

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

**Avaliação da atividade anti - *Helicobacter pylori* de extratos
aquosos de *Casearia sylvestris* não incorporados e
incorporados em sistema lipídico nanoestruturado.**



Julia Hunger Vieira

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Co-orientadora: Larissa Spósito

Araraquara – SP

2017



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

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

**Avaliação da atividade anti - *Helicobacter pylori* de extratos
aquosos de *Casearia sylvestris* não incorporados e
incorporados em sistema lipídico nanoestruturado.**

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

Julia Hunger Vieira

Aluna

Larissa Spósito

Co-orientadora

Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Orientadora

Araraquara – SP

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gisele e Paulo, e meu irmão, Cássio, por sempre terem me apoiado e incentivado à ingressar na Universidade, dar meu melhor e sempre abraçar as oportunidades.

À Profª Drª Taís Maria Bauab, minha orientadora, pelos ensinamentos, empatia e conselhos. Agradeço também a confiança e oportunidade de me tornar uma profissional mais completa.

À minha co-orientadora Larissa Spósito, por ter me ajudado muito nesse processo, de perto e de longe, estando sempre presente, e principalmente, pela paciência e sinceridade que teve comigo.

À Patrícia Bento, por ter me ajudado muito, não só a mim mas a todos, mesmo sendo de outro laboratório. Obrigada por ter estado sempre disponível e com vontade de ajudar.

Aos mestrandos e doutorandos do laboratório de Fisiologia do Microrganismo, Matheus Ramos, Bruna Bonifácio, Anderson Noronha e Luciani Toledo, por terem me ajudado muito, desde o começo, terem contribuído para eu gostar muito do nosso ambiente de trabalho, com muito trabalho mas também diversão e amizade.

Aos meus companheiros de IC e faculdade, Caetano Toshiro, Erina Samezima, Isadora Masiero e Beatriz Souto, pelo companheirismo, brincadeiras e apoio nessa caminhada.

À minha família araraquarense, Larissa Corbani, Thatiana Tieghi, Thaís Marcelino, Ana Beatriz Andreazzi, Emiliana Maldonado e Vitor Motta, por terem se tornado companheiros de vida, me acolhido e feito desses anos uma época maravilhosa da minha vida.

Ao meu namorado e parceiro, Giovanni Giacchetto, por não ter me deixado desistir e me motivado a ir sempre a frente.

À todos do Departamento de Ciências Biológicas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente da realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Material vegetal e seus derivados	17
3.1.1. Obtenção do material vegetal	17
3.1.2. Desenvolvimento do extrato aquoso	18
3.1.2.1. Extrato aquoso 1	18
3.1.2.2. Extrato aquoso 2	18
3.1.2.3. Extrato aquoso 3	19
3.2. Desenvolvimento do sistema nanoestruturado	20
3.2.1. Preparo das formulações e escolha do sistema	20
3.2.2. Caracterização estrutural	21
3.2.2.1. Determinação do diâmetro das gotículas e índice de polidispersidade (IPD) por espalhamento de luz dinâmico	21
3.2.2.2. Potencial Zeta	22
3.2.3. Incorporação dos derivados vegetais nos sistemas nanoestruturados	23
3.3. Análises biológicas in vitro	22
3.3.1. Cepa bacteriana	22
3.3.2. Padronização da suspensão bacteriana	22
3.3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	23
3.3.4. Leitura com revelador	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Obtenção e rendimento dos extratos	25
4.2. Caracterização estrutural do Sistema nanoestruturado	25
4.2.1. Diagrama Ternário de Fases	25
4.2.2. Tamanho das partículas, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta	26
4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	27
4.3.1. Extratos não-incorporados ao sistema nanoestruturado	27
4.3.2. Extratos incorporados ao sistema nanoestruturado	28
5. DISCUSSÃO	29

6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa, espiralada, curvilínea, microaerofílica e produtora de urease, que reside principalmente dentro da camada de muco na superfície da mucosa gástrica humana. A infecção por *Helicobacter pylori* é, hoje, considerada a segunda infecção mais prevalente no homem, e o principal agente etiológico da maioria dos casos de gastrite crônica, úlcera péptica, carcinoma e linfomas gástricos. Possui diversos fatores de virulência e capacidade em formar biofilmes, o que aumenta a resistência aos antimicrobianos convencionais. Portanto é crescente o interesse na busca de agentes antimicrobianos de origem natural, como as plantas medicinais. Uma das plantas que tem demonstrado potencial contra esta bactéria é a *Casearia sylvestris*, da família *Salicaceae*, distribuída por toda a América do Sul. Este projeto visa determinar a atividade antimicrobiana de extratos aquosos de *Casearia sylvestris* frente ao *Helicobacter pylori*, através da concentração inibitória mínima, incorporados e não-incorporados em sistema nanotecnológico. Os resultados indicaram que os três tipos de extratos aquosos testados não possuem atividade contra a bactéria sem estar incorporado no sistema, possuindo uma CIM > 1000 µg/mL, e os estudos com os extratos incorporados no sistema corroboraram com este resultado, também possuindo uma CIM > 1000 µg/mL. Pode-se concluir por este estudo que os diferentes extratos aquosos de *Casearia sylvestris* não obtiveram atividade antimicrobiana frente ao *Helicobacter pylori*, estando ou não incorporados em sistema nanotecnológico. Assim, é um importante estudo a ser analisado a fim de se questionar quais outras alternativas podem ser viáveis para desenvolver uma terapia eficiente contra a infecção.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, microdiluição, extrato, *Casearia sylvestris*, sistema nanotecnológico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Helicobacter pylori</i>	13
Figura 2. Folhas e frutos de <i>Casearia sylvestris</i>	15
Figura 3. Estrutura das microemulsões	16
Figura 4. Folhas secas de <i>C. sylvestris</i>	18
Figura 5. Folhas pulverizadas de <i>C. sylvestris</i>	19
Figura 6. Extrato logo após a liofilização	19
Figura 7. Fluxograma dos três tipos de extrações aquosas realizadas com as folhas de <i>C. sylvestris</i>	20
Figura 8. Representação da microplaca para determinação da CIM dos extratos não-incorporados	23
Figura 9. Representação da microplaca para determinação da CIM dos extratos incorporados	24
Figura 10. Diagrama Ternário de Fases de todos os pontos do sistema nanoestruturado	26
Figura 11. Representação da revelação pela resazurina da microplaca do teste dos extratos não-incorporados	27
Figura 12. Representação da revelação pela resazurina da microplaca do teste dos extratos incorporados	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento dos extratos após os processos extrativos	25
Tabela 2. Resultados obtidos nos testes para caracterização do sistema	26
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos não-incorporados de <i>Casearia sylvestris</i> utilizando como revelador a resazurina 0,01%	27
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos incorporados de <i>Casearia sylvestris</i> utilizando como revelador a resazurina 0,01%	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CMH – Caldo Mueller Hinton

C. sylvestris – *Casearia sylvestris*

EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo

H. pylori – *Helicobacter pylori*

MALT - linfoma de tecido linfóide associado à mucosa

ME – Microemulsões

SFB – Soro fetal bovino

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas continuam um grande problema de saúde pública no século XXI, e em conjunto com os desafios da Saúde Mundial, se destacam pela habilidade de historicamente deixar marcas profundas na sociedade. Estando intimamente ligadas à natureza e complexidade do comportamento humano, e refletem quem somos, o que fazemos, como vivemos e interagimos com outras pessoas, animais e o ambiente (FAUCI e MORENS, 2012; ABAT et al., 2016).

Doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos (capazes de produzir doenças infecciosas no hospedeiro), como bactérias, vírus, parasitas ou fungos, e podem ser transmitidas direta ou indiretamente, de uma pessoa a outra (WHO, 2017a). Causam a morte de quase nove milhões de pessoas anualmente, muitas delas crianças menores de 5 anos, além de causarem consequências e deficiências para o resto da vida (WHO, 2017b). Devido à rápida evolução dos patógenos infecciosos, a lista de doenças que causam está continuamente mudando e aumentando, o que dificulta seu controle (FAUCI e MORENS, 2012; LEVENTHAL et al., 2015).

Em 1982, Marshall e Warren, identificaram a bactéria gástrica, *Campylobacter pyloridis*, mais tarde reclassificada em *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Essa descoberta os premiou com o Prêmio Nobel da Medicina, em 2005. O *H. pylori* é uma bactéria medindo aproximadamente 3,5 x 0,5 µm, gram-negativa, espiralada, curvilínea, microaerofílica, móvel, produtora de urease, que reside principalmente dentro da camada de muco na superfície da mucosa gástrica humana. *In vitro*, é um microrganismo de crescimento lento (PONTES et al., 2014).

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), representado na figura 1, é um dos microrganismos patogênicos mais comuns entre humanos, afeta mais da metade da população mundial, sendo adquirida principalmente nos primeiros 5 anos de vida (RAJINDRAJITH et al., 2009). A bactéria usualmente é transmitida através das vias oral-oral, gástrica-oral e fecal-oral, sendo o homem o principal reservatório conhecido, evidências que confirmam este tipo de transmissão é a detecção da bactéria na saliva, biofilme dental e fezes. A infecção por *H. pylori* ocorre principalmente na infância, sendo raramente adquirida em adultos, e mais precocemente em países em desenvolvimento. São fatores considerados de risco

para a infecção o baixo nível socioeconômico da região e ter principalmente um dos pais ou membro da família infectado (SILVA et al., 2004).

Atualmente o diagnóstico da infecção por *H. pylori* tem se baseado em métodos invasivos e não-invasivos. Nos métodos invasivos, investigam a própria bactéria, DNA, RNA ou produtos bacterianos em fragmentos em biópsias da mucosa gástrica obtida por endoscopia. Nos métodos não-invasivos, são investigados os anticorpos anti-*H. pylori* em testes sorológicos de amostras de soro, urina, fezes ou saliva. (TEIXEIRA et al., 2016; MOURA et al., 2004).

A infecção causada por este microrganismo induz uma inflamação persistente na mucosa gástrica que pode conduzir à úlcera péptica e duodenal, câncer gástrico, MALT (linfoma de tecido linfóide associado à mucosa) e com o linfoma não-Hodgkin gástrico. Além disso também é a principal causadora da gastrite, uma das infecções mais comuns na espécie humana (MATA et al., 2016). Apesar da maioria dos indivíduos acometidos pela infecção permanecerem assintomáticos durante a vida, a grande maioria desenvolvem inflamação crônica. Dentre os indivíduos infectados, aproximadamente 10% desenvolvem úlcera péptica, 1-3% desenvolvem câncer gástrico e 0,1% desenvolvem MALT (WANG et al., 2014).

A colonização pelo *H. pylori* induz gastrite histológica em todos os indivíduos infectados, porém uma minoria desenvolve sinais clínicos, envolvendo fatores do hospedeiro, da bactéria e ambientais. Existe uma forte correlação entre o nível de secreção ácida e a gastrite, quanto menos ácido é secretado no estômago, maior é a disseminação da bactéria (BARBOSA E SCHINONNI, 2011).

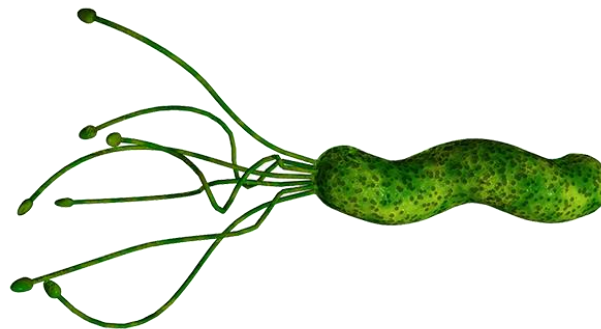
O câncer tem sido uma das principais causas de morte no mundo e o câncer gástrico representa o quarto tumor mais frequente, e caracteriza a segunda causa de óbitos por câncer, com aproximadamente um milhão de óbitos por ano (ANTUNES et al., 2010). Uma revisão de estudos de caso-controle confirmaram que pacientes testados positivos para *H. pylori* foram entre 3 a 6 vezes mais propensos a desenvolver câncer gástrico comparados com controles não-infectados. Tais dados levaram a Associação Internacional de Pesquisa em Câncer a concluir que a bactéria é um agente carcinogênico tipo 1 (FORD, et al., 2014).

A infecção por *H. pylori* também é agravada pelos diversos fatores de virulência.

A urease é uma enzima responsável pela catalisação e degradação da uréia, formando íons de amônia e dióxido de carbono, alcalinizando o pH circundante,

facilitando a sobrevivência da bactéria no ambiente hostil do estômago. A bactéria também possui outros fatores de virulência, como citocina associada ao gene A (cagA) e picB e a citocina vacuolizante (VacA), que juntamente com outros componentes bacterianos, tornam a bactéria capaz de facilitar a adesão gástrica, induzir lesão na mucosa e manutenção da resposta inflamatória, evitando as defesas do hospedeiro. Além disso, a presença do flagelo também facilita a penetração da bactéria no muco, melhorando a motilidade da célula bacteriana. (PONTES et al., 2014; RAJINDRAJITH et al., 2009).

Figura 1. *Helicobacter pylori*



Fonte: The Helicobacter Foundation

Outro fator relacionado a virulência desta bactéria é a sua capacidade de formar biofilme. Essa questão é muito importante devido à dificuldade de se remover este biofilme e de que bactérias em biofilme são mais resistentes à antibióticos do que bactérias de vida livre (GARCÍA et al., 2014).

Os tratamentos para a erradicação do *H. pylori* consiste de diferentes regimes. A terapia de primeira linha é a terapia tripla, que consiste na administração concomitante de um inibidor de bomba de próton com 2 antibióticos, sendo um deles amoxicilina ou metranidazol (para alérgicos à amoxicilina), e o outro claritromicina, durante 7-14 dias, porém essa terapia tem sua eficácia sendo diminuída com o decorrer do tempo. Há várias explicações para esse declínio, como alta acidez gástrica, alta carga bacteriana, mas a mais importante é o aumento da resistência da bactéria contra a claritromicina. (CHEY E WONG, 2007; MALFERTHEINER et al.,

2012). Em áreas com alta prevalência de resistência à claritromicina, outra terapia usada é a terapia sequencial, que consiste na administração de Amoxicilina e um inibidor de bomba de próton por 5 dias, seguido pela terapia tripla com um inibidor de bomba de próton, claritromicina e metronidazol por outros 5 dias. A segunda linha de tratamento é a terapia quádrupla, que consiste na administração dos fármacos da terapia tripla mais a adição de sais de bismuto, por 7-10 dias, que é mais simples que a terapia sequencial (WEERASEKARA et al., 2014; CHEY et al., 2017).

Apesar do *H. pylori* ser suscetível a diversas terapias antimicrobianas, a infecção tem se provado difícil de curar devido ao aumento da prevalência de cepas resistentes aos antimicrobianos mais usados, como amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, e particularmente a claritromicina; elevados custos; inacessibilidade a este tratamento por populações mais carentes e possíveis efeitos colaterais por uso de diversos medicamentos (FEDERICO et al., 2014; FERREIRA, 2013).

Os antimicrobianos de natureza sintética são os mais usados na maioria das infecções e são os que apresentam maior prevalência de microrganismos resistentes, estes acarretando riscos à vida humana e produzindo infecções de difícil tratamento e cura. Uma alternativa para esta situação é pesquisar e produzir novas moléculas antimicrobianas a partir de produtos naturais (AMANCIO et al., 2015).

Seguindo este raciocínio, podemos pensar em plantas, que são ótimas opções para se obter uma grande gama de fármacos e têm sido usadas na medicina há muito tempo, por representarem uma alternativa econômica, serem acessíveis e aplicáveis a diversas patologias (SARDI et al., 2013).

Devido às mudanças econômicas, políticas e sociais que o mundo passa já há alguns anos, mudanças ocorreram na saúde das pessoas e nos modelos de cuidado. O uso terapêutico de produtos naturais, que antes era marginalizado nas instituições de saúde, hoje ganha espaço no meio dominado pela alopatria. (BADKE et al., 2011), sendo o Brasil privilegiado por ser um dos países de maior biodiversidade do planeta possuindo cerca de 20% do número total de espécies de plantas do mundo (RIBEIRO et al., 2014). Apesar desse grande número, menos de 10% foram avaliadas detalhadamente por suas características biológicas e menos de 5% foram submetidas à estudos fitoquímicos detalhados (FERREIRA et al., 2013).

Várias plantas medicinais de ocorrência natural, ervas, e extratos de frutas têm demonstrado possuir atividade antimicrobiana contra o *H. pylori* (AMIN et al.,

2013). Uma dessas plantas é a *Casearia sylvestris* (GONÇALVES, 2012), representada na figura 2.

A espécie *Casearia sylvestris* Swartz, da família *Salicaceae*, popularmente conhecida como “guaçatonga”, “erva-de-lagarto” ou “cafezinho-do-mato”, é uma planta arbórea distribuída por toda a América do Sul, inclusive em diversas regiões do Brasil (TRECCO et al., 2014).

Possui altura de 4-6 metros, com tronco de 20-30cm de diâmetro; folhas assimétricas, pecioladoas, serradas, brilhantes em cima, de 6-12cm de comprimento por 3-5cm de largura; flores pequenas e numerosas de coloração esverdeada; frutos são cápsulas com sementes envolvidas por arilo. Floresce nos meses de junho a agosto e seus frutos amadurecem a partir de setembro a novembro. (FERREIRA et al., 2011; TININIS et al., 2006).

Figura 2. Folhas e frutos de *Casearia sylvestris*



Fonte: Flora Digital da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Fotógrafo: Franco da Rosa)

Na medicina popular suas folhas são utilizadas como cicatrizantes, antiséptica, antimicrobiana, hemostática e depurativa do sangue, sendo empregadas no tratamento de aftas, herpes simples, úlceras gástricas, feridas, picadas de insetos entre outras.

A estrutura química dos compostos presentes em *Casearia sylvestris* é bastante complexa, caracterizada pela presença de cumarinas, flavonóides, lignanas e diversos diterpenos e suas folhas contêm principalmente diterpenos clerodânicos (especialmente os típicos do gênero *Casearia*, como as *casearinas* e

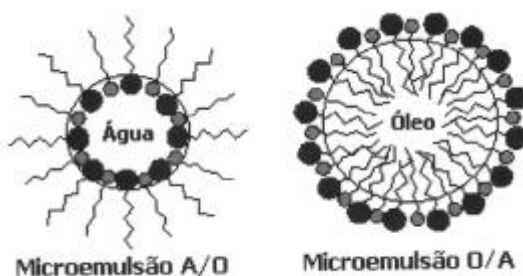
casearvestrinas) com ação antitumoral, antiúlcera, antifúngica e antibiótica. (MARQUES et al. 2013; TININIS et al., 2006).

Grande interesse se deve ao seu efeito antiúlcero gênico, onde age reduzindo o volume de ácido clorídrico produzido, não interferindo no processo de digestão de alimentos, como demonstrado por estudos com seu extrato etanólico e hidroalcoólico. Também previne a irritação da mucosa gástrica induzida por estresse (CARVALHO, 2007; FERREIRA et al., 2011).

A administração de fármacos para o tratamento de doenças crônicas é preferencialmente realizada pela via oral, porém por essa via os compostos podem ser degradados pelo pH ácido do estômago, além de apresentar pouca solubilidade (PLAPIED et al., 2011). Portanto de modo a aprimorar a aplicação terapêutica, são indicadas estratégias terapêuticas como os sistemas de liberação controlada de fármacos, área em desenvolvimento com a criação de sistemas que visam liberar o fármaco num sítios específico e num tempo específico (TRECCO et al., 2014). Algumas estratégias, como os sistemas lipídicos nanoestruturados, têm a habilidade de compartimentalizar diversos compostos ativos e modificar suas propriedades em sistemas biológicos. Nosso grupo de pesquisa (BONIFÁCIO et al., 2015) destaca entre eles as microemulsões lipídicas, que são transparentes, fluidas, e termodinamicamente estáveis.

Microemulsões (ME) são sistemas termodinamicamente estáveis, opticamente transparentes, isotrópicos e de baixa viscosidade, constituídos por gotículas de tamanho nanométrico dispersas em uma fase contínua de um solvente que seja imiscível com a fase dispersa (usualmente água e óleo), e também possuem um elevado poder de solubilização (SILVA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2004). Na figura 3 consta uma representação da estrutura das microemulsões.

Figura 3. Estrutura das microemulsões



Fonte: OLIVEIRA, 2004

As MEs são consideradas sistemas reservatórios, já que é possível o fármaco se encontrar separado do meio através de uma membrana ou interface. Esse tipo de sistema proporciona propriedades particulares e interessantes, capazes de se ligar a diferentes grupos de fármacos, com o objetivo de solubilizar, melhorar a estabilidade, diminuir a toxicidade, e principalmente, melhorar a biodisponibilidade (BONIFÁCIO, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar e avaliar a atividade anti - *Helicobacter pylori* de extratos aquosos de *Casearia sylvestris* não incorporados e incorporados em sistema lipídico nanoestruturado (do tipo microemulsão).

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter extratos aquosos das folhas de *Casearia sylvestris*;
- ✓ Desenvolver o sistema lipídico nanoestruturado;
- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos frente ao *Helicobacter pylori*, pela técnica de diluição em microplaca, incorporados e não-incorporados no sistema nanotecnológico;
- ✓ Comparar as atividades antimicrobianas obtidos pelos 3 métodos extrativos diferentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e seus derivados

3.1.1. Obtenção do material vegetal

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

Sul, 48°20'21,5 Oeste). O material vegetal foi coletado em 10 de novembro de 2015 e seco em estufa com circulação de ar a 40° C por sete dias.

3.1.2. Desenvolvimento do extrato aquoso

Foram realizados três tipos de extração aquosa para obtenção dos extratos aquosos das folhas de *C. sylvestris*.

3.1.2.1. Extrato aquoso 1

O extrato aquoso 1 foi obtido por infusão com as folhas secas de *C. sylvestris* conforme descrito no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). 10 gramas de folhas secas (figura 4) foram rasuradas e colocadas em um béquer no qual foram adicionados 375 mL de água deionizada fervente. Em seguida o béquer foi tampado com vidro de relógio. Após 15 min, a solução extrativa (infuso) foi filtrada em papel de filtro, resfriada e, posteriormente, liofilizada. O extrato seco obtido foi armazenado em frasco âmbar tampado e guardado a temperatura de -7°C.

Figura 4. Folhas secas de *C. sylvestris*



Fonte: Autora

3.1.2.2. Extrato aquoso 2

O extrato aquoso 2 foi obtido com as folhas secas de *C. sylvestris* pulverizadas em moinho de facas. 50g da droga vegetal pulverizada (figura 5) foi extraída em um erlenmeyer com 500 mL de água deionizada em um banho a 50 °C por 4 h. A cada 30 min esse erlenmeyer foi agitado manualmente. Após as 4 h a

solução extrativa foi filtrada em papel de filtro, resfriada e liofilizada. O extrato seco obtido foi armazenado em frasco âmbar tampado e guardado a temperatura de -7°C .

Figura 5. Folhas pulverizadas de *C. sylvestris*

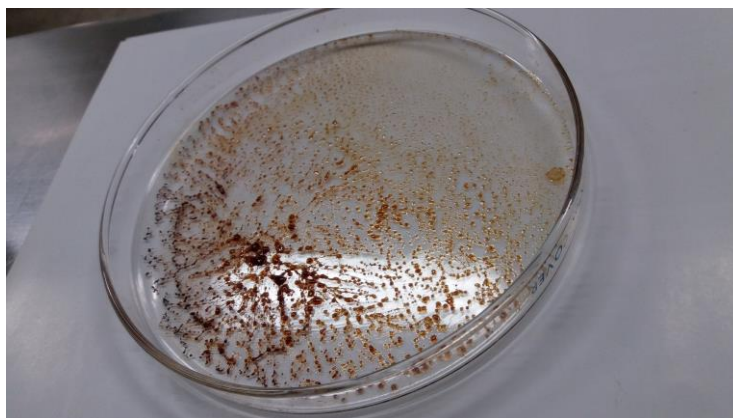


Fonte: Autora

3.1.2.3. Extrato aquoso 3

O Extrato 3 foi obtido a partir das folhas secas de *C. sylvestris*. 30 gramas da folha rasurada foram colocadas num béquer, e, em seguida, foi adicionado 500 mL de água deionizada ao béquer, e o conteúdo homogeneizado. A mistura foi levada ao banho de ultrassom por 20 minutos e filtrada à vácuo. Posteriormente, se seguiu reextração com 250 mL de água por mais 2x, filtrando à vácuo ao final deste tempo. A solução extrativa foi transferida para um recipiente, congelada e liofilizada (figura 6). O extrato seco obtido foi armazenado em frasco âmbar tampado e guardado a temperatura de -7°C .

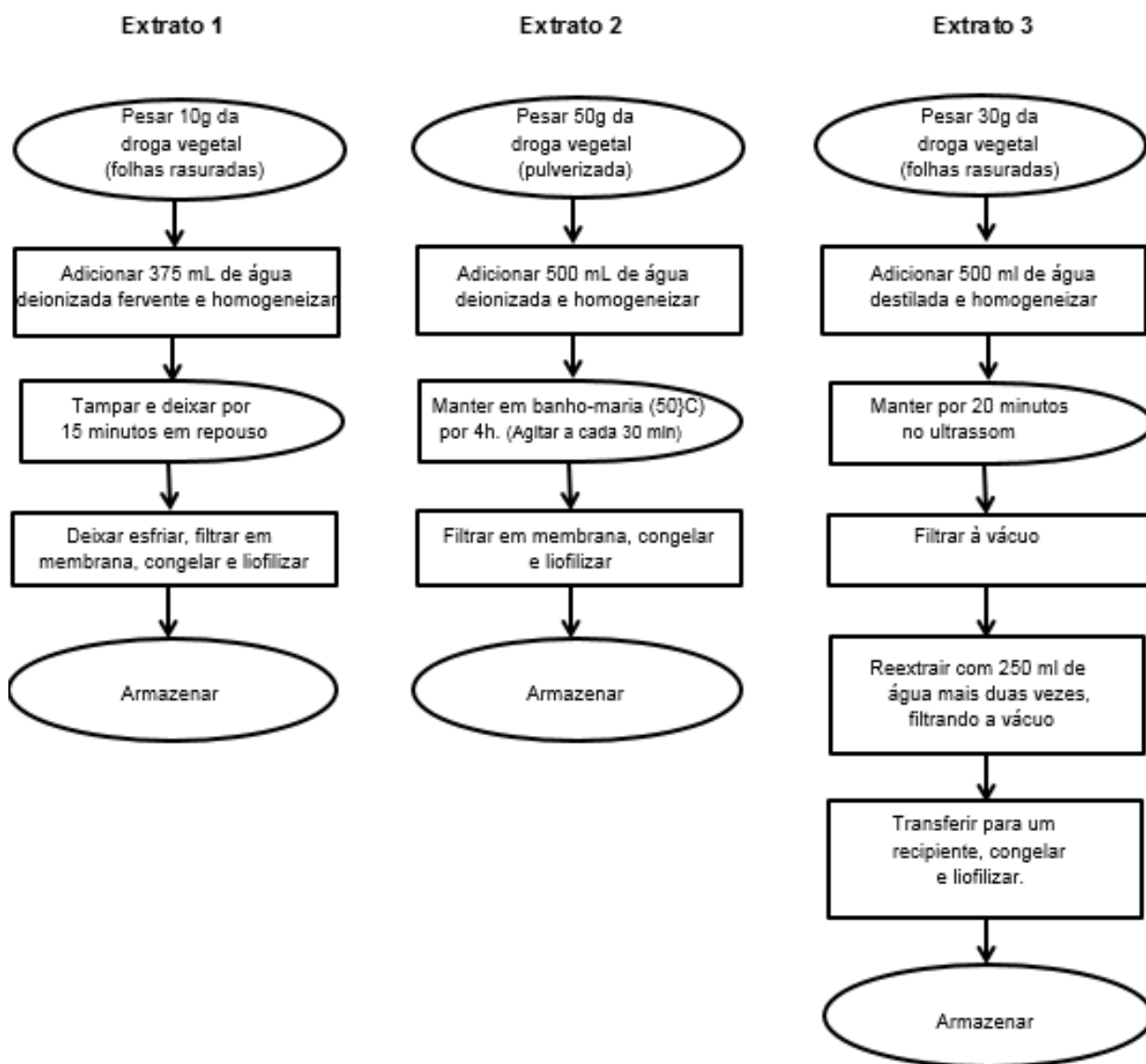
Figura 6. Extrato logo após a liofilização



Fonte: Autora

Na figura 7, consta uma representação esquemática em fluxograma das três extrações realizadas.

Figura 7. Fluxograma dos três tipos de extrações aquosas realizadas com as folhas de *C. sylvestris*



Fonte: autora

3.2. Desenvolvimento do sistema nanoestruturado

3.2.1. Preparo das formulações e escolha do sistema

Para o desenvolvimento do sistema nanoestruturado foi utilizada metodologia baseada no trabalho de Formariz (2010), com adaptações. Os experimentos de formulação da microemulsão lipídica e incorporação dos extratos foram realizados

com colaboração da Dra. Patrícia Bento da Silva (Departamento de Fármacos e Medicamentos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

O sistema composto por colesterol foi escolhido para teste por este ser menos citotóxico e para observar uma possível interação com a membrana da bactéria.

O sistema foi preparado utilizando uma mistura de polioxietileno(23)lauriléter (Brij 35®) e fosfatidil colina de soja (1:2) como tensoativo (T) de EHL= 10,97, colesterol como fase oleosa (FO), tampão fosfato-salino (pH = 7,4) e dispersão de poloxamer a 0,5% como fase aquosa (FA). Foi realizado um diagrama ternário de fases onde foi escolhida a melhor proporção para ser utilizada nos testes. 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. O ponto escolhido foi o ponto 1 (SLT), constituído por 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo, e 80% de fase aquosa, por ser um ponto a qual estava completamente homogeneizado e líquido, sendo viável nos testes *in vitro*.

A mistura escolhida então foi sonicada (no sonicador Q700 da QSonica®), operando de modo descontínuo, com potência de 700 Watts, amplitude de 25%, por 20 minutos, intervalo de 30 segundos a cada 59 segundos decorridos, com banho de gelo durante todo o processo.

3.2.2. Caracterização estrutural

3.2.2.1. 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):

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h}$$

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.

3.2.2.2. Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK, onde que as análises foram realizadas 24 horas após o preparo das formulações.

3.2.3. Incorporação dos derivados vegetais nos sistemas nanoestruturados

Para a incorporação dos 3 extratos, adicionou-se 0,012g dos respectivos derivados em 6 mL do sistema. A mistura foi sonicada por 1 minuto nas mesmas condições da preparação do sistema, atingindo a concentração de 2000 µg/mL.

3.3. Análises biológicas in vitro

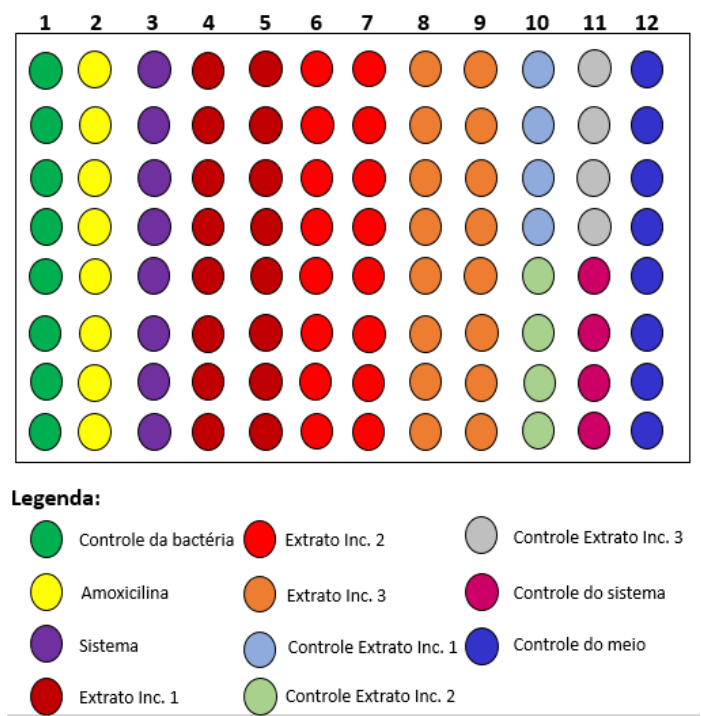
3.3.1. Cepa bacteriana

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

3.3.2. Padronização da suspensão bacteriana

A partir de uma cultura em ágar sangue de carneiro (AS) de 72 h de incubação a 37 °C com 10 % de CO₂, colônias bacterianas foram adicionadas a Caldo Müller Hinton (CMH) acrescido de 50 % de soro fetal bovino (SFB) até atingir-se uma

Figura 9. Representação da microplaca para determinação da CIM dos extratos incorporados



Fonte: autora

3.3.4. Leitura com revelador

As leituras foram realizadas com o revelador resazurina (100 µg/mL) do qual 30 µL foi adicionado em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 h a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (RAMOS, *et al.*, 2015). A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (MONTEJANO *et al.*, 2005).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e rendimento dos extratos

O rendimento das folhas de *C. sylvestris*, após serem submetidas aos diferentes tipos de extrações aquosas foram como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento dos extratos após os processos extrativos

Extrato	Peso inicial (g)	Peso após liofilização (g)	Rendimento (%)
Extrato 1	10	0,72	7,19
Extrato 2	50	1,94	3,88
Extrato 3	30	3,01	10,03

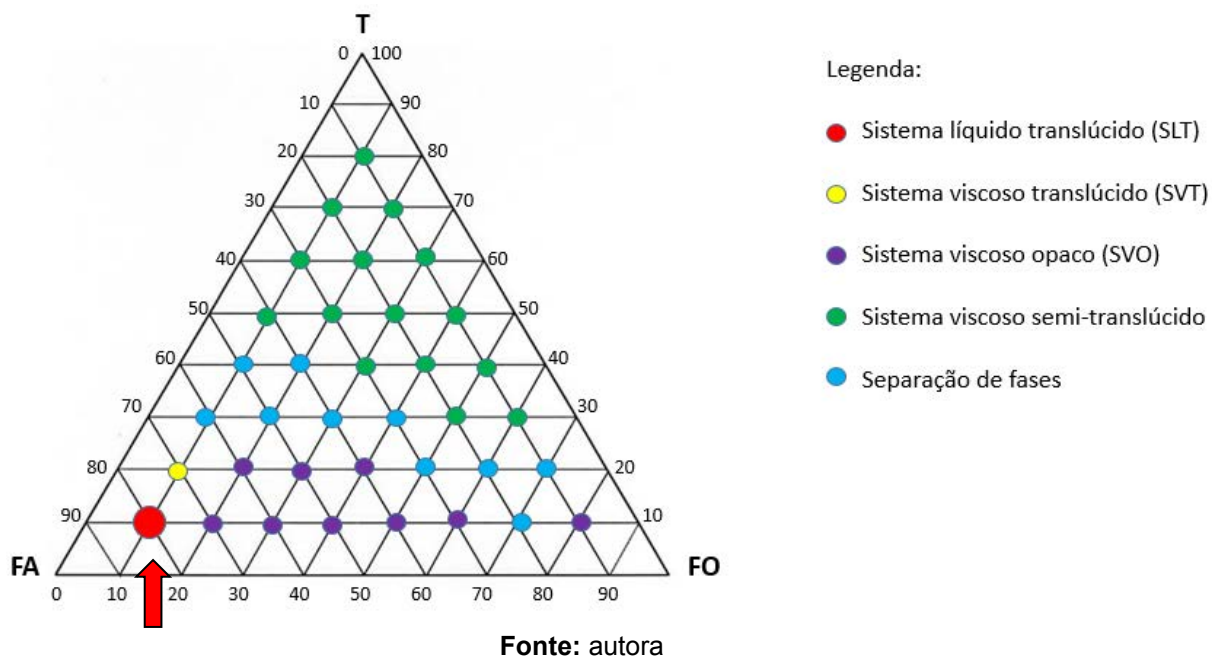
Fonte: autora

4.2. Caracterização estrutural do Sistema nanoestruturado

4.2.1. Diagrama Ternário de Fases

O sistema foi preparado utilizando-se em diferentes concentrações uma mistura de tensoativos, óleo (colesterol) e água (tampão alcalino-fosfato e dispersão poloxamer). 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 dos componentes foram obtidos pontos com diferentes características estruturais. O diagrama de fases apresenta características com pontos nas regiões SLT [fase oleosa (10%) e tensoativo (10%)], SVO [fase oleosa (20-80%) e tensoativo (10-20%)], SF [fase oleosa (10-70%) e tensoativo (10-40%)], SVT [fase oleosa (10%) e tensoativo (20%)], SVST [fase oleosa (10-60%) e tensoativo (30-80%)] (Figura 11).

O ponto escolhido foi o ponto 1, indicado pela seta na Figura 10, composto por 10% de tensoativo, 10% de fase oleosa e 80% de fase aquosa. Essa formulação foi a escolhida por ser a única líquido-transparente, ou seja, a mais adequada para o trabalho.

Figura 10. Diagrama Ternário de Fases de todos os pontos do sistema nanoestruturado

4.2.2. Tamanho das partículas, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

A Tabela 2 apresenta os valores das médias e desvios-padrões dos tamanhos das partículas, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta para a formulação escolhida (Ponto 1) e também para as formulações com os extratos incorporados.

Tabela 2. Resultados obtidos dos testes para caracterização do sistema

Formulação	Tamanho das Partículas (nm)	Índice de Polidispersão (IPD)	Potencial Zeta (mV)
SLN	130,5 ± 2,910	0,313 ± 0,008	- 1,60 ± 0,196
Extrato 1	159,0 ± 12,31	0,370 ± 0,048	- 1,02 ± 0,205
Extrato 2	141,5 ± 1,818	0,359 ± 0,043	- 1,02 ± 0,0716
Extrato 3	136,8 ± 4,384	0,307 ± 0,028	- 2,04 ± 0,374

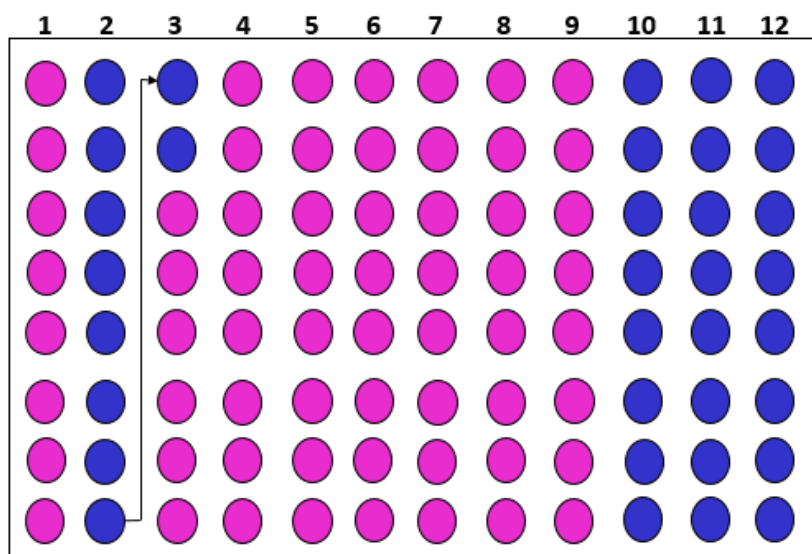
Fonte: autora

4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.3.1. Extratos não-incorporados ao sistema nanoestruturado

A Figura 11 e a Tabela 3 apresentam os resultados da atividade antimicrobiana dos três extratos não-incorporados frente à Cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 através da técnica de diluição em microplaca.

Figura 11. Representação da revelação pela resazurina da microplaca do teste dos extratos não-incorporados



Legenda:

- Presença de crescimento bacteriano
- Ausência de crescimento bacteriano

Fonte: autora

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos não-incorporados de *Casearia sylvestris* utilizando como revelador a resazurina 0,01%

Amostra	Concentração Inibitória Mínima (CIM)
Extrato 1	>1000 µg/mL
Extrato 2	>1000 µg/mL
Extrato 3	>1000 µg/mL

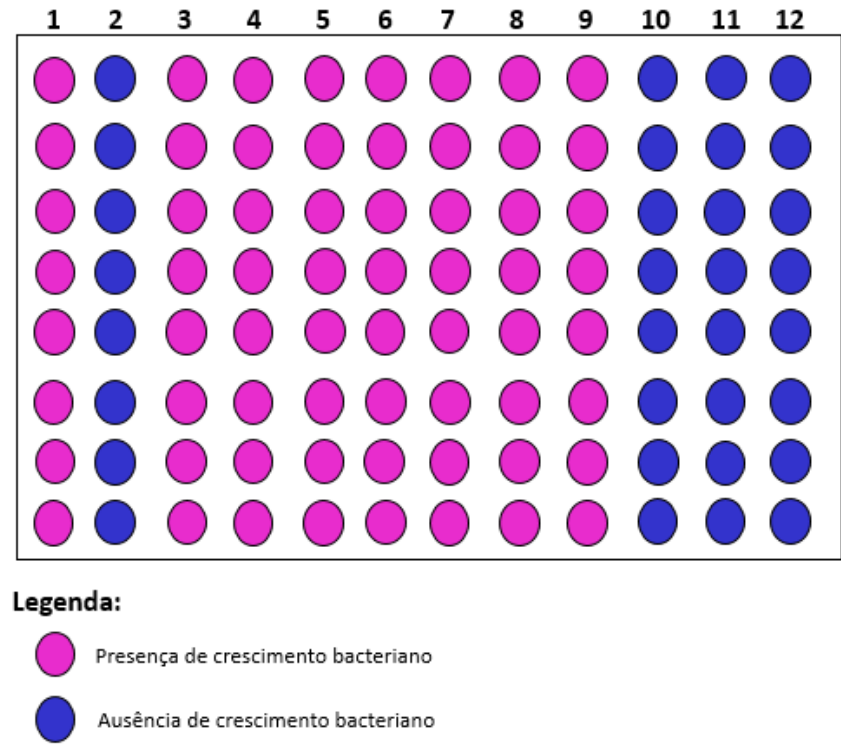
Amoxicilina	0,975 µg/mL
-------------	-------------

Fonte: autora

4.3.2. Extratos incorporados ao sistema nanoestruturado

A Figura 12 e a Tabela 4 apresentam os resultados da atividade antimicrobiana dos três extratos incorporados ao sistema nanoestruturado frente à Cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 através da técnica de diluição em microplaca.

Figura 12. Representação da revelação pela resazurina da microplaca do teste dos extratos incorporados



Fonte: autora

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos aquosos incorporados de *Casearia sylvestris* utilizando como reveladore a resazurina 0,01%

Amostra	Concentração Inibitória Mínima (CIM)
Extrato 1	>1000 µg/mL

Extrato 2	>1000 µg/mL
Extrato 3	>1000 µg/mL
Amoxicilina	<7,8 µg/mL

Fonte: autora

5. DISCUSSÃO

O termo Planta Medicinal segundo a ANVISA considera a planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo que dentre os fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (NEWMAN & CRAGG, 2007).

As plantas são capazes de biossintetizar determinadas substâncias, denominadas metabólitos secundários, que desempenham diversas funções, como por exemplo: proteção contra predadores, atratores voláteis, fornecimento de cor às plantas, dentre outras. Como exemplo de metabólitos secundários, temos os alcalóides, os terpenos e os flavonóides. Um vasto leque de atividades biológicas é descrito para estas classes de metabólitos secundários, como por exemplo, ação antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiparasitária, antiviral, dentre outras, tornando as plantas uma fonte muito interessante para estudo de novas substâncias terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2011; COUTINHO et al., 2009).

Estudos fitoquímicos prévios mostraram que as espécies de *Casearia* revelaram possuir diversos metabólitos secundários em sua composição, dentre esses, temos os terpenos, alcalóides, taninos, cumarinas, flavonóides, lignanas, esteróides, amidas e compostos fenólicos (fenólicos, fenóis simples e polifenóis). Diversos estudos confirmam a atividade antimicrobiana dessa planta, pedindo estudos mais completos e aprofundados no assunto, como demonstrado por Cavalheiro, 2016 e Silva, 2008. Um estudo feito em nosso grupo de pesquisa por

Spósito, 2017 demonstrou que possivelmente estes metabólitos secundários estão relacionados com atividades anti-*H. Pylori*.

Neste estudo foram realizados métodos extrativos diferentes, sendo eles diferentes infusões e ultrassom. A metodologia da extração por infusão consiste na utilização de água morna a quente, a qual pode ser facilmente realizada em ambiente caseiro, onde a água em alta temperatura facilita a extração de substancias das plantas (SIMÕES, 2003).

A metodologia de extração por ultrassom consiste no uso de um equipamento que fornece energia mecânica que causa a implosão de bolhas cavitacionais, fornecendo uma forte tensão de cisalhamento. Com isso, geram-se perturbações nos tecidos vegetais liberando diferentes substâncias presentes nas células vegetais e, além disso, a extração por ultrassom permite diminuir o tempo do processo em relação à infusão (DENT et al., 2015). Depois de realizadas as extrações, as amostras foram submetidas a um processo de liofilização. Posteriormente, foi feita a solubilização desses extratos com o intuito de utilizá-los nos testes de microdiluição. Todos os extratos obtidos foram solubilizados facilmente apenas em água.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada pelo teste de microdiluição em placas de 96 poços, a fim de obter-se a concentração inibitória mínima (CIM), considerada concentração mínima capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Dessa maneira, o intuito é a descoberta de agentes antimicrobianos que possam ser mais eficazes e com menos efeitos colaterais. A grande vantagem do teste de microdiluição é o baixo custo, a fácil reprodutibilidade, a alta sensibilidade em relação aos outros testes e o uso de pequenas quantidades de amostras (OSTROSKY et al., 2008). Como revelador foi utilizada a resazurina, que se caracteriza por apresentar mudança de coloração, por meio de uma redução, em meios contendo microrganismos vivos ou não. Esse revelador é um dos mais utilizados na microbiologia, no entanto, detecta somente quando há uma atividade maior ou igual a 90% de inibição (HÖRNER et al., 2008; GUDIÑA et al., 2010).

A fim de garantir maior confiabilidade nos resultados e evitar falsos-positivos ou negativos, todos os testes realizados neste estudo utilizaram sempre diversos tipos de controles, como controle de esterilidade do meio, de crescimento, dos extratos e de antibióticos.

É importante salientar que os resultados são provenientes de extratos vegetais e metabólitos secundários presentes nestes, portanto estes podem sofrer variação devido a diversos fatores, tais como fatores ambientais, época de colheita, radiação, poluição, temperatura e condições de irrigação, o que pode justificar divergências nos resultados descritos neste trabalho. (SILVA et al., 2010).

Nas placas dos testes dos extratos não-incorporados, podemos observar que nenhum dos três extratos apresentou atividade frente ao *H. pylori*, em nenhuma das placas, uma vez que todos deram Concentração Inibitória Mínima $>1000 \mu\text{g/mL}$. Sendo assim, a fim de buscar uma atividade para os extratos, procedemos para a produção e incorporação dos extratos aquosos de *C. sylvestris* no sistema nanoestruturado.

Na resultados da caracterização do sistema, todos os valores de tamanho de partícula estão na faixa de 10-2500nm, intervalo considerado ideal para sistemas lipídicos nanoestruturados do tipo microemulsão, segundo Formariz et al. Quando se compara as formulações sem e com os extratos, observa-se um pequeno aumento no tamanho das partículas, sendo um indicativo de que ocorreu a incorporação dos compostos no sistema. Os valores do Índice de Polidispersidade (IPD) variaram entre $0,307 \pm 0,028$ e $0,370 \pm 0,048$, apresentando uma faixa de variação estreita, indicando uma boa homogeneidade. Os resultados do potencial zeta também se mantiveram dentro do esperado, sendo a carga negativa é proveniente dos componentes das formulações. A fosfatidilcolina de soja possui grupamentos ésteres livre que contribuem para a carga negativa do sistema, bem como o colesterol que em sua estrutura possui um grupamento hidroxila livre. Todos os resultados da caracterização estiveram dentro do esperado para sistemas lipídicos nanoestruturados do tipo microemulsão, portanto o sistema foi utilizado para a incorporação dos extratos para avaliar se haveria o aumento esperado na atividade desses extratos frente ao *H.pylori*.

Nas placas dos testes com o extrato incorporado no sistema, observamos que novamente nenhum dos três extratos apresentou atividade frente ao *H. pylori*, em nenhuma das placas, com todos com Concentração Inibitória Mínima $>1000 \mu\text{g/mL}$. Com ambos os testes não resultando em atividade relevante, consideramos que o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* não tem atividade significativa frente ao *H. pylori*.

Outro estudo de nosso grupo de pesquisa (SPÓSITO, 2017), realizou testes com extratos etanólicos das folhas de *C. sylvestris* frente ao *H. pylori*, obtendo resultados significantes e satisfatórios, o que nos leva a pensar que os diferentes tipos de extrações e diferentes tipos de solventes são capazes de extrair substâncias e metabólitos secundários diferentes, o que é corroborado pelo estudo de Oliveira et al. (2016) ao qual compara diferentes tipos de extração e afirma que um maior rendimento e número de substâncias presentes deve-se ao fato do etanol ser uma molécula anfifílica e extrair tanto substâncias com caráter apolar quanto polar.

São poucos os relatos observados na literatura a respeito da atividade de extratos aquosos de *C. sylvestris*, ao contrário dos extratos etanólicos e hidroetanólicos, o que estimula ainda mais a busca por novas estratégias que possam aprimorar a atividade biológica do extrato vegetal.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que extratos aquosos obtidos de folhas de *C. sylvestris* pelos métodos de infusão ou ultrassom não possuem atividade antimicrobiana frente ao *H. pylori*, como demonstrado pela Concentração Inibitória Mínima maior que 1000 µg/mL.

A incorporação dos extrato em sistema nanosestruturado do tipo emulsão foi realizada corretamente como confirmado pela caracterização, porém não contribuiu para um aumento ou busca de atividade, como esperado, portanto corroborando com a não eficácia da atividade antimicrobiana dos extratos.

Conclui-se a partir dos resultados obtidos e da análise de outros estudos que a *Casearia sylvestris* é uma fonte de diversos metabólitos importantes e que possuem atividade antimicrobiana, porém é importante investigar e desenvolver diferentes métodos de extração e aplicações, e além disso, explorar novos agentes antimicrobianos de origem natural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMANCIO, A. M.; REIS, L. O.; PEREIRA, J. B. B; LUCIA, M; MALAQUIAS, L. C. C; CHAVASCO, J. K. Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *Psidium*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 644-652, 2015.

AMIN, M.; ANWAR, F; NAZ, F.; MEHMOOD, T.; SAAR, N. Anti-*Helicobacter pylori* and Urease Inhibition Activities of Some Traditional Medicinal Plants. **Molecules**, 18, 2135-2149, 2013.

ANTUNES, D. C.; SILVA, I. M. L.; CRUZ, W. M. S. Quimioprevenção do Câncer Gástrico. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 56(3):367-374, 2010.

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

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

BASILE, A.C. et al. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.30, n.1, p.185-197, 1990.

BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, F. M; ZIA, M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 52-58, 2011.

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

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; 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** (Online), v. 10, p. 5081-5092, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº 10/2010, de 09 de março**, Brasília, 2010

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC Nº 26, 2014. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2017.

CARVALHO, P. E. R. Cafezeiro-do-mato/*Casearia sylvestris*. **Circular Técnica Embrapa**, 138, 2007.

CAVALHEIRO, A. H.; GODOI, A. P. T.; CARVALHO, T. C.; CATIRSE, A. B.; FURTADO, N. A. J. C. Antimicrobial potential of *Casearia sylvestris* against oral bacteria. **Revista de Odontologia da UNESP**. 45(4): 214-218, July-Aug, 2016.

CHEY, W. D.; LEONTIADIS, G. I.; HOWDEN, C. W.; MOSS, S. F. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. **American Journal of Gastroenterology**, 112:212–238; published online 10 January, 2017.

CHEY, W. D.; WONG, B. C. Y. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. **American Journal of**

Gastroenterology, by Am. Coll. of Gastroenterology. Published by Blackwell Publishing, 2007.

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

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, p.241-256, 2009.

DENT, M.; DRAGOVIC-UZELAC, V.; GAROFULIC, I. E.; BOSILJKOV, T.; JEZEK, D.; BRNCIC, M. Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly** v. 29, n. 3, p. 475-484, 2015.

FAUCI, ANTHONY S.; MORENS, DAVID M. The perpetual challenge of Infectious Diseases. **The New England Journal of Medicine**; 366:454-61, 2012.

FERREIRA, M. D. M.; LUXO, C. **Probióticos e Extratos de Plantas Medicinais na infecção por *Helicobacter pylori***. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

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

FEDERICO, A.; GRAVINA, A. G.; MIRANDA, A.; LOGUERCIO, C.; ROMANO, M. Eradication of *Helicobacter pylori* infection: Which regimen first? **World Journal of Gastroenterology**, January 21, 20(3): 665-672, 2014.

FIALHO, G. M. N.; DUARTE, C. A.; NETO, A. O. P.; MACORIS, D. G. *Casearia sylvestris* na permeabilidade gástrica à sacarose em equinos submetidos a protocolo de indução de úlcera gástrica. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.348-355, fev, 2010.

FORD, A. C.; HUNT, R. H.; MOAYYEDI, P. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BMJ**; 348:g3174, 2014.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. 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.

GARCÍA, A.; SALAS-JARA, M.; HERRERA, C.; GONZÁLEZ, C. Biofilm and *Helicobacter pylori*: From environment to human host. **World Journal of Gastroenterology**, 2014.

GONÇALVES, E. C. A. **Avaliação da atividade antibacteriana de espécies vegetais utilizadas em doenças do trato digestório: *Baccharis trimera* (LESS.) DC. E *Casearia sylvestris* SWARTZ.** Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 2012.

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.

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

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

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C. A.; ATHERTON, J.; AXON, A. T. R.; BAZZOLI, F.; GENSINI, G. F.; GISBERT, J. P.; GRAHAM, D. Y.; ROKKAS, T.; EL-OMAR, E. M.; KUIPERS, E. J. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. **The BMJ group**; 61:646-664, 2012.

MARQUES, L. G. A; SIMÕES, E. R. B; FERREIRA, P. M. P; SANTOS, M. R. M. C.; PESSOA, C. Desenvolvimento do potencial tecnológico de *Casearia sylvestris*. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão/SE. Vol. 3/n. 4/ p. 70-85, 2013.

MATA, D. R.; CORDEIRO, Y.; LIMA, F. P.; SILVA, T. L. N.; CESCHINI, T. L.; MENDES, C. C.; BERNARDES, C. O.; ANDRADE, L. C.; SILVA, R. B. V.; FERREIRA, E. B. *Helicobacter pylori* e a gastrite: um estudo retrospectivo. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 696-706, ago./dez., 2016.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazyrin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, v. 64, n. 2, p. 117-124, 2005.

MOURA, S. A. B; GERBI, M.; MEDEIROS, A. M. C; SOUTO, M. F.; EMILIANO, G. B. G; SOUSA J. M. A. Identificação de *Helicobacter pylori* na saliva e biofilme dental. **International Journal of Dentistry**, Recife, 3 (2): 349-352, Dez, 2004.

NEGRI, K. M. S. **Avaliação do potencial biológico de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados: in vitro e in vivo**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 2015.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.

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, n. 1, p. 131–138, 2004.

OLIVEIRA, L. C. **Ciprofloxacino encapsulado em lipossomas revestidos com ácido poli láctico 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. S.; MUZITANO, M. F.; COUTINHO, M. A. F.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Inter Science Place – Revista Científica Internacional**. Ano 4 - Nº 17 Abril /Junho, 2011

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas**

Medicinais, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKI, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

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.

PONTES, R. M. L, PEDROTO, I. M. T. C; FERREIRA, D, A, G. **A erradicação do *Helicobacter pylori* na atualidade e o problema da resistência**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Porto, 2014.

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

RAJINDRAJITH, S.; DEVANARAYANA, N. M.; SILVA, H. J. *Helicobacter pylori* infection in children. **Saudi Journal of Gastroenterology**, Apr, 15(2): 86-94, 2009.

RIBEIRO, D.A.; MACÊDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; OLIVEIRA, S.F.; SOUZA, M.M.A.; MENEZES, I.R.A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.

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

SILVA, L. B. L.; GONÇALVES, T. M.; ALENCAR, J. S.; NUNES, P. S.; VASCONCELLOS, A. C. A.; SANTANA, D. P. Atenção farmacêutica a pacientes com gastrite *Helicobacter pylori* positivo. **Infarma**, v. 16, nº 7-8, 2004.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; DAMICO, D. C. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from Leaves of *Casearia sylvestris*. **Journal of Pharmaceutical Biology**, Volume 46, Issue 5, 2008.

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

SILVA, R. G. S. C.; RODRIGUES, M. A. M. **Dor abdominal crônica, dispepsia não ulcerosa e infecção pelo *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes.** Dissertação (Mestrado em Patologia). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.

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

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed, 2003.

SPÓSITO, L. **Caracterização biológica e prospecção terapêutica de *Casearia sylvestris* Swartz não incorporada e incorporada em sistema nanoestruturado com enfoque na atividade anti-*Helicobacter pylori*.** Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, 2017.

TEIXEIRA, T. F.; SOUZA, I. K. F.; ROCHA, R. D. R. *Helicobacter pylori*: infecção, diagnóstico laboratorial e tratamento. **Percorso acadêmico**, Belo Horizonte, v. 6, n. 12, jul./dez., 2016.

TRECCO, A.; BORGES, F. A.; PIERRI, E. G.; SANTOS, A. G.; CHIN, C. M.; HERCULANO, R. D. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 35(1):89-95, 2014.

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

WANG, F.; MENG, W.; WANG, B.; QIAO L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. **Elsevier / Cancer Letters** 345, 196–202, 2014.

WEERESEKARA, D.; DISSANAYAKE, D. M. B. T.; ATHUKORALA, G. I. D. D. A. D.; WEERESEKARA, M. M.; FERNANDO, S. S. N. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: Recent Insights. **Sri Lankan Journal of Infectious Diseases**, Vol.4(1):2-8, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infectious diseases. Disponível em: <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/> . Acesso em: 28 jul 2017a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New ways to fight infectious diseases in poor countries. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/news/2012/fight_diseases/en/> . Acesso em: 28 jul 2017b.

Araraquara, 20 de outubro de 2017.

