and challenges. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch18_wTraditionalMed.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2014.

YEN, F. L.; WU, T. H.; TZENG, C. W.; LIN, L. T.; LIN, C. C. Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7376-7382, 2010.

ZHANG, R.; BRENNAN, M.L.; FU, X.; AVILES, R.J.; PEARCE, G.L.; PENN, M. S.; TOPOL, E. J.; SPRECHER, D. L.; HAZEN, S. L. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. **JAMA**, v. 286, n. 17, p. 2136-2142, 2001.

ZGLICZYNSKI, J. M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWSKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.

ANEXOS

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 33/2013

Interessada: KAMILA MARIA SILVEIRA NEGRI

Orientadora: Profª Drª Tais Maria Bauab

Projeto: Avaliação do potencial biológico *in vitro* e *in vivo* de extratos hidroalcoólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados

Parecer nº 60/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

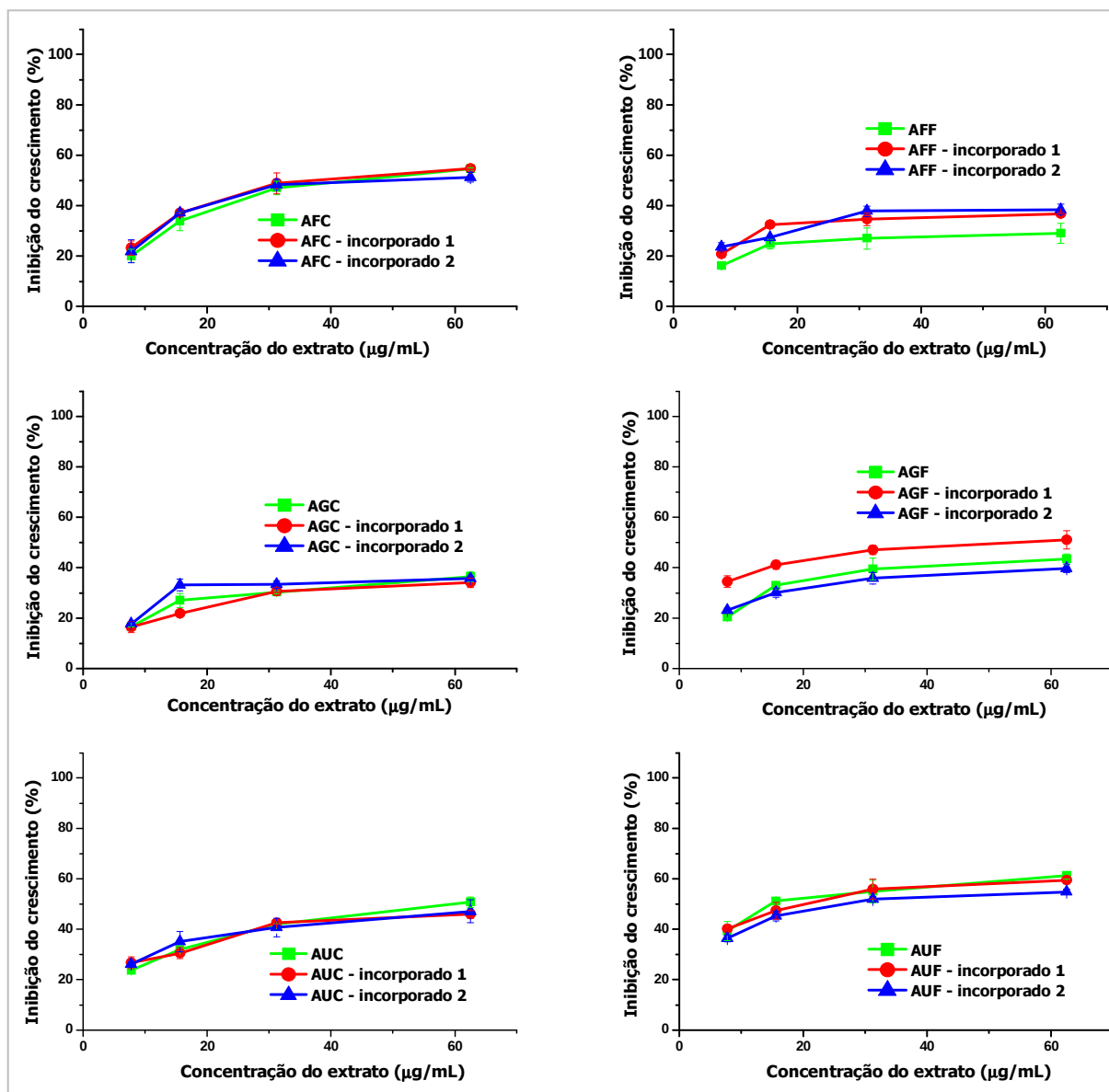
A Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Avaliação do potencial biológico *in vitro* e *in vivo* de extratos hidroalcoólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados", apresentado pela Pós-graduanda KAMILA MARIA SILVEIRA NEGRI, sob orientação da Profª Drª Tais Maria Bauab, do Departamento de Ciências Biológicas desta Faculdade.

O relatório final deverá ser entregue em JUNHO de 2014, em formulário para este fim.

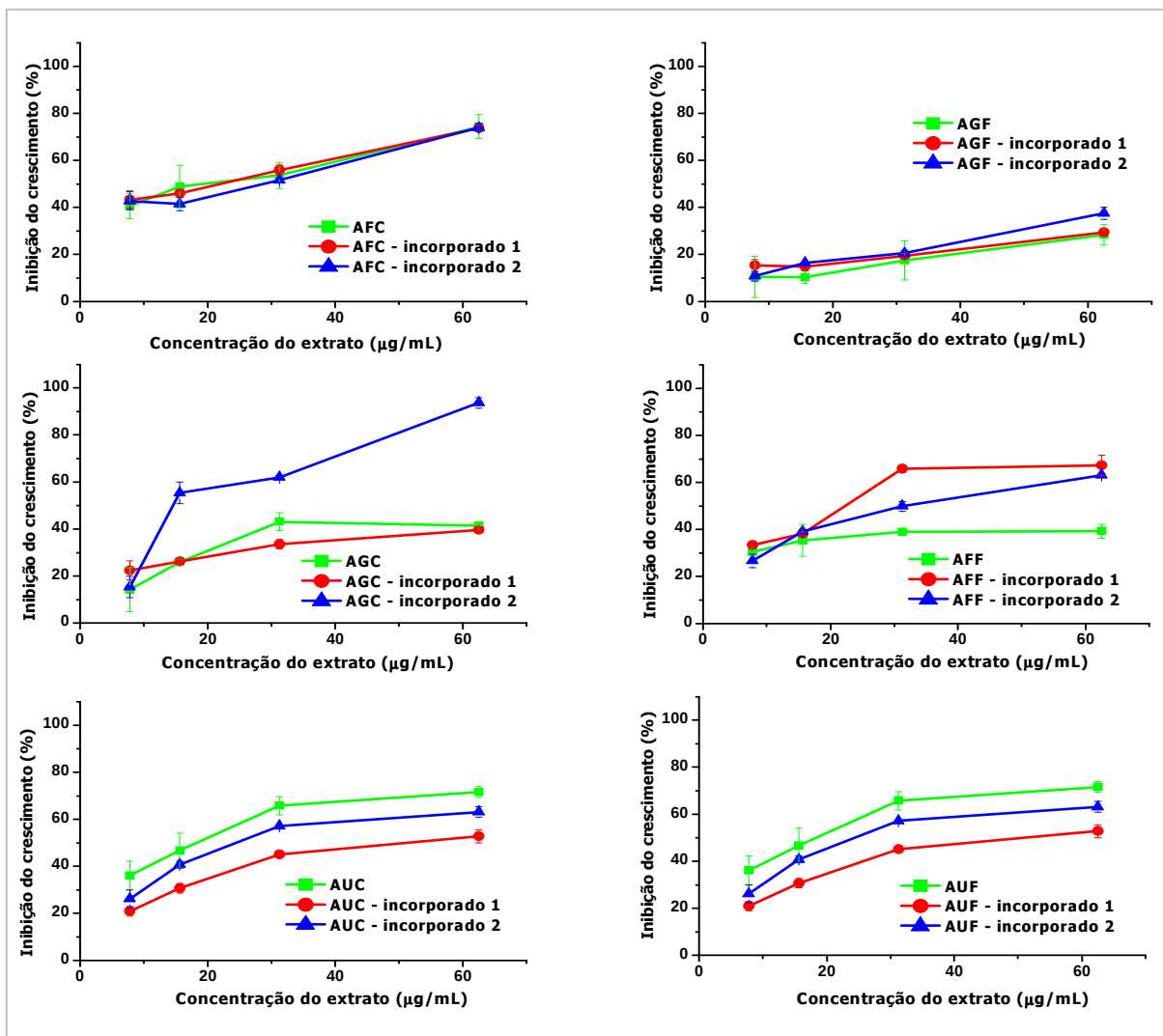
Araraquara, 29 de outubro de 2013.


Profª. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA

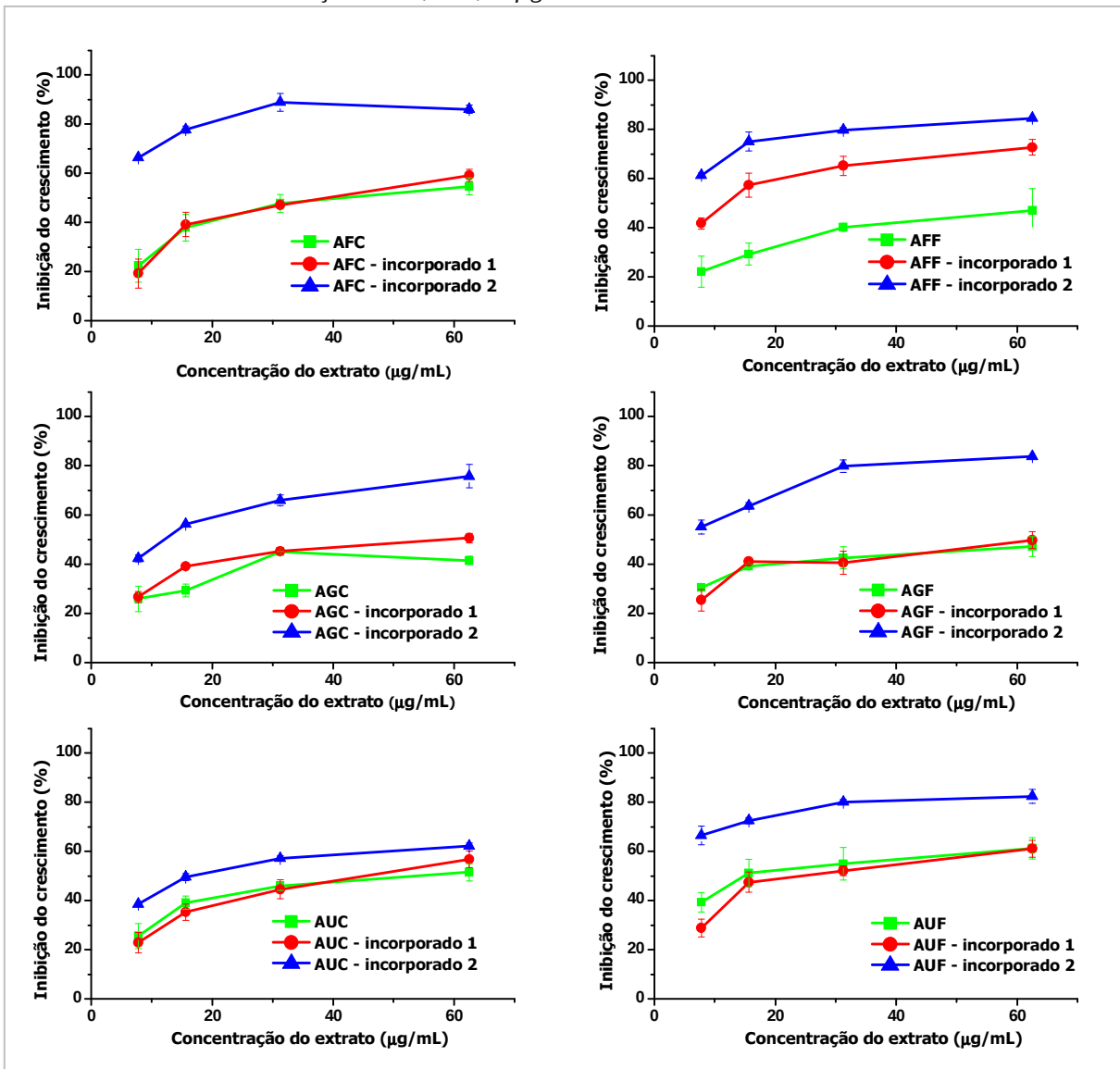
Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados nas concentrações de 62,5 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a *E. coli*.



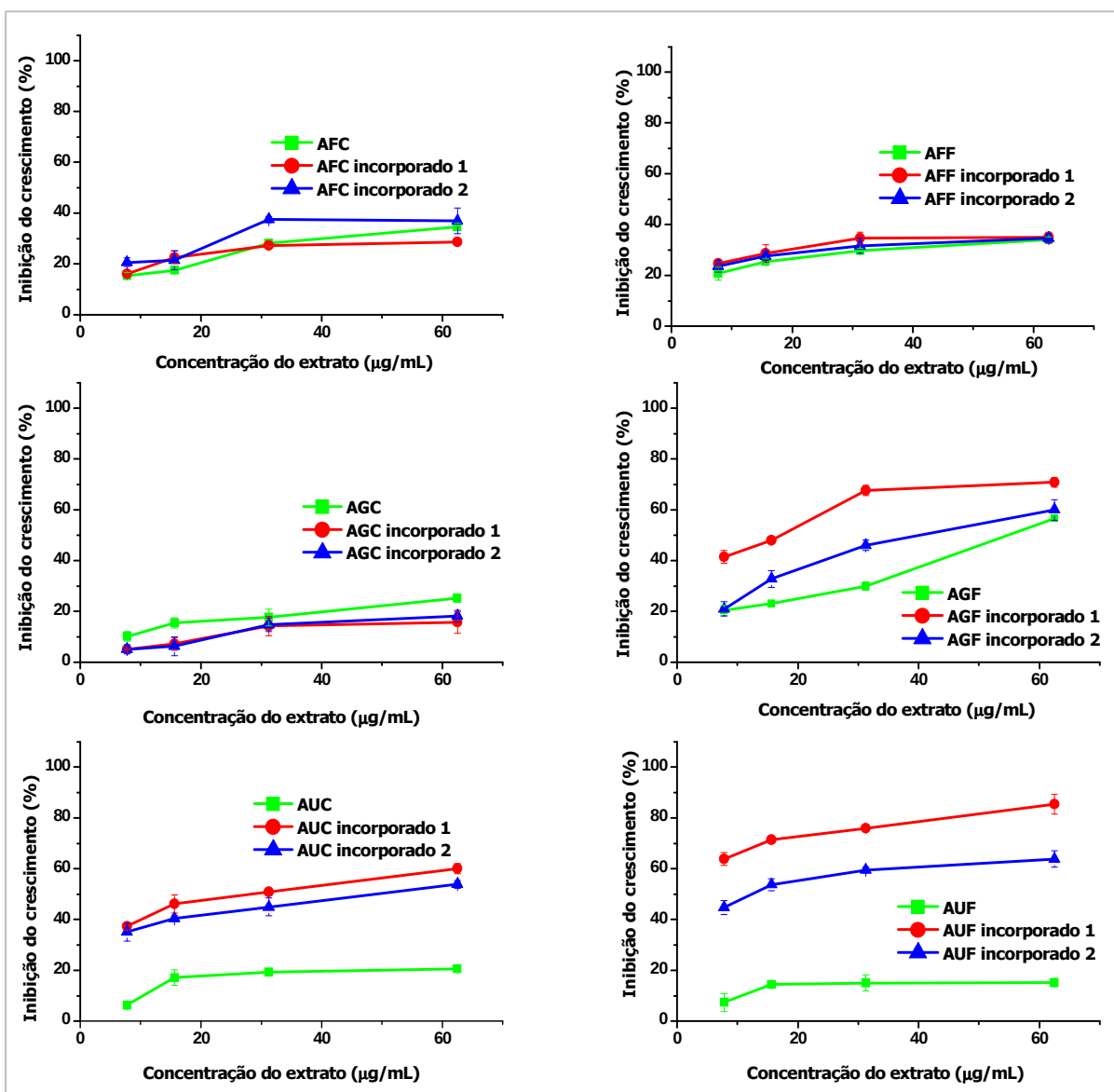
Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados nas concentrações de 62,5 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus*.



Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados nas concentrações de 62,5 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. setubal*.



Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados nas concentrações de 62,5 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a *H. pylori*.



Atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados nas concentrações de 62,5 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a *C. albicans*.

