UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO MATO-GROSSENSE E ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori IN VIVO* DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA (DCM_2) DE *Calophyllum brasiliense* CAMB. (Clusiaceae)

MARIA DO CARMO SOUZA

Cuiabá – MT
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO MATO-GROSSENSE E ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori IN VIVO* DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA (DCM_2) DE *Calophyllum brasiliense* CAMB.

MARIA DO CARMO SOUZA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programas de Pós-Graduação em Medicina, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins
Co-orientadora: Profa. Dra. Regilane Matos da Silva

Cuiabá – MT
2008

Essa dissertação foi submetida como parte integrante dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde, outorgado pela Universidade Federal de Mato Grosso e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da UFMT.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas éticas.

_____

Maria do Carmo Souza

Dissertação aprovada em: ___/___/___

_____

Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins
(Orientador)

_____

Profª. Dra. Regilane Matos da Silva
(Co-orientadora)

_____

Prof. Dr. Francisco José Dutra Souza

_____

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Agradeço a Deus, de eterna bondade, por ter me concedido essa oportunidade, permitindo que eu tivesse saúde e força para iniciar e concluir esse Mestrado.

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos João Vitor Souza Fernandes de Oliveira e Caroline Vitória Souza Fernandes de Oliveira, por serem minha luz e razão de viver.

Ao meu marido Celismar Barbosa de Oliveira, pela companhia constante, apoio e incentivos incondicionais.

Aos meus pais, Francisco de Assis Souza e Joselita Rosa de Souza, por terem sido pessoas orientadoras ao longo da minha trajetória de vida.

Aos meus irmãos Silvio Aparecido de Souza, José Roberto de Souza e Maria Lucia de Souza, por serem, exemplo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Domingos Tabajara de Oliveira Martins, orientador, por ter sido visionário e acreditar que eu seria capaz de desenvolver essa pesquisa, por estimular meus pensamentos, favorecendo meu aprendizado e desenvolvimento científico, prestando total disposição e amizade;

À Professora Doutora Regilane Matos da Silva, co-orientadora, Bolsista Pró-Doc CAPES, do Mestrado em Ciências da Saúde da FCM, por sempre acreditar e me apoiar, serei sempre grata por todo o seu alegre e imprescindível empenho;

Ao Mestre Joaquim Corsino da Silva Lima, Técnico Administrativo da FCM, pela contribuição nos procedimentos de bancada e coletas a campo;

À Coordenação de Programas de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso, pela oportunidade e apoio financeiro recebidos durante a realização do Mestrado em Ciências da Saúde;

À Professora Doutora Dely Cristina Martins, do Departamento de Ciências Básicas em Saúde da FCM, pela análise histopatológica, atenção e disponibilidade;

À Professora Doutora Nair Honda Kawashita e toda sua equipe do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e da Terra, pelo auxílio, atenção e disponibilidade do laboratório;

Aos Professores Doutores Lousã Lopez e Genesson dos Santos Barreto, pela orientação durante o estágio de docência;

Agradeço à amiga Mestra Ângela Márcia Serlhost Beserra, parceira de mestrado, pela paciência em me ouvir cada vez que eu trazia uma idéia nova, me enchendo de esperança e que sem perceber, constantemente alimentava meus sonhos. Gostaria de dizer o quanto sou grata pelas horas a fio que se dedicou a me ajudar e ouvir;

À amiga Juliana Almeida da Silva Fernandes, Mestranda em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia, e servidora da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso, pela companhia no trabalho e amizade;

À amiga Clélia Regiane de Oliveira, Mestranda em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia, que nesse último ano, muito contribuiu com meus procedimentos;

Ao Reginaldo Vicente Ribeiro (sofre do R), Mestrando em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia, pela constante e alegre ajuda nos experimento;

Ao Marcondes Alves Barbosa da Silva, Mestrando em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia, pela ajuda nos procedimentos e pela presença sempre agradável;

Ao amigo e Prof. Ms.. Rogério Alexandre Nunes dos Santos, da UNIC pela realização da fitoquímica preliminar, apoio e amizade;

À Maisa Pavani, mestranda do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e da Terra, pela ajuda com as dosagens de proteínas totais;

À Dra. Carmen Lucia Bassi, Bolsista DCR da FAPEMAT, do Mestrado em Ciências da Saúde da FCM, pelas palavras de incentivo, paciência de ouvir e pelos momentos agradáveis de conversa;

À amiga Mestra Íris Santana de Oliveira Mestranda em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia, pelo carinho, apoio e amizade.

À Cleoni Silvana Krueger, Fábio José da Silva e Maria Conceição Encarnação Villa, meus supervisores da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso, por terem concedido minha liberação para cumprir as atividades do mestrado.

Aos funcionários do Herbário Central da UFMT, pelo auxílio na coleta e identificação botânica das espécies vegetais estudadas.

Ao Instituto *Plantarum* para Estudos da Flora, em Nova Odessa/SP, sob Direção do Mestre Harri Lorenzi, pela ratificação taxonômica das plantas.

Aos funcionários do Biotério Central da UFMT, pelo pronto atendimento às solicitações de animais, sendo este serviço prestado com muito carinho e zelo.

“É preciso considerar que não há coisa mais difícil de executar, de sucesso mais duvidoso, nem mais perigosa de manejar do que iniciar uma nova ordem de coisas”.

Niccoló Machiavelli

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **1**

1. PLANTAS MEDICINAIS **1**

1.1 Característica da área de estudo: Bioma Cerrado 3
1.2 *Calophyllum brasiliense* Camb. 6
1.2.1 Aspectos botânicos 6
1.3 Usos populares 10
1.4 Aspectos químicos e farmacológicos 11

2. *HELICOBACTER PYLORI* **15**

2.1 Características microbiológicas 15
2.2 Epidemiologia da infecção pelo *H. pylori* 16
2.3 Rotas de transmissão do *H. pylori* 17
2.3.1 Pessoa a pessoa 18
2.3.2 Transmissão hídrica 19
2.3.3 Transmissão zoonótica 20
2.4 Patologia 20
2.5 Imunologia 23
2.5.1 Polimorfismo genético de citocinas na infecção pelo *H. pylori* 28
2.6 Terapêutica convencional 28
2.7 Pesquisa com produtos naturais 30

3. OBJETIVOS **31**

3.1 Geral 31
3.2 Específicos 31

4. MATERIAIS **33**

4.1 Material botânico 33
4.2 Microorganismos 33
4.3 Animais 34
4.4 Drogas e reagentes 35
4.5 Equipamentos 37

5. MÉTODOS **38**

5.1 Obtenção dos extratos e fração 38

5.2 Determinação do peso seco dos extratos brutos e da fração 39
5.3 Determinação dos rendimentos dos extratos e fração 39
5.4 Ensaios *in vitro* 40
5.4.1 Triagem anti-*Helicobacter pylori* dos extratos e fração de plantas medicinais, pelo método de difusão em disco. 40
5.4.2 Triagem anti-*Helicobacter pylori* de extratos e fração de plantas medicinais, pelo método de microdiluição em caldo. 41
5.5 Ensaios *in vivo* 42
5.5.1 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense* 42
5.5.2 Avaliação da atividade antiúlcera do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense,* na úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético na presença de *H. pylori* 43
5.6 Análise fitoquímica preliminar dos extratos hidroetanólicos e fração DCM_2 de *C. brasiliense* 50
5.7 Análises estatísticas 50

6. RESULTADOS 52

6.1 Determinação do peso seco e rendimento dos extratos e fração DCM_2 52
6.2 Triagem da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* dos extratos e fração DCM_2, pelo método de difusão em disco 53
6.3 Triagem da atividade anti-*Helicobacter pylori* dos extratos das plantas e fração DCM_2 *in vitro,* pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). 56
6.4 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense*. 57
6.5 Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori in vivo* do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense*. 58
6.6 Análise sorológica para determinação dos anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori* pelo método ELISA. 60
6.7 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre a expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias. 60
6.8 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre PGE_2 do raspado da mucosa gástrica 61
6.9 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre a produção de urease. 62
6.10 Análise histopatológica 63
6.11 Abordagem fitoquímica preliminar dos extratos hidroetanólicos da entrecasca e folhas e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*). 67

7. DISCUSSÃO 69

CONCLUSÃO 79

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

ANEXOS **95**

Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos..... 96

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico, expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA..... 97

Certificado de conformidade com princípios éticos na experimentação animal, conforme Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA – expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT..... 98

LISTA DE SIGAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância uma via
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
Bab A	Molécula de adesão de antígeno do grupo sanguíneo do *H. pylori*
BHI	Infusão de cérebro e coração
Cag A	Citotoxina associada ao gene A
Cag E	Citotoxina associada ao gene E
Cag PAI	*cag* pathogenicity island
CC	Quimiocina com duas cisteínas
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CIM	Concentração inibitória mínima
CO_2	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX 1	Ciclo-oxigenase 1
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
CXC	Quimiocina com duas cisteínas e um aminoácido
DCM2	Diclorometânica 2
DCs	Células dendrídicas
DupA	Gene do H. pylori promotor de úlcera duodenal
E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EH*Cb*	Extrato hexânico de *Calophyllum brasiliense*
EHE*Cb*	Extrato hidroetanólico de *Calophyllum brasiliense*
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
FeCl3	Cloreto férrico
GPS	Global Positioning System

H. pylori	*Helicobacter pylori*
H^+,K^+/ATPase	Enzima hidrogênio potássio dependente do trifosfato de adenosina
H_2	Receptor para histamina tipo 2
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HAV	Vírus da hepatite A
HCO_3^-	Íon bicarbonato
HP	*Helicobacter pylori*
HpaA	Adesina A do *H. pylori*
HP-NAP	Proteína de ativação de neutrófilos do *H. pylori*
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IceA	Gene de virulência do *H. pylori*
ICET	Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas
IFN-γ	Interferon-γ
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1β
KOH N	Hidróxido de potássio normal
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
Mg/kg	Miligrama por quilograma
MHC	Molécula de histocompatibilidade
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MT	Mato Grosso
MΦ	Macrófago
NF-κB	Fator nuclear-KappaB
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
O_2	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PG	Prostaglandinas

PGE_2	Prostaglandina E_2
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto interno bruto
PMNs	Polimorfonucleares
PRMs	Moléculas de reconhecimento do patógeno
RNI	Reativo nitrogênio específico
ROI	Reativo oxigênio específico
SabA	Adesina de ligação do ácido siálico do *H. Pylori*
SISBIO	Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade
TLRs	Toll like receptors
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U.V.	Ultra violeta
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
UNIC	Universidade de Cuiabá
v.o.	Via oral
VacA	Citotoxina de vacuolização do *H. Pylori*
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biomas brasileiros, com destaque para o Cerrado (em verde). Fonte: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_23_911200585232.html, em 28/08/2008 4

Figura 2. Distribuição Geográfica do *Calophyllun brasiliense*. Fonte: http://www.hondurassilvestre.com/query/Plantae.asp?tsn=21479, em 28/08/2008. 6

Figura 3. Mapa com locais identificados de ocorrência natural de *Calophyllum brasiliense* no Brasil. Fonte: EMBRAPA (12). 7

Figura 4. Árvore adulta de *Calophyllum brasiliense*. Em destaque: folhas, flores, frutos maduros, sementes, casca e madeira. Fonte: Lorenzi (13). 9

Figura 5. Produção de mudas de *Calophyllum brasiliense*. Fonte: http://www.reflorestar.com.br/producao.htm, em 28/08/2008. 11

Figura 6. Estruturas químicas das cromanonas isoladas de *Calophyllum brasiliense*: ácido inofiloídico: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = 1; ácido isobrasiliênsico: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = 2 e ácido brasiliênsico: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = 3. 12

Figura 7. Prevalência mundial da infecção pelo *Helicobacter pylori*. Fonte: The Helicobacter Foundation - http://www.helico.com, em 28/08/2008. 17

Figura 8. Fatores de colonização do *Helicobacter pylori*. Múltiplos fatores bacterianos contribuem para a habilidade do *H. pylori* em colonizar o estômago. Urease contribui para a resistência ácida do *H. pylori*. Os flagelos permitem a motilidade bacteriana, que possibilita a penetração bacteriana na camada de muco. Várias outras proteínas de membrana podem mediar a aderência bacteriana às células epiteliais gástricas. Fonte: Algood HMS et al. 2006 (86).. 22

Figura 9. Indução da resposta imune específica pelo *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica. Fonte: Shimoyama et al., 1998 (105). 26

Figura 10. Reconhecimento imune inato do *Helicobacter pylori*. O reconhecimento imune inato do *H. pylori* leva à produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (MΦ), células dendríticas (DCs), mastócitos e células epiteliais. O reconhecimento imune inato do *H. pylori* é mediado pelos receptores TLRs. Em adição, o peptidoglicano (PG) do *H. pylori* pode ser reconhecido por receptores Nod intracelulares. Interações entre *H. pylori* e células epiteliais gástricas levam à ativação de NF-κB e alteração na transcrição gênica nas células epiteliais. A produção de IL-8 por células epiteliais leva ao recrutamento de neutrófilos leucócitos polimorfonucleares (PMNs), que pode fagocitar bactérias opsonizadas e produz espécies oxigênio reativo (ROI) ou espécies nitrogênio reativo (RNI). A ativação de mastócitos resulta em degranulação e produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Fonte: Algood et al., 2006 (86). 27

Figura 11. Ensaio de difusão em disco: (A) Bancada de ensaios com material utilizado e (B) placa de ágar sangue com halos de inibição de crescimento do *Helicobacter pylori*. 40

Figura 12. Ensaio de microdiluição em placa inoculada com *H. pylori*, mostrando a triagem com os extratos das plantas selecionadas e a claritromicina (Clar.) como droga padrão. 42

Figura 13. Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense* na concentração de PGE_2 da mucosa gástrica de ratos ulcerados e inoculados com *H. pylori*. Os ratos foram tratados durante 14 dias com extrato hidroetanólico na dose de 200mg/kg, fração DCM_2 nas doses de 100 e 200mg/kg e tratamento padrão: claritromicina 25mg/kg / amoxicilina 50mg/kg / omeprazol 20mg/kg. Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de *n* de 6 a 10 animais por grupo. ANOVA uma via, seguida de teste de Tukey-Kramer. $^{***}p<0,001$ vs grupo normal não ulcerado; $^{\dagger\dagger}p<0,01$ vs grupo ulcerado. 62

Figura 14. Fotomicrografia da parede gástrica. A - parede gástrica não ulcerada de ratos normais (HE 100X e Giemsa 1000X); B - Aparência histológica da reepitelização da úlcera gástrica induzida por ácido acético após 17 dias de indução da úlcera por ácido acético sem a inoculação de *H. pylori* (HE 40X e Giemsa 1000X); C – persistência da úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos inoculados com *H. pylori*, após 17 dias de ulceração (HE 40X e Giemsa 1000X). 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pesos secos e rendimentos dos extratos das plantas e fração DCM_2 submetidas à triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro*. 53

Tabela 2. Avaliação da atividade dos extratos das plantas e fração DCM_2 submetidas à triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro*, pelo método de difusão em disco..... 55

Tabela 3. Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* dos extratos das plantas utilizadas na triagem e fração DCM_2, pelo método da microdiluição em caldo..... 57

Tabela 4. Efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre as atividades comportamentais gerais, em camundongos. 58

Tabela 5. Avaliação do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* sobre o retardo na cicatrização da úlcera gástrica induzida por ácido acético, na presença de *Helicobacter pylori*. 59

Tabela 6. Determinação dos anticorpos IgG anti-Helicobacter pylori pelo método Elisa. . 60

Tabela 7. Efeito do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* sobre os níveis plasmáticos das citocinas anti e pró-inflamatórias... 61

Tabela 8. Efeito do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* sobre a produção de urease pelo *H. pylori*. 63

Tabela 9. Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* através da análise histopatológica. 65

Tabela 10. Análise fitoquímica preliminar dos extratos hidroetanólicos da entrecasca e folhas e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*). 68

LISTA DE ANEXOS

1. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.
2. Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico - expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA.
3. Certificado de conformidade com princípios éticos na experimentação animal, conforme Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA – expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT.

RESUMO

TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori IN VITRO* DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO MATO-GROSSENSE E ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori IN VIVO* DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA (DCM_2) DE *Calophyllum brasiliense* CAMB. Souza, M.C. Dissertação apresentada à Coordenação do Programas de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia. Orientador: Domingos Tabajara de Oliveira Martins, Co-Orientadora: Regilane Matos da Silva.

As plantas tem sido desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano como fontes importantes de produtos biologicamente ativos. Recentemente, esforços têm sido feitos no sentido de identificar novas drogas antiúlcerogênicas de fontes naturais, tendo como alvo principal o *Helicobacter pylori*, uma bactéria considerada como o mais importante agente etiológico da úlcera péptica humana. *Calophyllum brasiliense* Camb. tem se mostrado uma rica fonte de substâncias bioativas, sendo possuidora de propriedades antifúngica, gastroprotetora, analgésica, anti-HIV, antibacteriana, antitumoral e inibidora da H+,K+-ATPase gástrica e enzima conversora da angiotensina. O objetivo deste trabalho foi realizar uma triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro* de extratos das plantas *Hyptis suaveolens* (EM*Hs*), *Hyptis crenata* (EM*Hc*), *Strychnos pseudoquina* (EM*Sp*), *Vatairea macrocarpa* (EMV*m*), *Simaba ferruginea* (EHE*Sf*), *Lafoensia pacari* (EHE*Lp*), *Stryphnodendron obovatum* (EHE*So*) e *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*), para seleção da mais potente e ativa, com vistas ao aprofundamento dos estudos químicos e farmacológicos. Para tanto, foi realizada uma triagem utilizando os métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, onde os EM*Hc*, EHE*Sf*, EHE*So*, EHE*Lp* e EHE*Cb* apresentaram atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro*, sendo o último o mais potente e ativo. Os EM*Sp*, EM*Hs* e EM*Vm* foram inativos, em ambos os ensaios. A partir desse resultado, foram preparados extratos de diferentes polaridades da entrecasca e folhas de *C. brasiliense*, destacando-se nos ensaios anti-*Helicobacter pylori in vitro* os EHE*Cb* e EH*Cb* da entrecasca, sendo deste último obtido a fração DCM_2. A avaliação da toxicidade aguda do EHE*Cb* e DCM_2 pelo teste hipocrático em camundongos Swiss-Webster, mostrou baixa toxicidade oral para estes preparados. Nos ensaios *in vivo*, utilizando ratos Wistar ulcerados por ácido acético e inoculados com *H. pylori*, O EHE*Cb* e a fração DCM_2 reduziram a área ulcerada, sendo a DCM_2 mais ativa. As análises sorológicas para anti-*H. pylori* IgG foram negativas em todos os grupos ensaiados. As citocinas de fase aguda não apresentaram diferenças entre os grupos analisados, porém a citocina de fase crônica IL-10 estava significantemente aumentada no grupo ulcerado e infectado com *H. pylori*, demonstrando haver um processo de cronificação da úlcera. A fração DCM_2 na dose de 200 mg/kg elevou os níveis de PGE_2 indicando ação citoprotetora gástrica neste modelo animal. O EHE*Cb* e a fração DCM_2 reduziram o número de animais que apresentaram teste de urease positivo, confirmado pelo exame histopatológico, no qual foi possível observarem-se reduções na detecção do microorganismo, da inflamação, persistência

da úlcera e atividade neutrofílica., sendo que a fração DCM_2 comportou-se de modo semelhante às drogas padrão (claritromicina 25mg/kg, amoxicilina 50mg/kg e omeprazol 20mg/kg). Nas análises fitoquímicas preliminares dos EHE*Cb* e DCM_2 destacaram-se as presenças de flavonóides e xantonas, sendo que as cromanonas – ácido brasiliênsico, isobrasiliênsico e inofilóidico, isolados da fração DCM_2, figuram como potenciais compostos responsáveis, em parte, pela atividade anti-*H. pylori* e antiúlcera de *C. brasiliense*. Nossos resultados indicam que a atividade antiúlcera do EHE*Cb* e DCM_2 envolve diferentes compostos e diferentes mecanismos de ação, incluindo uma ação anti-*Hleicobacter pylori,* o que suporta o uso popular da entrecasca de *C. brasiliense* para úlceras gástricas.

Palavras-chave: *Calophyllum brasiliense*, *Helicobacter pylori*, úlceras gástricas.

ABSTRACT

SCREENING OF THE ANTI-*Helicobacter pylori* ACTIVITY *IN VITRO* OF MEDICINAL PLANTS OF THE MATO-GROSSENSE SAVANNA AND ANTI-*Helicobacter pylori* ACTIVITY *IN VIVO* OF THE EXTRACT HIDROETANOLIC AND DICLOROMETANIC (DCM_2) FRACTION OF *Calophyllum brasiliense* CAMB. Souza, M.C. Dissertation submitted to the Coordination of Post Graduation programe in Medicine of the Medical Science Faculty, Federal University of Mato Grosso, as a partial requirement to get Master Degree in Health Sciences, Pharmacology Area. Advisor: Domingos Tabajara de Oliveira Martins, Co-advisor: Regilane Matos da Silva.

Since old times plants have been a resource used by human beings as important sources of biologically active products. Recently, efforts have been made in order to identify new antiulcerogenic drugs from natural sources, having as the main target the *Helicobacter pylori*, a bacterium considered as the most important etiological agent of the human peptic ulcer. *Calophyllum brasiliense* CAMB. It has been shown to be a rich source of bioactive substances, having antifungal, gastroprotective, analgesic, anti-HIV, antibacterial, antitumoral properties and inhibitor of gastric H+,K+-ATPase and angeotensin-converting enzime. This study aims at carrying out an anti-*Helicobacter pylori in vitro* trial of plant extracts of *Hyptis suaveolens* (EM*Hs*), *Hyptis crenata* (EM*Hc*), *Strychnos pseudoquina* (EM*Sp*), *Vatairea macrocarpa* (EMV*m*), *Simaba ferruginea* (EHE*Sf*), *Lafoensia pacari* (EHE*Lp*), *Stryphnodendron obovatum* (EHE*So*) and *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*), for the selection of the most potent and active for the making of deeper chemical and pharmacological studies. For this reason, a trial using the methods of disk diffusion and microdilution in broth was done, where the EM*Hc*, EHE*Sf*, EHE*So*, EHE*Lp* and EHE*Cb* presented anti-*Helicobacter pylori activity in vitro*, being the latter the most potent and active. The EM*Sp*, EM*Hs* and EM*Vm* were inactive, in both trials. With this result, extracts of different polarities of the bark and leaves of *C. brasiliense* were prepared standing out in the anti-*Helicobacter pylori assays in vitro* the EHE*Cb* and EH*Cb* of the bark, from which the DCM_2 fraction was obtained. The evaluation of the acute toxicity of the EHE*Cb* and DCM_2 using the Hippocratic test in Swiss-Webster mice, showed low oral toxicity for these mixtures. In the *in vivo assays*, using Wistar ulcered by acetic acid and inoculated with *H. pylori*, the EHE*Cb* and the DCM_2 fraction reduced the ulcered area, being the DCM_2 more active. The serological analyses for anti-*H. pylori* IgG were negative in all the assayed groups. The cytokine of acute phase did not present any difference among the groups analyzed, however the cytokine of chronic phase IL-10 was significantly increased in the *H. pylori*, ulcered and infected group showing that there was an ulcer illness process. The DCM_2 fraction in the dose of 200mg/kg raised the levels of PGE_2 indicating gastric citoprotective action in this animal model. The EHE*Cb* and the DCM_2 fraction reduced the number of animals that presented urease positive test, confirmed by the hystopatological exam, in which it was possible to observe reductions in the detection of the microorganism, of inflammation, ulcer persistence and neutrophilic activity, being that the DCM_2 fraction behaved in a similar way to the standard drugs (clarithromycin 25mg/kg, amoxicillin 50mg/kg and omeprazole 20mg/kg). In the preliminary phytochemical analyses of

the EHE*Cb* and DCM_2 stood out in the presence of flavonoids and xanthone, being that the cromanones – brasiliensic acid, isobrasiliensic and inofiloidic - , isolated from the DCM_2 , fraction appear as potential compounds responsible, in part, by the anti-*H. pylori* and anti-ulcer of *C. brasiliense* activity. Our results indicate that the anti- ulcer activity of the EHE*Cb* and DCM_2 is due to different compounds and different mechanisms of action, which supports the popular use of the *C. brasiliense* bark for gastric ulcers.

Key words: *Calophyllum brasiliense*, *Helicobacter pylori*, gastric ulcers.

INTRODUÇÃO

1. PLANTAS MEDICINAIS

As plantas tem sido desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano. Durante milênios, o homem empiricamente aprofundou seus conhecimentos a fim de melhorar nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução. É de supor que no passado o homem quando acometido de seus males, recorria a alguma fonte de poder curativo (1).

O homem intuitivamente buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas, como nutrição, reprodução e proteção humana, gerido pela experiência e inteligência, fruto de sua própria evolução biológica para a produção de alternativas que atendessem suas necessidades. Nessa perspectiva de pesquisa natural, o homem encontrou nas chamadas plantas medicinais, virtudes, cujo valor mágico e alquimista, vem sendo transmitidos de geração a geração (1).

Durante a última década, o uso da medicina tradicional tem expandido mundialmente e vem ganhando popularidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, em 2003, cerca de 60 a 80% da população mundial não tem acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças. A própria OMS não só reconhece como também estimula o uso de plantas medicinais pela população de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. No entanto, não continua sendo usado somente nos cuidados primários à saúde dessas populações, como também em países desenvolvidos, onde a medicina convencional é predominante no sistema de cuidados da saúde nacional. Devido a essa mudança no contexto mundial, a OMS elaborou estratégias para o uso da medicina tradicional, desenvolvendo políticas para segurança, eficácia e qualidade dos produtos naturais permitindo aumento do acesso à saúde, mas resguardando o uso racional desses produtos naturais (2).

Nos últimos vinte anos no Brasil, país com a maior diversidade vegetal do mundo, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente. Isso mostra que em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais devem ser incentivadas. Afinal, elas poderiam levar à reorganização das estruturas de uso dos recursos naturais em vista da necessidade de sua extração estar associada aos planos de manejo e à elevação do PIB, visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos (3).

A OMS lançou em 2002 sua primeira estratégia de utilização da medicina tradicional, com o intuito de fortalecer o uso da medicina tradicional e auxiliar os países a desenvolver políticas nacionais para avaliação e regulação de práticas da medicina tradicional. Segundo a OMS, o mercado global de plantas medicinais está atualmente movimentando mais de 60 bilhões de dólares anualmente e está crescendo firmemente (2).

Com base nos pressupostos da OMS, o governo federal aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências pelo decreto nº 5.813, de 22 de Junho de 2006 (anexo), sendo ponto de partida para vários outros programas estaduais e municipais por todo o Brasil. Em uma Resolução anterior, RDC Nº. 48, DE 16 de março de 2004 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e dá outras providências, a ANVISA (4) dá a definição do que é considerado um fitoterápico:

> Fitoterápico - medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

Segundo Miguel (1), a partir do século XIX a humanidade se depara perplexa diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico, presente nas ditas plantas medicinais. A descoberta de substâncias ativas, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade farmacológica, muitas vezes já confirmadas pelo uso popular e comprovadas cientificamente. Neste momento passaram a gerar interesses e incentivos institucionais e governamentais.

Diversas pesquisas científicas iniciaram na tentativa de comprovar a identidade botânica, composição química e ação farmacológica das drogas vegetais, agrupando aquelas de efeito semelhante. Essas pesquisas buscam determinar as estruturas quimicamente ativas, e a promoção de modificações estruturais. Esses estudos possibilitaram a proposição de maior atividade terapêutica, junto aos requisitos de qualidade e ausência de toxicidade (1).

Enfim, as plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. (5) e encontrar uma molécula importante, com propriedade de um fármaco em potencial, é quase como procurar uma agulha no deserto. Este e outros motivos levaram muitas indústrias farmacêuticas e os cientistas a procurarem moléculas protótipos nas plantas medicinais, que possuem uma informação histórica importante, tendo como base da medicina popular/tradicional (6).

O emprego correto de plantas para fins terapêuticos pela população, requer o uso de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêuticas, baseadas na tradição popular ou cientificamente validadas como medicinais (5).

1.1 Característica da área de estudo: Bioma Cerrado

O Cerrado ocupa uma área de aproximadamente 204 milhões de hectares, equivalente a 22% do território nacional **(Figura 1)**. O clima caracteriza-se por duas estações bem definidas, uma seca (de maio a setembro) e outra chuvosa. A precipitação média anual fica em torno de 1500 mm, variando para mais ou para menos em regiões de transição para outros biomas. São freqüentes períodos de estiagem, denominados veranicos, no meio da estação chuvosa. A temperatura média apresenta pequena variação ao longo do ano, mas há uma amplitude diária de mais de 15 °C. Dependendo da região dentro do Cerrado, a temperatura média anual varia de 21 a 27 °C (7)

Figura 1. Biomas brasileiros, com destaque para o Cerrado (em verde). Fonte: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_23_911200585232.html, em 28/08/2008

O Cerrado típico é constituído por árvores relativamente baixas (até vinte metros), esparsas, disseminadas em meio a arbustos, subarbustos e uma vegetação baixa constituída, em geral, por gramíneas. Assim, o Cerrado contém basicamente dois estratos: um superior formado por árvores e arbustos dotados de raízes profundas que lhes permitem atingir o lençol freático, situado entre 15 a 20 metros; e um inferior composto por um tapete de gramíneas de aspecto rasteiro, com raízes pouco profundas, no qual a intensidade luminosa que as atinge é alta, em relação ao espaçamento (7).

A típica vegetação que ocorre no Cerrado possui seus troncos tortuosos, de baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas. Os estudos efetuados consideram que a vegetação nativa do Cerrado não apresenta essa característica pela falta de água – pois, ali se encontra uma grande e densa rede hídrica – mas sim, devido a outros fatores edáficos (de solo), como o desequilíbrio no teor de micronutrientes, a exemplo do alumínio (7).

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas, riquíssima flora com mais de 10.000 espécies de plantas, com 4.400 endêmicas (exclusivas) dessa área. Ainda incompletamente conhecida, a flora do Cerrado é riquíssima, tomando uma atitude conservadora, poderíamos estimar a flora do bioma do Cerrado como sendo constituída por cerca de 3.000 espécies, sendo 1.000 delas do estrato arbóreo-arbustivo e 2.000 do herbáceo-subarbustivo (8).

Um dos gêneros que vem despertando grande interesse na comunidade científica, devido aos promissores resultados químicos e biológicos, é o *Calophyllum* (Clusiaceae). Este gênero é composto por grande grupo de árvores tropicais, com aproximadamente 180-200 espécies restritas aos trópicos quentes e úmidos, sendo algumas espécies de ocorrência predominante no Brasil, como por exemplo, a *Calophyllum brasiliense* Camb. Essa espécie é nativa de matas ciliares em domínio de Cerrado, adaptada a solos ácidos, com baixa fertilidade e elevado teor de alumínio, onde apresentam boa sobrevivência, destacando-se em crescimento e cobertura (9).

1.2 *Calophyllum brasiliense* Camb.

1.2.1 Aspectos botânicos

Sua distribuição é bastante ampla (neotropical), ocorrendo desde a América Central até às Antilhas (10) **(Figura 2).**

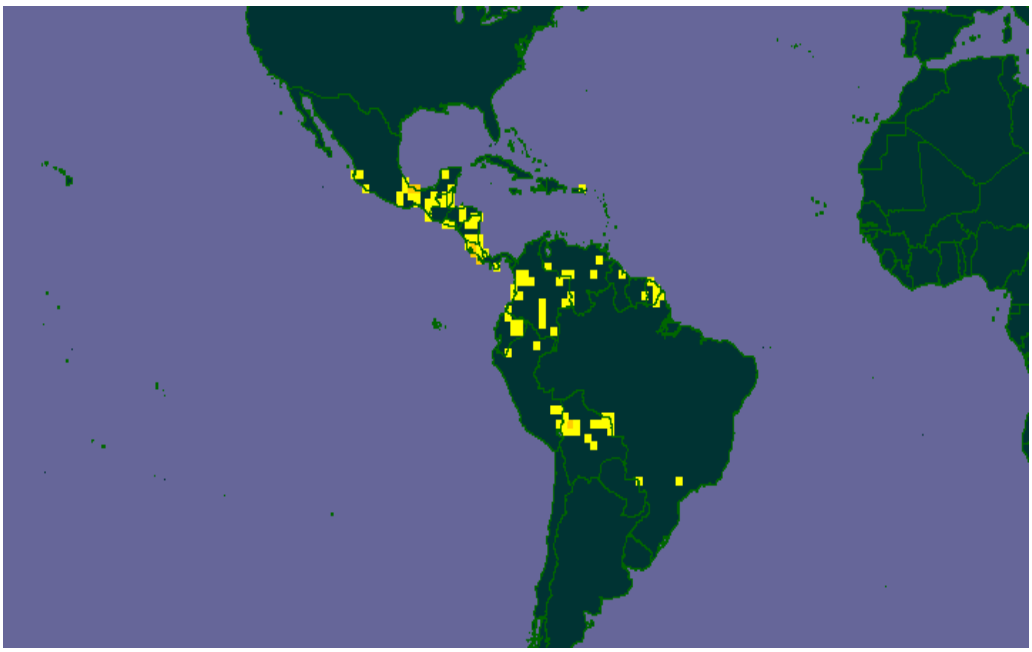


Figura 2. Distribuição Geográfica do *Calophyllun brasiliense*. Fonte: http://www.hondurassilvestre.com/query/Plantae.asp?tsn=21479, em 28/08/2008.

Na Amazônia, é freqüente nas várzeas e igapós, aparece ainda na Floresta Atlântica, no Cerrado, Restinga e Matas do Brasil Central (10) **(Figura 3)**. Em Mato Grosso é encontrada nas matas ciliares do Cerrado e do Pantanal mato-grossense, com porte mediano (11).

Figura 3. Mapa com locais identificados de ocorrência natural de *Calophyllum brasiliense* no Brasil. Fonte: EMBRAPA (12).

É uma espécie heliófita ou de luz difusa, caracterizada e exclusiva das florestas pluviais localizadas sobre solos úmidos e brejosos. É encontrada tanto em floresta primária densa como em vários estágios da sucessão secundária, como capoeiras e capoeirões. Sua dispersão é ampla, porém descontínua; ocorre geralmente em grandes agrupamentos que por vezes chega a formar populações homogêneas. É capaz de crescer praticamente dentro da água e até em áreas de mangue, produz quase todos os anos grande quantidade de sementes viáveis e floresce durante os meses de setembro a novembro e a maturação dos frutos ocorre de abril a junho (13 , 14).

C. brasiliense apresenta-se como árvore frondosa, ornamental, caule reto e cilindrico, com ramos grossos, casca dura, parda, grossa, caracterizada pelas fissuras longas, largas e fusiformes. Libera um látex amarelo e goma-resina também da mesma cor, aromática e amarga. Folhas opostas, simples, glabras, elípticas ou ablongas ou ainda ablongolanceoladas,

brilhosas em ambas as faces, 6 a 10 x 2 a 6 cm, com numerosas nervuras. Flores alvas, pequenas, aromáticas, dispostas em círculos trifloras que formam curtos racemos axilares. Frutos drupa, globosa, dura quando seca, alveolada, de 1 a 1,5cm de diâmetro, ricos em goma-resina amarela, encerrando semente única (10).

C. brasiliense é conhecida popularmente como guanandi, guandi, mangue, galandim, gualambi, guanandi-carvalho, guandi-carvalho, guanandi-cedro, guarandi, gulande-carvalho, jacareúba, landim, olandi, olandim, pau-de-mangue. *C. brasiliense* é uma árvore alta e frondosa, chegando a atingir 20-40m de altura e 0,6-1,5m de diâmetro (15) (**Figura 4).**

Em termos científicos, *Calophyllum* significa folha bonita. Assim, temos como tradução livre para o Guanandi: "Folha bonita do Brasil". Este nome popular, Guanandi, em Tupi-Guarani, vem de *gwanãdi* e significa "aquilo que é grudento" por causa da goma-resina que produz (16).

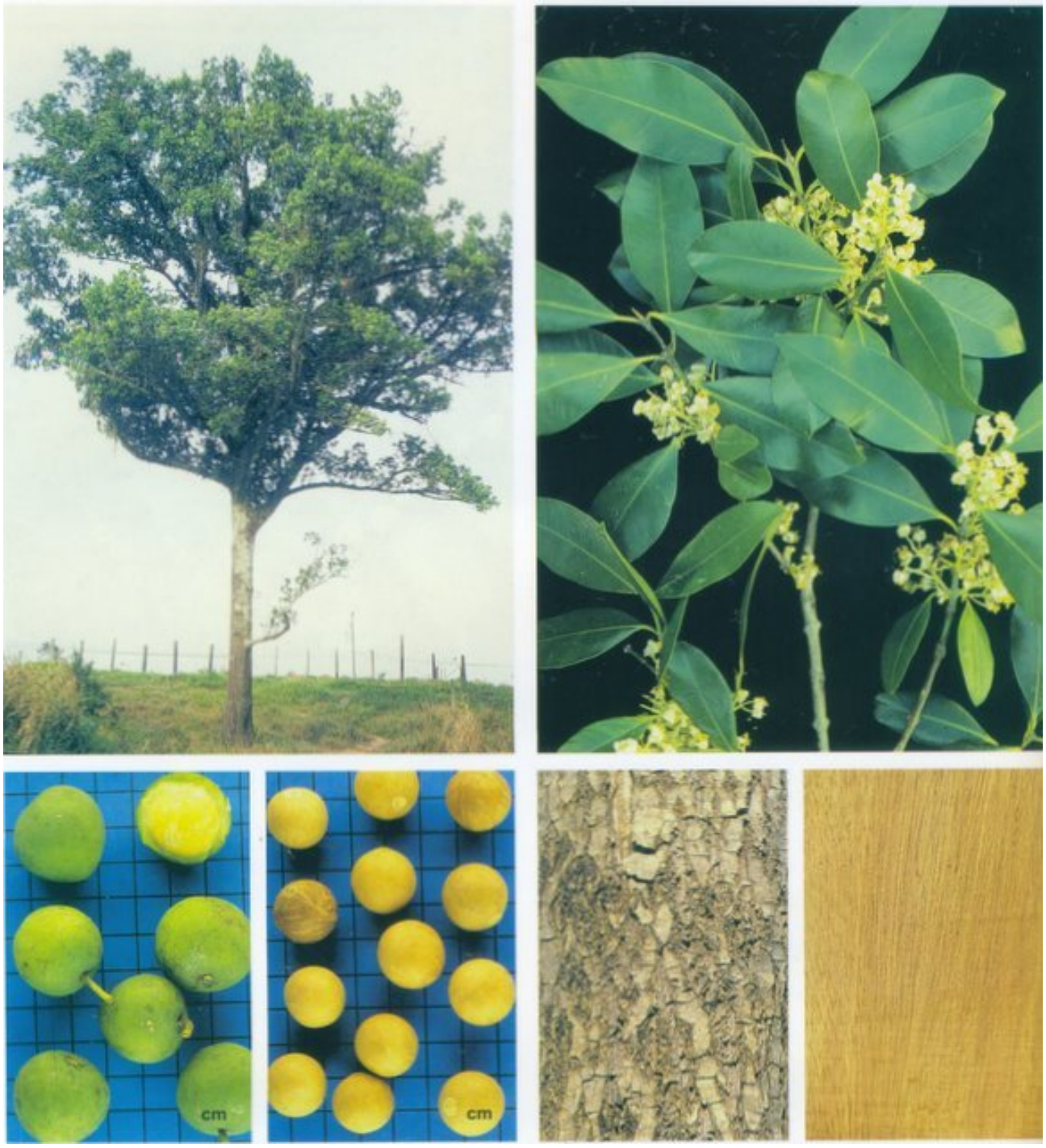


Figura 4. Árvore adulta de *Calophyllum brasiliense*. Em destaque: folhas, flores, frutos maduros, sementes, casca e madeira. Fonte: Lorenzi (13).

1.3 Usos populares

É utilizado na apicultura e como forrageira. O fruto é comestível e serve de alimento para porcos, morcegos e peixes. Da casca de *C. brasiliense*, obtém-se o “bálsamo de landim” ou “bálsamo de jacareúba” usado contra úlceras e tumores. O emplasto de látex é usado contra hérnias, mas seu látex irrita e mancha a pele. A semente tem óleo industrializável, a madeira é boa, de cor bege, cerne pouco distinto do alburno, densidade da ordem de 650 kg/m3 de madeira seca, boa de se trabalhar, recomendada para tábuas, construção civil e naval, carpintaria e para tornearia ou tonéis, barris para vinho, móveis, decoração. O governo Imperial reservou para o Estado o monopólio de exploração dessa madeira em 1810, para uso exclusivo na confecção de mastros e vergas de navios, sendo considerada a primeira madeira de lei do País (13). Além da produção de madeira, o guanandi é indicado para obtenção de resina com propriedades medicinais com uso veterinário, na forma de emplastro para relaxamento dos tendões em eqüinos (17).

A árvore pode ser utilizada em projetos paisagísticos de parques e praças, bem como em reflorestamento para recuperação ambiental, especialmente em áreas de solo encharcado (13 , 142) **(Figura 5).**

A palavra Guanandi deriva do tupy "o que é grudento", em função do látex amarelo da casca, conhecido como jacareubina, e que possui usos na medicina tradicional da América Latina para tratar uma variedade de moléstias, incluindo dor, inflamação, diabetes, hipertensão, herpes, reumatismo (18). O chá das folhas e da entrecasca é usado como antiinflamatório e contra varizes e hemorróidas, mas seu principal uso tem sido para tratar distúrbios gástricos e hepáticos (11).

Figura 5. Produção de mudas de *Calophyllum brasiliense*. Fonte: http://www.reflorestar.com.br/producao.htm, em 28/08/2008.

1.4 Aspectos químicos e farmacológicos

As plantas do gênero *Calophyllum* tem sido uma rica fonte de substâncias bioativas, incluindo cumarinas, xantonas, esteróides, triterpenos e biflavanóides, chalconas, benzofuranos (19, 20). Dentre os compostos químicos isolados da espécie *C. brasiliense*, destacam-se as xantonas: brasixantona A, guanandina, jacareubina e 6-desoxijacareubina e as cumarinas denominadas de calanolídeos A, B e C, soulatrolídeo e mammea A/BA (21).

Vários estudos químicos têm sido descritos na literatura para *C. brasiliense* **(Quadro 1)**. Em 1953, King & King (22) isolaram a jacareubina e uma piroxantona da entrecasca.

Em 1966, Pereira et al. (23) isolaram a friedelina, guanandina, isoguanandina, β-sitosterol, jacareubina, 6-desidroxijacareubina, 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, 1,7-dihidroxi-3-metoxixantona, gentisina e 4-hidroxixantona do extrato benzênico do lenho. Em1967, Pereira et al. isolou do mesmo material, a dehidrocicloguanandina e a 1,3-dihidroxi-5-metoxixantona. (24).

Em 1968, Stout et al.(25) isolaram os ácidos brasiliênsico, isobrasiliênsico e inofiloídico da resina da casca. Gotlieb et al. (26) elucidaram em 1968 as estruturas da 6-dehidroxijacareubina, da guanandina [1,5-dihidroxi-6-(3´,3´-dimetilalil) xantona], isoguanandina [4,8-dihidroxi-1-(3´3´-dimetilalil) xantona] e dehidroxicloguanandina, isoladas do extrato hexânico do lenho. Do óleo das sementes, foram isolados seis ácidos carboxílicos homólogos, sendo os três ácidos da série trans obtidos em maior quantidade os ácidos isoapetálico, bancóico.

Lima et al., em 1994 (27) relataram as presenças de taninos, saponinas, triterpenos, xantonas, auronas e chalconas no extrato metanólico da entrecasca do caule da espécie coletada em Mato Grosso. Este extrato apresentou atividade antiúlcera em modelos de úlcera gástrica por etanol e por ligação pilórica, analgesia periférica, baixa toxicidade oral e ausência de atividade sobre o trânsito intestinal em animais de laboratório (28).

Na Costa Rica, da resina da casca, foram isolados os ácidos brasiliênsico e isobrasiliênsico (19 ,10). Em 2008, Canepelle et al. (29) isolaram da fração diclorometânica (DCM_2) do extrato hexânico da entrecasca de *C. brasiliense* as três cromanonas: ácido inofilóidico, ácido brasiliênsico e ácido isobrasiliênsico **(Figura 6).**

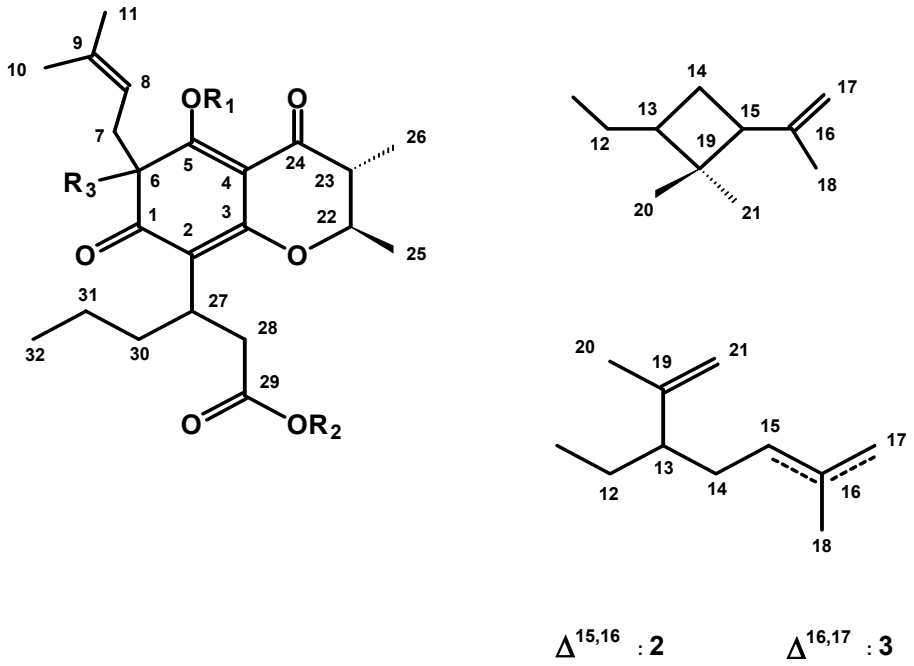


Figura 6. Estruturas químicas das cromanonas isoladas de *Calophyllum brasiliense*: ácido inofiloídico: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = 1; ácido isobrasiliênsico: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = 2 e ácido brasiliênsico: R_1 = H, R_2 = H, R_3 = 3.

Em diversos trabalhos, *C. brasiliense* mostra possuir compostos que tem atividade antifúngica (30), na gastroproteção (31, 32), analgésica (33) propriedade anti-HIV inibindo a transcriptase reversa (34), atividade tripanocida (37), atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas (35, 36), atua inibindo a H+,K+-ATPase gástrica (18), atividade antitumoral (38, 39, 20), atividade anti-leishmania (40), inibição da enzima conversora de angiotensina (41).

O extrato metanólico da entrecasca de *C. brasiliense* foi extrememente potente em atenuar lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Os extratos hexânico e diclorometânico da entrecasca também foram ativos contra estes modelos de úlcera, tendo maior atividade o extrato hexânico. O subseqüente fracionamento do extrato hexânico revelou a atividade máxima antiúlcera da fração DCM_2 (31).

A fração diclorometânica (DCM_2) do extrato hexânico de *C. brasiliense* não apresenta alteração no trânsito gastrintestinal em camundongos e não produz efeito tóxico aparente em ratos, sem apresentação de alterações significativas no ganho de peso, consumo de água e ração (31).

Quadro 1. Compostos químicos isolados de *Calophyllum brasiliense*.

Grupos químicos	Compostos isolados	Farmacógeno	Referência
Piroxantona	Jacareubina	Entrecasca	King & King (22)
	friedelina, guanandina, isoguanandina, β-sitosterol, jacareubina, 6-desidroxijacareubina, 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, 1,7-dihidroxi-3-metoxixantona, gentisina e 4-hidroxixantona	Entrecasca	Pereira et al (23)
	Dehidrocicloguanandina e a 1,3-dihidroxi-5-metoxixantona	Entrecasca	Pereira et al (24)
Cromamonas	ácidos brasiliênsico, isobrasiliênsico e inofiloídico	Resina da entrecasca	Stout et al (25)
		Entrecasca	Canepelle (29)
Xantonas	6-dehidroxijacareubina, da guanandina [1,5-dihidroxi-6-(3´,3´-dimetilalil) xantona], isoguanandina [4,8-dihidroxi-1-(3´3´-dimetilalil) xantona] e dehidroxicloguanandina	Lenho	Gotlieb et al. (26)
	brasixantonas A-G 1,2-dimetoxixantona	Galhos, flores e frutos	Ito et al. (20)
	1,5-diidroxixantona	Caules, galhos, flores e frutos	Pretto et al. (25)
	toxiloxantona	Folhas, flores, frutos e raízes	Noldin et al (42)
Ácidos carboxílicos	ácidos isoapetálico e blancóico	Óleo das sementes	Plattner et al (43)
Compostos fenólicos	ácido gálico, protocatélico e epicatequina	Caules, galhos, flores e frutos	Pretto et al (35)
	quercetina	Folhas	Silva et al. (33)
Cumarinas	brasimarinas A-C	Galhos, flores e frutos	Ito et al. (20)
	calanolídeos A-C	Folhas	Huerta-Reyes et al. (34)
	mammeas A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F, C/AO, C/OB	Folhas	Reyes-Chilpa et al. (18)
	5-metoxi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-oxo-2-butenil) -10- propil-2H,8H-benzo-[1,2-b;3,4-b']-dipiran-8-ona	Partes aéreas	Kimura et al. (39)
	soulatrolídeo	Folhas, flores, frutos e raízes	Noldin et al. (42)

2. *Helicobacter pylori*

2.1 Características microbiológicas

O *Helicobacter pylori* foi identificado em 1982 por Marshall & Warren (44) e rapidamente se tornou alvo de incontáveis estudos microbiológicos, histológicos, epidemiológicos, imunológicos, ecológicos e clínicos (45). Este microrganismo teve sua nomenclatura revisada, iniciando com *Campylobacter pyloridis*, e por uma correção do nome que originalmente era grega para a latina, *Campylobacter pylori* (46) e organismos como *Campylobacter*. Estudos taxonômicos levaram a reclassificação, resultando no nome *Helicobacter pylori* (47).

O *H. pylori* é um bacilo, Gram negativo, microaerófilo, curvo e espiralado (44,45,48,49). Tem de dois a seis flagelos que oferecem a ele motilidade para resistir às contrações rítmicas gástricas e penetrar a mucosa gástrica. Tem de 2,4 a 4,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura (50).

O principal reservatório para infecção por *H. pylori* parece ser o estômago humano, principalmente o antro. Embora não colonize áreas do estômago na qual a metaplasia intestinal ou dispepsia esteja presente. O *H. pylori* contém uma grande enzima protéica urease que reduz uréia em amônia que capacita o microorganismo a sobreviver no estômago ácido por criar um ambiente alcalino (50).

O *H. pylori* produz um número de fatores de virulência que podem ter diferentes associações à doença. O estabelecimento da infecção crônica pode ser influenciado por fatores genéticos do hospedeiro assim como o grupo sanguíneo ABO e antígeno do grupo sanguíneo Lewis e por diferenças na susceptibilidade a cepas particulares de *H. pylori* (50).

2.2 Epidemiologia da infecção pelo *H. pylori*

A infecção causada por *H. pylori* é muito comum e afeta aproximadamente metade de população mundial, sendo mais frequentemente adquirida na infância em países em desenvolvimento (51, 52, 53, 54, 55, 56, 57). Segundo a OMS (69), 550.000 novos casos por ano de câncer de estômago são atribuídos à bactéria *H. pylori*, que pode ser transmitida pelos alimentos. Respondendo por aproximadamente 55% dos casos de câncer mundialmente.

O baixo nível socioeconômico e suas conseqüências naturais, como condições de higiene precárias, aglomeração nas moradias e ausência ou deficiência de saneamento básico, são fatores que favorecem a aquisição da bactéria, sendo considerados atualmente os principais marcadores da presença de infecção pelo *H. pylori* (52, 50, 58).

Uma grande quantidade de estudos tem usado questionários para investigar fatores possivelmente relacionados com a etiologia da infecção por este agente. A maioria dos estudos recentes, não tem encontrado o uso de tabaco ou consumo de álcool como sendo fatores de risco para a infecção pelo *H. pylori*. A situação nutricional adequada, especialmente o consumo freqüente de frutas e vegetais e de vitamina C, parece proteger contra a infecção por *H. pylori*. Em contraste, comida preparada sob condições abaixo do ideal ou expostas à água contaminada podem aumentar o risco (50).

Em países em desenvolvimento, 70 a 90% da população colonizam *H. pylori*, quase todos destes adquiriram a infecção antes de atingirem os 10 anos, em países desenvolvidos a prevalência da infecção é mais baixa, com uma variação de 25 a 50% (48) (**Figura 7)**.

Alguns estudos sugerem que a prevalência da infecção por *H. pylori* é mais alta em grupos fechados e em membros de grupos familiares, onde a infecção de crianças pode estar relacionada diretamente com a positividade dos pais e a situação familiar (59, 60, 61, 62, 63). Isso justifica em parte o porquê de a infecção do *H. pylori* seja adquirida principalmente na infância e aumenta com o avanço da idade, é alta em países em desenvolvimento e em populações com baixos níveis socioeconômicos, provavelmente devido a condições como higiene precária, superpopulação e ausência ou deficiência sanitária, pois, de acordo com vários autores, condições sanitárias básicas precárias tem sido um fator de risco na aquisição de infecção por *H. pylori* (52, 50, 58). Um declínio na prevalência da infecção por *H. pylori* e suas doenças associadas estão em curso em países desenvolvidos, enquanto que essa infecção

permanece muito comum em países em desenvolvimento, situação na qual inclui a maioria da população mundial e a maioria das doenças ligadas à infecção pelo microrganismo (64).

O ser humano é o principal reservatório do *H. pylori* (60), embora estudos tenham relatado sua presença em primatas não humanos e em animais domésticos como gatos, cães e aves, sugerindo que este microrganismo possa ser um patógeno zoonótico, porém ainda faltam evidências concretas para suportar esta via de transmissão (65).

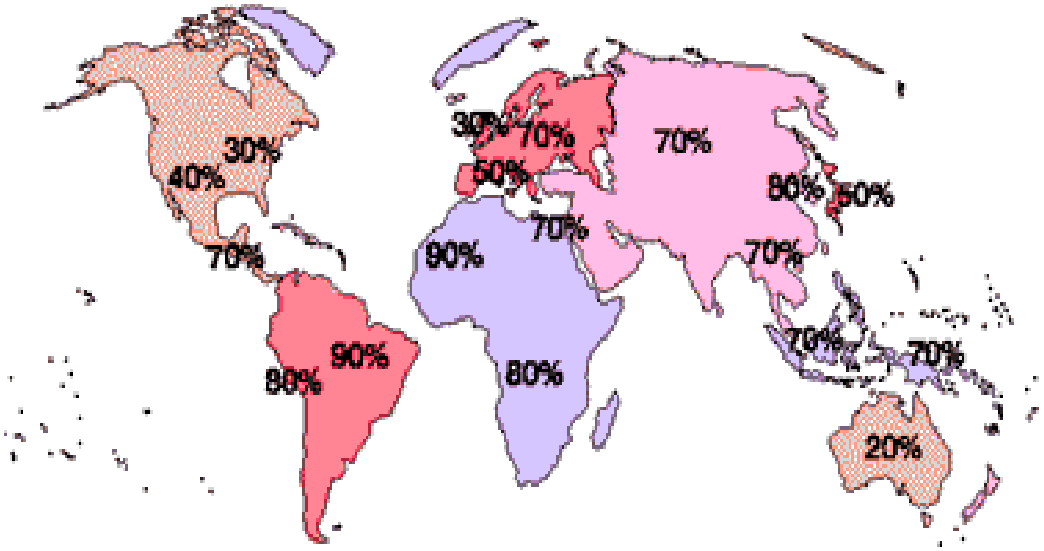


Figura 7. Prevalência mundial da infecção pelo *Helicobacter pylori.* Fonte: The Helicobacter Foundation - http://www.helico.com**,** em 28/08/2008.

2.3 Rotas de transmissão do *H. pylori*

O modo de transmissão do *H. pylori* permanece muito pouco entendido, nenhuma via única tem sido claramente identificada. O contato pessoa a pessoa é considerado a mais provável rota de transmissão (59, 60, 61, 62, 64, 66), porém, a infecção por água contaminada também tem sido sugerida, principalmente nas populações servidas por água municipal. A transmissão via consumo de vegetais não cozidos, pois podem ser contaminados pela água durante a irrigação ou durante a lavagem para o consumo (65, 67) bem como a transmissão zoonótica que também tem sido sugerida (50, 68).

2.3.1 Pessoa a pessoa

2.3.1.1 Populações institucionalizadas

Brown (50) levantou várias investigações sobre a prevalência da infecção por *H. pylori* em instituições de tratamento médico e mental para crianças e adultos. Os dados apontam para taxas significantemente mais altas da infecção entre os residentes desses ambientes, onde a possível rota de transmissão inclui secreções salivares ou contaminação fecal-oral, permanecendo a principal hipótese de que a maioria das infecções por *H. pylori* seja transmitida de pessoa a pessoa.

2.3.1.2 Exposição familiar

Vários estudos têm avaliado a transmissão da infecção pelo *H. pylori* dentro do grupo familiar, tendo em vista a aquisição deste agente principalmente durante a infância. Mães ou irmãos infectados têm um papel principal na transmissão da infecção, o que sugere que a relação pessoa a pessoa como o mais importante modo de transmitir a infecção. (59, 61, 62 70, 71). Perez-Perez et al (60) pesquisaram a soroprevalência da infecção pelo *H. pylori* entre casais, e sugereriu que a transmissão sexual não seja a rota predominante para a infecção pelo *H. pylori*, mas não descarta esta via.

2.3.1.3 Rota oral-oral

Muitos cientistas têm hipotetizado que a rota oral-oral da transmissão do *H. pylori* seja muito provável, especialmente nos países desenvolvidos. A elevada prevalência do *H. pylori* dentro de populações institucionalizadas e familiares suporta essa via de transmissão (50). O *H. pylori* é capaz de formar biofilme e colonizar placas dentárias, mas apresar desta capacidade, não é possível afirmar e até mesmo indicar a viabilidade ou transmissibilidade do

microorganismo por esta via. A transmissão por regurgitação gástrica tem sido sugerida por diversos autores (50, 64, 72).

2.3.1.4 Rota fecal-oral

A detecção de *H. pylori* em fezes humanas suporta a evidência de possível transmissão fecal-oral. Vários autores sugeriram que as taxas de infecção por *H. pylori* poderiam estar relacionadas com as taxas de infecção pelo Vírus da Hepatite A (HAV), um marcador para a transmissão de agentes infecciosos por contaminação fecal-oral, o que sugere uma mesma via de transmissão (60, 67, 73, 74) Vários autores encontraram paralelismo entre a infecção pelo *H. pylori* e pelo HAV, principalmente nos países em desenvolvimento (72, 67, 73, 74), porém a não correlação também tem sido encontrada, onde a prevalência de HAV tem sido maior do que a de *H. pylori* (63, 75, 76, 77).

2.3.1.5 Iatrogênica

A transmissão iatrogênica é uma via menos comum de transmissão do *H. pylori*, onde tubos endoscópios ou espécimes em contato com a mucosa gástrica de pessoas são introduzidos em outras pessoas, e a desinfecção apropriada de endoscópios tem reduzido a incidência de infecção por esta via de transmissão (48, 50, 78, 79). Estima-se que a freqüência de transmissão seja de aproximadamente 4 em 1000 endoscopias, quando a taxa de infecção da população que passam por endoscopias seja de 60% (78).

2.3.2 Transmissão hídrica

Segundo a OMS (69), doenças transmitidas pela água têm sido estimadas por causar anualmente mais do que dois milhões de mortes e quatro bilhões de casos de diarréia. Tem sido demonstrado que o *H. pylori* pode viver por vários dias em leite e água de torneira na forma bacilar infecciosa e em águas de rios por vários meses na forma cocóide (50). Embora

pesquisadores tenham tido dificuldade em cultivar formas cocóides e tenham falhado ao tentar converter para a forma bacilar, a transmissão através da água pode ser uma importante via de transmissão, especialmente nas áreas do mundo onde há altas taxas da infecção pelo *H. pylori* e menor qualidade da água do que o adequado para o consumo humano. (50, 55, 68, 80).

2.3.3 Transmissão zoonótica

Embora o principal reservatório para o *H. pylori* seja o estômago humano, o *H. pylori* tem sido isolado de primatas não humanos (50, 65, 68, 81), gatos (50, 68, 82) cães domésticos (82, 83) e aves (50). Porém essa possível transmissão via zoonótica tem recebido pouca atenção, por apresentar evidências limitadas e conclusões inconsistentes (68).

2.4 Patologia

Segundo Blaser (84) os humanos e nossos ancestrais têm, há muito tempo, sido colonizados por um grande número de diferentes micróbios, existindo evidências de que o *H. pylori* deveria estar incluído entre estes microorganismos. Microbiologistas do século 19 consideravam esses microorganismos como comensais, mas desde sua descoberta por Marshall e Warren (44), a maioria dos investigadores acredita que sejam estritamente parasitas.

A questão da patogenicidade é determinada se o micróbio causa doença ou é meramente um colonizador, sendo a doença definida como injúria tecidual e/ou manifestações clínicas. Uma probabilidade intermediária é que o *H. pylori* tem ambas as características, simbiótica e patogênica (85).

Muitas evidências indicam que o *H. pylori* seja usualmente adquirido no início da vida e persiste por décadas ou por toda a vida da maioria das pessoas, desde que não sejam tratadas (85). O *H. pylori* é provavelmente o agente causal de infecção bacteriana mais comum mundialmente, onde a maioria dos pacientes levam a vida toda com uma gastrite crônica superficial. Apesar da inflamação gástrica induzida pelo *H. pylori*, ele pode não causar

sintomas na maioria das pessoas infectadas, mas está associado com aumento de risco para desenvolvimento de úlcera duodenal, úlcera gástrica, adenocarcinoma gástrico e linfoma gástrico (86, 87, 88). Em uma pequena porção, a reação linfóide à infecção pelo *H. pylori* parece prosseguir e se tornar um linfoma MALT (tecido linfóide associado à mucosa), enquanto que em outros a incidência sugere que a gastrite superficial crônica progrida para atrofia e perda da capacidade secretora ácida gástrica e o desenvolvimento de câncer gástrico (90).

O resultado clínico de uma infecção por esse microorganismo é determinado por fatores como a idade de aquisição, meio ambiente, fatores do hospedeiro e heterogeneidade genética bacteriana (89).

Para estabelecer e manter a infecção, o *H. pylori* expressa uma variedade de diferentes tipos de fatores de manutenção, que permitem que a bactéria colonize e permaneça dentro do hospedeiro, bem como fatores de virulência, que contribuim para os efeitos patogênicos da bactéria, com destaque para inflamação gástrica, rompimento da barreira da mucosa gástrica e alterações da fisiologia gástrica (48).

A colonização do *H. pylori* é facilitada pela resistência ao ácido clorídrico, que é de vital importância na sua patogênese, visto que, sem esse atributo biológico, a bactéria não teria condições de colonizar a mucosa gástrica. A enzima urease é a responsável por dar essas condições, ao atuar promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia e atuando como receptor de íons H^+, gerando pH neutro no interior da bactéria, o que confere ao *H. pylori* resistência à acidez gástrica. Após estabelecer o clima favorável, os microrganismos ativamente móveis pela presença de flagelos, atravessam o muco gástrico e aderem às células epiteliais (**Figura 8)**. A lesão tecidual localizada é mediada por subprodutos da urease, mucinase e atividade da citotoxina, que induzem lesão das células epiteliais e, juntamente com a urease e o lipopolissacáride (LPS) bacteriano (atividade inflamatória mais baixa do que outras bactérias gram-negativas) e peptidoglicano, estimulam a resposta inflamatória. O *H. pylori* é protegido da fagocitose e destruição intracelulares pela produção de outras enzimas, sintetizadas pela bactéria, tais como superóxido dismutase, catalase e arginase, que conferem proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (91).

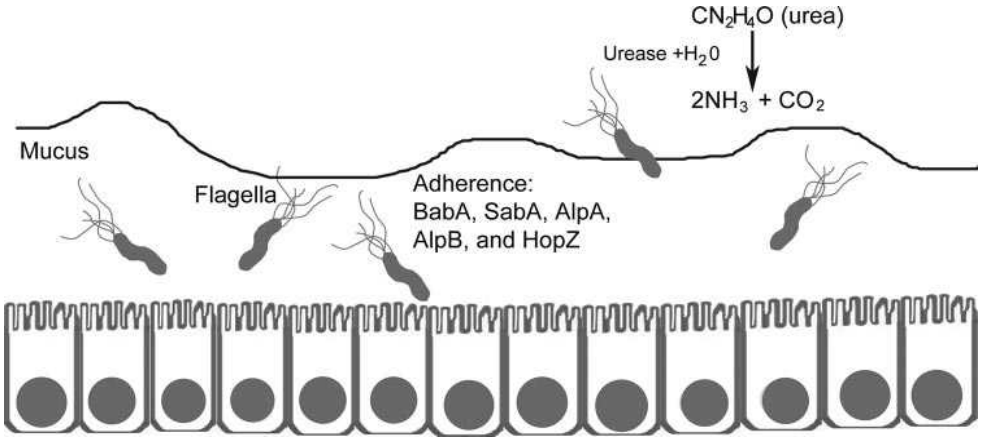


Figura 8. Fatores de colonização do *Helicobacter pylori*. Múltiplos fatores bacterianos contribuem para a habilidade do *H. pylori* em colonizar o estômago. Urease contribui para a resistência ácida do *H. pylori*. Os flagelos permitem a motilidade bacteriana, que possibilita a penetração bacteriana na camada de muco. Várias outras proteínas de membrana podem mediar a aderência bacteriana às células epiteliais gástricas. Fonte: Algood HMS et al. 2006 (86).

O *H. pylori* é uma bactéria altamente diversificada geneticamente, apresentando vários genótipos que tem sido associado com fatores de virulência e risco à doença gástrica e os demais desfechos da infecção. Entre esses, o gene vacA, que codifica uma citotoxina de vacuolização, está presente em todos os tipos de *H. pylori*. Este gene está também fortemente associado com altos níveis de inflamação e danos epiteliais na mucosa gástrica. O gene cagA é um marcador da presença de patogenicidade PAI (ilha de patogenicidade cag) (55).

Vários genes de cag PAI codificam proteínas que aumentam a produção de interleucinas pró-inflamatórias como interleucina 1-beta (IL-1β) e interleucina-8 (IL-8) pelo epitélio gástrico: esses genes estão fortemente associados ao risco para o desenvolvimento de câncer gástrico (55).

O gene cagE, que é o fator de virulência associado com *H. pylori* induz úlcera duodenal em crianças (55).

O gene iceA (induzido pelo contato com o epitélio), recentemente descrito, tem sua expressão regulada pelo contato do *H. pylori* com as células epiteliais da mucosa gástrica. O gene HP-NAP, (proteína de ativação de neutrófilos), induz aderência de neutrófilos às células

endoteliais e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos neutrófilos (55).

Tem sido demonstrada a presença de várias proteínas de membrana, que fazem parte de uma grande família que atuam na adesão do *H. pylori* às células epiteliais e essas incluem BabA (adesina ligada ao antígeno do grupo sanguíneo); SabA (adesina ligada ao ácido siálico), HpaA (adesina A do *Helicobacter pylori*) que é uma lipoproteína localizada superficialmente é essencial para a colonização em camundongos e dupA que tem sido descrito como um marcador para úlcera duodenal (54).

Os fatores genéticos do hospedeiro podem afetar a colonização e o desenvolvimento de doenças causadas pelo *Helicobacter pylori*, através de sua resposta imune (54).

Em estudos prévios, infecções com diferentes tipos de *Helicobacter*, como *H. mustelar*, *H. felis*, e *H. heilmanii*, assim como *H. pylori* em ratos, gatos, porcos, macacos e gerbis foram descritos sugerindo sua relevância para infecção em humano, mas esses modelos animais não mimetizam a infecção pelo *H. pylori* em humanos por causa da falta de fatores de virulência de organismos infectantes, tais como citotoxinas codificadas vacA e cagA, requeridas para o dano da mucosa, inflamação e formação de úlcera (92). Além disso, alguns desses animais são grandes e de difícil manuseio, existindo a necessidade de testar modelos em animais comumente usados, tais como ratos, o que permitiria estudar vários aspectos da infecção pelo *H. pylori*, cicatrização de úlcera e terapia da infecção (93).

Resultados em estudos experimentais com modelos animais utilizando roedores, conclui que o *H. pylori* sozinho causa pequeno ou nenhum efeito na mucosa gástrica intacta de ratos. Porém esse microrganismo pode causar persistência de úlceras pré-existentes, com inflamação crônica ativa. Presença de fatores de predisposição levando ao rompimento da integridade da mucosa gástrica pode ser necessária para que o *H. pylori* realce a inflamação e danos teciduais ao estômago desses animais (92).

2.5 Imunologia

Os humanos ingerem muitos microorganismos a cada dia, mas a maioria não tem sucesso em colonizar o estômago. Uma das mais importantes propriedades antibacterianas do

estômago humano é seu pH ácido. Em jejum, o pH luminal gástrico é <2, o qual previne a proliferação de bactérias dentro do lúmen gástrico. Dentro da camada do muco gástrico, acima das células epiteliais gástricas, existe um gradiente de pH, que varia de aproximadamente 2 na superfície luminal para um pH entre 5 e 6 na superfície do epitélio celular (94, 95, 96).

Depois de entrar no estômago, o *H. pylori* penetra a camada de muco gástrico, onde a bactéria precisa de motilidade e orientação espacial para escapar de ser transportado para o lúmen, atravessar o muco gástrico e assim encontrar um ambiente menos ácido do que o que estava presente no lúmen (86, 97).

O *H. pylori* normalmente não atravessa a barreira epitelial. Por isto é classificado como um organismo bacteriano não invasivo. Dentro da camada de muco gástrico, a maioria dos *H. pylori* é de vida livre, mas alguns organismos se prendem à superfície apical das células epiteliais gástricas e podem ocasionalmente ser internalizados por essas células (86, 98, 99).

A persistência da infecção por anos ou até décadas é um marcador central da interação entre o *H. pylori* e humanos não tratados. Como existe inflamação gástrica associada, a resposta imune ao *H. pylori* pode desempenhar um importante papel na patogênese (100). A infecção por *H. pylori* induz uma forte e complexa resposta imune na mucosa gástrica, tanto humoral quanto celular. No entanto essa resposta falha em diminuir a infecção e pode ainda contribuir para a imunopatologia (101).

A resposta imune ao patógeno bacteriano pode ser dividida em resposta inata e adaptativa. A resposta inata à infecção bacteriana é geralmente um processo inicial não específico, que reage rapidamente com várias moléculas bacterianas para sinalizar perigos infecciosos e com o objetivo de matar a bactéria. Em contraste, a resposta imune adaptativa é retardada, antígeno-específica, leva à ativação de células T e B (101).

A resposta imune inata contra a infecção depende do reconhecimento de estruturas antigênicas e/ou do padrão molecular associado ao patógeno (PAMP). Esses PAMPs incluem componentes microbianos assim como, LPS, peptidoglicano, flagelinas, e outros fatores apresentados pelo *H. pylori* (100, 102). Os receptores das células imunes inata, como por exemplo: macrófagos, neutrófilos e células natural killer (NK), reconhecem esses PAMPs,

exemplos das quais são os grupos de receptores Toll-like (TLRs) e as proteínas de domínio de oligomerização ligada ao nucleotídeo (NOD) (100).

Esses dois grupos de moléculas que reconhecem o patógeno têm sido largamente estudados. Investigações da resposta inata ao *H. pylori* focando o TLR4 que é geralmente considerado a molécula de reconhecimento do patógeno para LPS bacteriano de Gram-negativas, tem mostrado falhas, mostrando que essa resposta pode não ser mediada por TLR4, pois o LPS de *H. pylori* é um agonista TLR4 com baixa atividade, e tem sido um pobre ativador de resposta imune inata comparado a outras bactérias Gram-negativas. Por outro lado, recentes estudos têm focado nos TLR2 (molécula de reconhecimento do patógeno para peptidoglicano e lipoproteína) e TLR5 (molécula de reconhecimento do patógeno para flagelina) (100).

O outro grupo de moléculas de reconhecimento do patógeno, as proteínas NODs, parecem ter um papel central na mediação da imunidade inata contra *H. pylori*. Dois membros desta família de proteínas NOD1 e NOD2, também chamadas CARD4 e CARD15, estão envolvidas no reconhecimento intracelular de muropeptídeos bacterianos derivados de peptidoglicano (100)

A produção de fator nuclear-kappaB (NF-κB) e IL-8 nas células epiteliais têm mostrado serem dependentes do reconhecimento intracitoplasmático Nod1 dos muropeptídeos de peptidoglicano do *H. pylori*. Assim, o reconhecimento imune inato do *H. pylori* pelas células epiteliais gástricas por Nod1 é provavelmente mais importante do que por TLRs (100).

O reconhecimento dos PAMPs pelas moléculas de reconhecimento do patógeno (PRMs) na infecção pelo *H. pylori* induz a produção de proteínas pertencentes à família de quimiocinas, estando estas envolvidas no recrutamento e ativação de células imunes específicas. Diferentes quimiocinas mostram marcada especificidade com membros da sub-família CXC (ex. IL-8, GRO-α) tendo atividade quimiotática específica para neutrófilos e membros da família CC (ex. RANTES, MIP-1α) com efeitos em monócitos e linfócitos (103). Bem como na indução da produção e secreção de citocinas como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α). A produção e expressão desses agentes próinflamatórios é controlado pelo fator de transcrição NF-κB e o desencadeamento inicial é provavelmente mediado pelas células epitelias (100).

Na resposta imune adaptativa, as células T se apresentam como as principais orquestradoras, sofrendo expansão clonal sob reconhecimento de fragmentos de peptídeos complexados com MHC de classe I e II em células apresentadoras de antígeno. Classicamente, as células T convencionais têm sido consideradas por induzir as células T CD4+ que reconhece peptídeos complexados com moléculas de MHC de classe II, e através da secreção de citocinas, promove a resposta imune incluindo diferenciação de células B, enquanto que células T CD8+ podem reconhecer peptídeos complexados com moléculas de MHC de classe I e promover a morte das células infectadas por patógenos intracelulares. Todos os *H. pylori* são capazes de estimular a atividade de células T, e uma variedade de antígenos bacterianos tem sido implicados neste processo (100).

Na fase efetora da resposta imune, diferentes subgrupos de células T, chamadas células T-helper 1 (Th1) e T-helper 2 (Th2) se expandem. As células com padrão Th1 promovem imunidade mediada por células com ação pró-inflamatória através da produção de citocinas como interferon-gama (IFN-γ) e TNF-α, enquanto que células com padrão Th2 promovem imunidade humoral por secretar as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, que ativam e induzem as células B a produzirem anticorpos (100). Tanto em humanos como em camundongos, a infecção por *H. pylori* estimula uma forte e específica produção de anticorpos IgG e IgA no soro e na mucosa gástrica (104) (**Figura 9).**

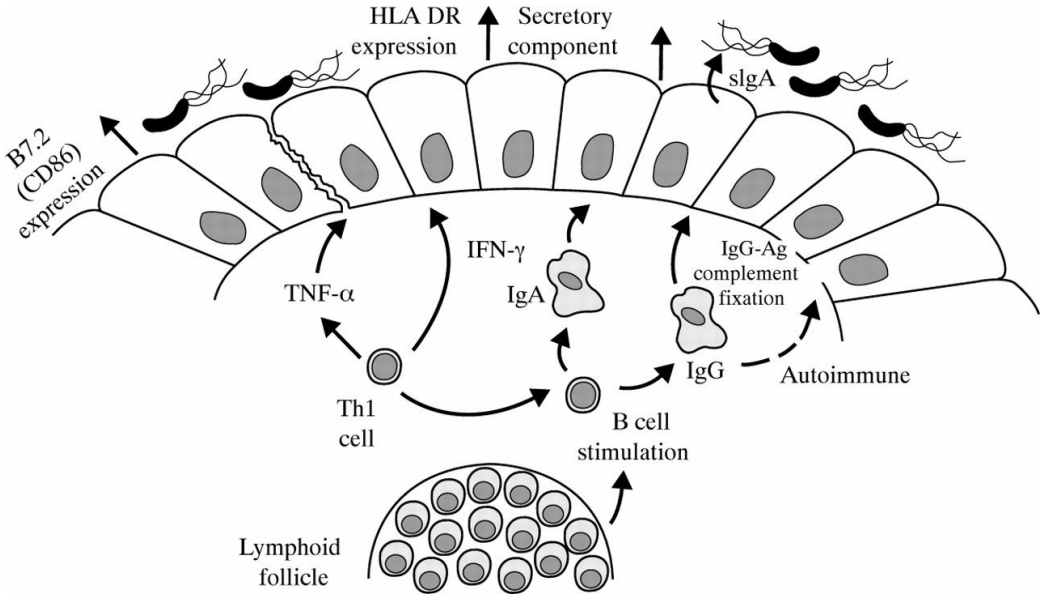


Figura 9. Indução da resposta imune específica pelo *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica. Fonte: Shimoyama et al., 1998 (105).

Na resposta imune da infecção pelo *H. pylori*, há aumento de múltiplas citocinas na mucosa gástrica (TNF-α, IFN-γ, IL1β, IL-6, IL-8 e IL-18) pró-inflamatórios, enquanto que IL-4 e IL-10, citocinas imunoreguladoras atuam em limitar a resposta inflamatória (86) **(Figura 10).**

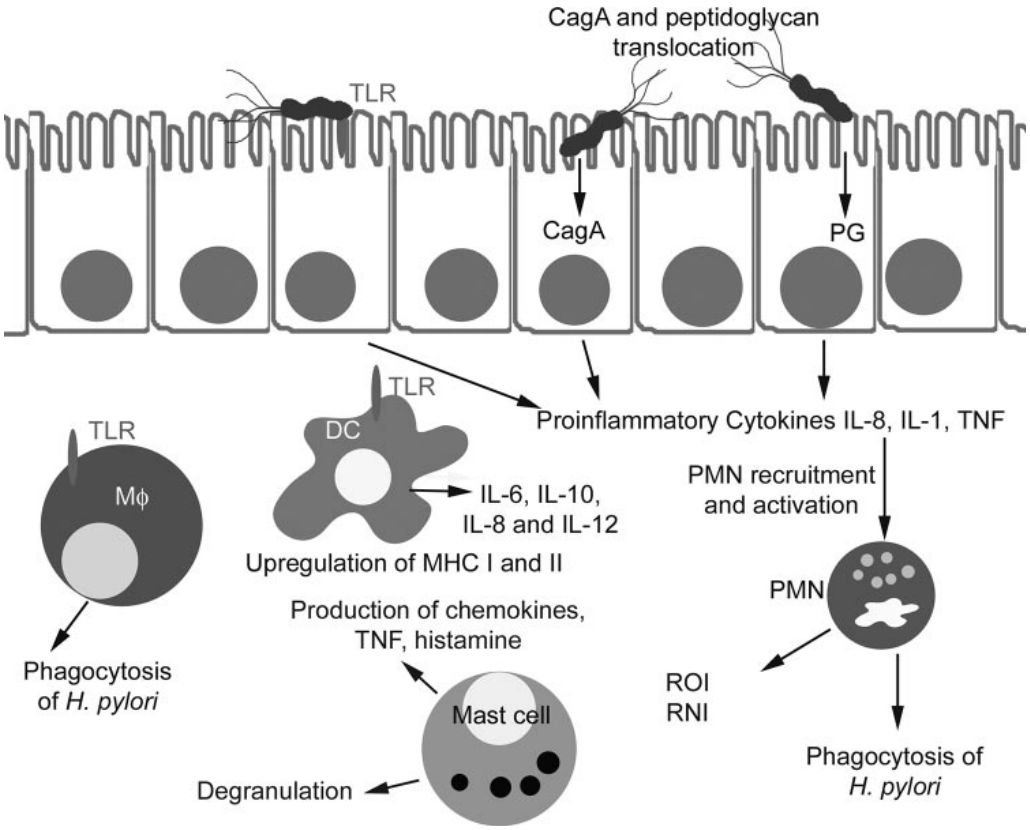


Figura 10. Reconhecimento imune inato do *Helicobacter pylori*. O reconhecimento imune inato do *H. pylori* leva à produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (MΦ), células dendríticas (DCs), mastócitos e células epiteliais. O reconhecimento imune inato do *H. pylori* é mediado pelos receptores TLRs. Em adição, o peptidoglicano (PG) do *H. pylori* pode ser reconhecido por receptores Nod intracelulares. Interações entre *H. pylori* e células epiteliais gástricas levam à ativação de NF-κB e alteração na transcrição gênica nas células epiteliais. A produção de IL-8 por células epiteliais leva ao recrutamento de neutrófilos leucócitos polimorfonucleares (PMNs), que pode fagocitar bactérias opsonizadas e produz espécies oxigênio reativo (ROI) ou espécies nitrogênio reativo (RNI). A ativação de mastócitos resulta em degranulação e produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Fonte: Algood et al., 2006 (86).

2.5.1 Polimorfismo genético de citocinas na infecção pelo *H. pylori*

O *H. pylori* e seus produtos desencadeiam processo inflamatório e os principais mediadores são as citocinas (106). Citocinas codificam genes e moléculas relacionadas que abrigam regiões polimórficas, consideradas por alterar a transcrição gênica e deste modo influenciar no processo inflamatório em resposta a doenças infecciosas. No contexto da infecção pelo *H. pylori*, a base genética para diferenças interindividuais em resposta às citocinas é muito pouco entendida, no entanto, recentes relatos têm relacionado o polimorfismo gênico das citocinas ao câncer gástrico (107).

Os diferentes desfechos da infecção por *H. pylori* parecem ser modulados por fatores ambientais, mas também pelo polimorfismo genético do hospedeiro e bacteriano. Vários autores têm observado que o polimorfismo genético específico nos genes IL-1β e IL1-RN levam ao presuntivo fenótipo pró-inflamatório do hospedeiro e correlaciona com um risco aumentado de induzir à hipocloridria e câncer gástrico (108, 109, 110, 111). Numerosas investigações sobre a resposta pró-inflamatória à infecção pelo *H. pylori*, assim como resposta imune inata e humoral a este microrganismo, tem contribuído para o entendimento do desfecho desta infecção.

2.6 Terapêutica convencional

A terapia antibiótica usada para erradicar a infecção por *H. pylori*, que tem sido utilizada como primeira escolha é uma combinação de dois antibióticos, claritromicina e amoxicilina, associado a duas ou três drogas, tais como inibidor de bomba de prótons, bloqueador H_2 e sais de bismuto (89, 112). Contudo, recorrência da infecção e resistência a antibióticos tem se desenvolvido em diferentes partes do mundo (113), o que torna essencial a procura por produtos naturais com atividade anti-*H. pylori*, que além da possibilidade de ser associado à terapia convencional, pode ser uma fonte de novos fármacos.

Evidências científicas baseadas em estudos clínicos controlados confirmam os benefícios resultantes da erradicação da infecção pelo *H. pylori*, porém, nem todos os casos de doenças com co-existência de infecção com *H. pylori* foi solucionado com erradicação deste

patógeno (114). Para evitar controvérsias na prática diária, um grupo de pesquisadores se propôs a listar situações onde sejam recomendados o tratamento da infecção pelo *H. pylori*, chegando ao consenso de que deveriam erradicar o *H. pylori* nas situações em que apresentam: úlcera gástrica e duodenal, linfoma MALT, gastrite atrófica, câncer gástrico na família (primeiro grau de parentesco), pacientes com anemia por deficiência de ferro inexplicada e pacientes com púrpura trombocitopênica idiopática (115).

A atividade antibacteriana contra o *H. pylori* pode ser apresentada por muitos antibióticos (amoxacilina, macrolideos, tetraciclinas) e alguns agentes quimioterápicos (nitroimidazois) e bismuto. Um inibidor da bomba de prótons também é recomendado porque aumenta o pH no estômago e cria condições para ação dos antibióticos (116).

O uso de terapia antimicrobiana simples não tem apresentado resposta terapêutica adequada na erradicar do *H. pylori*, por exemplo, bismuto ou amoxicilina tomados sozinhos tem efeito na erradicação de apenas 20% dos pacientes, e o *H. pylori* rapidamente se tornou resistente ao metronidazol sozinho, resultando em taxas muito baixas de erradicação, e o tratamento com claritromicina sozinha pode ser mais efetivo, apresentando uma taxa aproximada de 44% porém com alta dose diária (2g por dia) por 14 dias, mas que ainda compromete o resultado (116).

A utilização da terapia tripla com o uso de inibidor da bomba de prótons associado a dois antibacterianos (amoxicilina, metronidazol ou claritromicina), assegura a erradicação da infecção pelo *H. pylori* em 80-90% dos casos (114, 115).

A erradicação da infecção pelo *H. pylori* é importante e tem sido usada como potencial para reduzir o risco do desenvolvimento de câncer gástrico (115). Porém o uso de terapia tripla torna o tratamento muito caro e inacessível para algumas populações carentes. Apesar do bom resultado apresentado, existem diversos relatos quanto à crescente resistência do *H. pylori* a esses agentes antimicrobioanos, principalmente por causa do aumento na resistência à claritromicina e metronidazol, os dois principais agentes antimicrobianos usados no regime de terapia tripla atual (114, 117). A resistência aos antimicrobianos leva à uma cura incompleta e a inconveniência dos efeitos colaterais que certamente ocorrem por causa do uso de vários medicamentos. Em consideração à cura incompleta e os possíveis efeitos colaterais, aumentou a busca por extratos naturais capazes de inibir o crescimento do *H. pylori in vitro*, assim como

uma terapia combinada incluindo uma planta medicinal que poderia ajudar no propósito de diminuir os inconvenientes, tanto o da resistência, quanto dos efeitos colaterais (118).

2.7 Pesquisa com produtos naturais

O aumento da resistência aos antibióticos é o mais importante fator limitante na eficiência do tratamento da infecção pelo *H. pylori* (119), além dos efeitos indesejáveis das drogas sintéticas utilizadas nos tratamentos de úlceras, estimulando a produção de pesquisas que visam ao isolamento de novos princípios ativos, obtidos a partir de plantas medicinais (172, 173). Plantas medicinais servem como fontes úteis de novas drogas (118, 120), onde numerosos estudos tem se concentrado na erradicação da infecção por *H. pylori* utilizando plantas medicinais tradicionais (121, 122, 123).

A utilização de plantas medicinais no tratamento da infecção causado pelo *H. pylori* oferece vantagens significativas como, por exemplo, maior conveniência e redução do custo do tratamento (124). Esses estudos tem se concentrado na erradicação da infecção por *H. pylori* utilizando plantas medicinais tradicionais (125), e tem se difundido pelo mundo inteiro: Grécia (125), Taiwan (126), USA (127), Turquia (128) e Japão (129), sendo este ultimo utiliza uma planta coletada aqui no Brasil. Pesquisas recentes têm dado ênfase ao conhecimento e utilização do saber popular no uso de plantas com atividade medicinal, devido à dimensão da biodiversidade vegetal aqui existente.

Recentemente, muitos esforços têm sido feitos no sentido de identificar novas drogas antiúlceras de fontes naturais, tendo como alvo principal o *sreening* de plantas com atividade anti-*H. pylori* (118, 120, 121, 122, 123, 124), que é considerado o principal agente etiológico da ulcera péptica (61).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar uma triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro* das plantas com comprovada atividade em úlceras gástricas e selecionar uma planta para prosseguir nos ensaios *in vivo,* visando elucidar seu mecanismo de ação.

3.2 Específicos

- Realizar a triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro* de extratos e de plantas medicinais do cerrado mato-grossense e da fração DCM_2 de *C. brasiliense*, em ensaio de difusão em disco;
- Realizar a triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro* de extratos e de plantas medicinais do cerrado mato-grossense e da fração DCM_2 de *C. brasiliense*, pelo método de microdiluição em caldo;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* em camundongos;
- Avaliar a atividade antiúlcera *in vivo* do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense*, pelo método de úlcera gástrica crônica por ácido acético com inoculação de *Helicobacter pylori* em ratos Wistar;
- Verificar a ação do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense* sobre a detecção de anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori* em plama de ratos wistar;
- Avaliar a participação das citocinas pró- e anti-inflamatórias na resposta anti-*Helicobacter pylori in vivo* do extrato hidroetanólico e da fração DCM_2 de *C. brasiliense*;

- Avaliar a participação da PGE_2 do raspado da mucosa gástrica na resposta anti-*Helicobacter pylori in vivo* do extrato hidroetanólico e da fração DCM_2 de *C. brasiliense*.
- Avaliar a atividade anti-*Helicobacter pylori in vivo* do extrato hidroetanólico e da fração DCM_2 através da determinação da produção de urease;
- Avaliar a atividade anti-*Helicobacter pylori in vivo* do extrato hidroetanólico e da fração diclorometânica de *C. brasiliense,* através de análises histopatológicas;
- Realizar abordagem fitoquímica preliminar do extrato hidroetanólico das folhas e entrecasca e fração DCM_2 de *C. brasiliense*;

4. MATERIAIS

4.1 Material botânico

As plantas foram coletadas pela equipe do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), identificadas e herborizadas pelo Herbário Central da UFMT. A entrecasca de *Calophyllum brasiliense* foi coletada na cabeceira da volta do rio Coxipó, ao lado da estrada para Santo Antônio do Leverger, na cidade de Cuiabá-MT, coordenadas GPS: (S15º38`40.8``) (W056º03`05.6``) em 09/07/2007 às 09h30min. O rizoma e folhas de *Simaba ferruginea*, coordenadas GPS: (S15º50.600`) (W056º04.793`) e a entrecasca de *Stryphnodendron obovatum,* coordenadas GPS: (S15º50.747`) (W056º04.506`) foram coletadas em Santo Antônio do Leverger, enquanto que a entrecasca de *Lafoensia pacari* coordenadas GPS: (S15º44.117`) (W055º39.920`) e as folhas de *Calophyllum brasiliense*, coordenadas GPS: (S15º 42.039`) (W055º51.196`) coletados na BR 364 no dia 12/11/2007 por volta das 14:30h. A exsicata da *Calophyllum brasiliense* Camb. está registrada sob o número 37.993 no Herbário Central da UFMT, tendo sido encaminhada para o Instituto *Plantarum*, sob os cuidados do Ms Harri Lorenzi, com a finalidade de proceder à ratificação taxonômica.

A coleta das plantas foi submetida à aprovação pelo Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) / Ministério do Meio Ambiente (MMA), tendo sido autorizada conforme comprovante de registro de coleta de material botânico Nº 13978-1 (Anexo).

4.2 Microorganismos

Nos bioensaios utilizou-se a cepa ATCC 43504 de *Helicobacter pylori* (VacA e cagA positivos), mantida em caldo BHI, suplementado com soro fetal bovino a 10% e congelada a

−20ºC, doada pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. Como controle da coloração de Gram negativo para *H. pylori*, foram utilizadas as cepas ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* e ATCC 25922 de *Escherichia coli*.

4.3 Animais

Para os ensaios farmacológicos *in vivo*, foram utilizados camundongos albinos, *Mus musculus*, variedade Swiss-Webster, adultos, machos pesando de 25-30g e ratos albinos, *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, adultos, machos, pesando entre 160-210g, provenientes do Biotério Central, da Pró-Reitoria de Pesquisa, da Universidade Federal de Mato Grosso. Os animais passaram por um período de adaptação ao regime de dieta e ao laboratório por um período de quatro dias antes do início dos estudos, onde permaneceram acondicionados em gaiolas de polipropileno, com água *ad libitum* e dieta apropriada com ração Purina® (Labina), mantidos em condições controladas de temperatura (25±1 ºC) e ciclos luz/escuro de 12 h. Utilizou-se de 3-10 animais por grupo de experimento.

O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/UFMT), de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), estando certificado sob o protocolo nº 23108.002841/08-4 (Anexo).

4.4 Drogas e reagentes

As drogas, reagentes e corantes que foram utilizados durante a realização dos ensaios farmacológicos estão relacionadas a seguir no **Quadro 2.**

Quadro 2. Materiais de consumo utilizados nos ensaios biológicos.

Produto	**Marca**
Acetato de Etila P.A.	SYNTH
Àcido acético glacial P.A.	SYNTH
EDTA 5%	NEWPROV
Agar sangue base	HIMEDIA
Água oxigenada	SIGMA
Álcool etílico (Etanol) P.A.	SYNTH
Álcool metílico (Metanol) P.A.	SYNTH
Amoxicilina	MEDLEY
ATB – Ácido nalidíxico	SIGMA
ATB – Anfotericina B	SIGMA
ATB – Trimetropim	SIGMA
ATB – Vancomicina	SIGMA
BHI Agar	HIMEDIA
BHI caldo	HIMEDIA
Cloreto de sódio P.A.	INDEX
Agar Colúmbia	OXOID
Claritromicina	MEDLEY

Cloreto de metileno (Diclorometano) P.A.	SYNTH
Disco – Claritromicina 15µg	NEWPROV
Discos estéreis sem impregnação (6mm)	NEWPROV
Escala de McFarland	PROBAC
Éter etílico P.A.	SYNTH
Formaldeído solução 37% comercial	SYNTH
Gel de uréase	NEWPROV
Gerador de microaerofilia (Microaerobac)	PROBAC
Hexano P.A.	SYNTH
Meio de urease	PROBAC
Meio de cultura agar sangue	NEWPROV
Microplacas estéreis	GOLD LAB
Omeprazol	MEDLEY
Sangue de carneiro desfibrinado 10%	NEWPROV
Soro fetal bovino	CULTILAB
Tampas de microplacas estéreis	GOLD LAB
Tiras de oxidase	NEWPROV
Tween 80	SIGMA
2,3,5 trifeniltetrazolio	SIGMA

4.5 Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante a realização dos ensaios microbiológicos e farmacológicos estão relacionados conforme a **Quadro 3**, a seguir:

Quadro 3. Materiais permanentes e equipamentos utilizados nos ensaios biológicos.

Materiais permanentes e equipamentos	Marca
Aparelho leitor de ELISA Multiskan EX	THERMO SCIENTIFIC
Autoclave vertical	PHOENIX
Balança analítica	OHAUS
Balança eletrônica de precisão modelo WA 205	CHYO
Câmera fotográfica digital	SONY
Capela de fluxo laminar	LABCONCO
Centrífuga excelsa 2	FANEN
Centrífuga refrigerada R-4239	ALC
Espectrofotômetro UV – visível Gênesys 5	MILTON ROY
Estufa de secagem – circulação e renovação de ar	MARCONI
Estufa microbiológica	QUIMIS
Evaporador rotativo MA 120	MARCONI
Geladeira vertical 240 litros	CONSUL
Incubadora microbiológica	MARCONI
Lupa esterioscópica	CHYO
Microcomputador Pentium 400Mhz	TCE
Microscópio óptico com câmara fotográfica - E200	NIKON
Moinho elétrico	TECNAL
Paquímetro digital	DIGIMESS
Scanner de mesa	AVISION 260C
Vortex	PHOENIX
Freezer vertical FE26	ELETROLUX

5. MÉTODOS

5.1 Obtenção dos extratos e fração

Para obtenção dos extratos metanólicos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (EM*Hs*), *Hyptis crenata* Pohl (EM*Hc*), *Strychnos pseudoquina* St. Hil. (EM*Sp*) e *Vaitarea macrocarpa* Benth. Ducke (EM*Vm*) e extratos brutos hidroetanólico de *Simaba ferruginea* St. Hil. (EHE*Sf*), *Lafoensia pacari* St. Hil. (EHE*Lp*) e *Stryphnodendron obovatum* Benth. (EHE*So*), as partes coletadas de cada planta foram limpas, secas à temperatura ambiente e trituradas em moinho elétrico com tamis de malha nº 40, até obtenção de pó. O pó seco de cada planta foi macerado (1:5, p/v), sucessivamente, com hexano para desengordurar e em seguida macerado com etanol-água 75%, por 7 dias. Os pós da entrecasaca e das folhas de *Calophyllum brasiliense* Camb. foram macerados (1:5, p/v), sucessivamente, com solventes de polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol-água 75%, à temperatura ambiente, também por 7 dias; após esse período, os macerados foram filtrados, concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a aproximadamente 40-50ºC, sendo o solvente residual eliminado em estufa a 40ºC, para obtenção dos extratos EH*Cb*, ED*Cb*, EAE*Cb*, EM*Cb* e EHE*Cb*, respectivamente, sendo envasados em frasco âmbar, armazenados em geladeira a 4 ± 1 ºC.

A fração diclorometânica (DCM_2) foi obtida do extrato hexânico (entrecasca), através de cromatografia rápida filtrante em coluna com diclorometano, realizada pela equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas (ICET) da UFMT.

5.2 Determinação do peso seco dos extratos brutos e da fração

Três alíquotas de 100 mg cada, do extrato ou fração, foram retiradas e colocadas em frascos-ampola, previamente tarados, secas em estufa à 60°C, por 48 h e pesadas, sucessivamente, em balança analítica, até obtenção de peso constante. As concentrações dos extratos expressas em mg% ou mg/mL, foram obtidas pela média aritmética dos três últimos pesos.

5.3 Determinação dos rendimentos dos extratos e fração

A determinação do rendimento (%) de cada extrato ou fração foi feita utilizando a equação abaixo:

$r = \frac{p_s \times q_e}{q_p} x100$, onde:

r = rendimento (%);

p_s = peso seco (g/g);

q_e = quantidade de extrato obtido (g);

q_p = quantidade de pó utilizado (g).

5.4 Ensaios *in vitro*

5.4.1 Triagem anti-*Helicobacter pylori* dos extratos e fração de plantas medicinais, pelo método de difusão em disco.

Para a realização da difusão em disco (132), foram realizadas diluições seriadas dos EM*Hs*, EM*Hc*, EM*Sp*, EM*Vm*, EHA*Sf*, EHA*Lp*, EHA*So*, EH*Cb*, ED*Cb*, EAE*Cb*, EM*Cb* e EHA*Cb*, para obtenção das doses de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/disco. Foram utilizados discos estéreis (6 mm - CECON®), impregnados com 25µL de cada concentração dos extratos das plantas. Os discos impregnados com os extratos foram depositados na superfície da placa inoculada com o *H. pylori*, numa suspensão de $6x10^8$ UFC/mL (escala 2 de McFarland), utilizando como droga padrão a claritromicina (15µg - NEWPROV®), incubado a 37°C sob condições de microaerofilia com atmosfera de 5 a 15% de O_2 e de 5 a 10% de CO_2 por 3-5 dias. Após esse período, foram realizadas as medidas dos halos de inibição de crescimento utilizando paquímetro digital **(Figura 11).**

A **B**

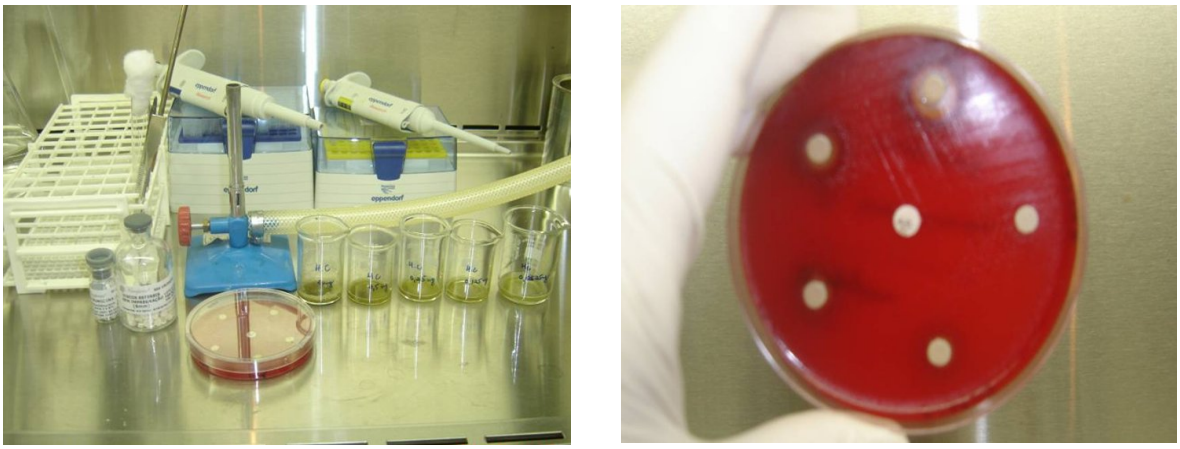


Figura 11. Ensaio de difusão em disco: (A) Bancada de ensaios com material utilizado e (B) placa de ágar sangue com halos de inibição de crescimento do *Helicobacter pylori*.

5.4.2 Triagem anti-*Helicobacter pylori* de extratos e fração de plantas medicinais, pelo método de microdiluição em caldo.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), a cada poço da microplaca, foi adicionado 100µL de caldo Mueller Hinton suplementado com 10% de soro fetal bovino inoculado com *H. pylori* $6x10^8$ (escala 2 de McFarland), acrescido de 100µL dos EM*Hs*, EM*Hc*, EM*Sp*, EM*Vm*, EHA*Sf*, EHA*Lp*, EHA*So*, EH*Cb*, ED*Cb*, EAE*Cb*, EM*Cb*, EHA*Cb* e fração DCM_2 de *C. brasiliense* para obtenção da concentração final de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL. A claritromicina (25 mg/mL) foi usada como droga padrão de inibição de crescimento. Em seguida a microplaca foi incubada a 37°C em microaerofilia com atmosfera de 5 a 15% de O_2 e de 5 a 10% de CO_2 por 3-5 dias **(Figura 12)**. Após incubação as placas foram examinadas visualmente e cada poço foi repicado em ágar sangue de carneiro (ágar Mueller Hinton + 5% sangue), para determinar se houve ou não crescimento, sendo a menor concentração considerada a que mostrou completa inibição de crescimento.

Para gerar condições de microerofilia, foram utilizados geradores atmosféricos PROBAC – Microaerobac. Microaerobac que é um gerador de microaerofilia (5 a 15% de O_2) e (10% de CO_2) para jarras de 2,5 litros, com o seguinte procedimento: As placas de petri inoculadas com *H. pylori* foram colocadas no interior do recipiente, deixando um espaço pelo menos de 1 cm entre a última placa e a tampa da jarra, foram distribuidos lentamente 20mL de água da torneira sobre toda a superfície absorvente do Microaerobac, que foi colocado sobre a última placa com a superfície úmida para cima. O controle de esterilidade do meio de cultivo BHI, controle de crescimento (inoculo bacteriano) e controle de droga padrão (claritromicina 25mg/mL) foram realizados para maior segurança no ensaio.

Para avaliar a atividade anti-*H. pylori*, foram considerados como sendo de alta atividade as CIMs menores que 64µg, com moderada atividade as CIMs com range de 65 a 500µg, com pouca atividade as CIMs de 500 a 1000µg e sem atividade os extratos com CIMs maiores que 1000µg (133).

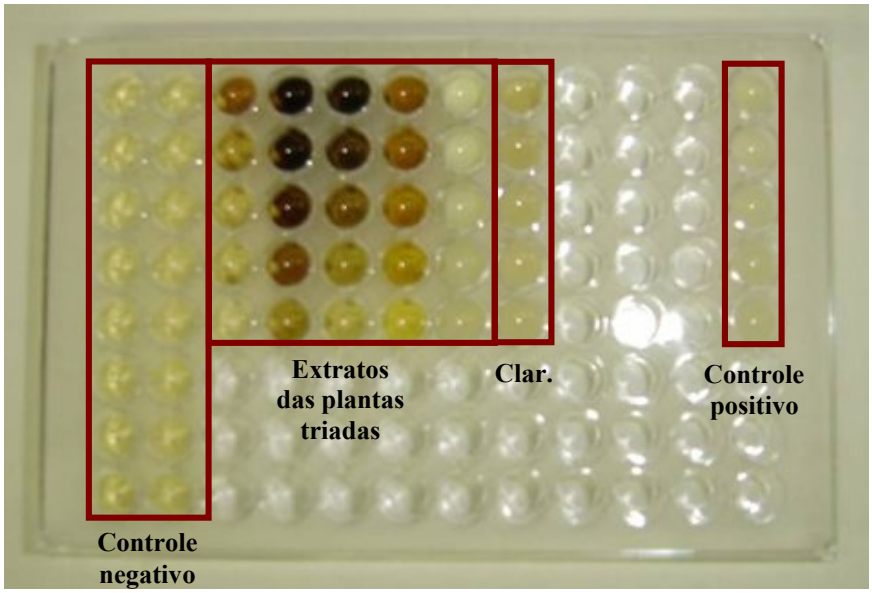


Figura 12. Ensaio de microdiluição em placa inoculada com *H. pylori*, mostrando a triagem com os extratos das plantas selecionadas e a claritromicina (Clar.) como droga padrão.

5.5 Ensaios *in vivo*

Após triagem *in vitro* das plantas com atividade contra *H. pylori*, foi seleciona a *C. brasiliense*, para prosseguir com os ensaios *in vivo*, por ser a planta com melhor resultado *in vitro.*

5.5.1 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense*

Foram utilizados 3 camundongos machos adultos, pesando de 25-30g por grupo. Os animais foram tratados por via oral (v.o.) com extrato hidroetanólico nas doses de 250, 500, 1000, 3000 e 5000 mg/kg e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense* nas doses de 250, 500 e 1000 e 3000 mg/kg. Um animal controle foi utilizado para cada dose recebendo veículo (água destilada, 10 mL/kg).

Após a administração do extrato hidroetanólico, a fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense* ou veículo, todos os animais foram observados individualmente em gaiolas apropriadas (campo aberto) nos tempos 0, 15 e 30 minutos; 1, 2, 4 e 8 horas e, uma vez a cada dia por durante 14 dias. Os resultados das observações comportamentais gerais foram anotados em tabela adaptada dos trabalhos de Malone (134).

5.5.2 Avaliação da atividade antiúlcera do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense,* na úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético na presença de *H. pylori*

5.5.2.1 Indução de úlcera por ácido acético

Conforme método de Takagi et al. (135), ratos Wistar machos foram submetidos a um período de adaptação de 4 dias antes do experimento, recebendo ração sólida com tempo restrito de 2h diárias (9–10h e 17-18h) com livre acesso à água. Durante esse período de adaptação, todos os animais receberam por gavagem 1mL de água destilada esterilizada 2 vezes ao dia (às 8 e 16h, respectivamente). No dia do experimento, os animais foram distribuídos em grupos de 8 a 10 animais cada, os ratos foram anestesiados com éter etílico, o abdômen foi aberto, o estômago foi exposto e administrada uma injeção de ácido acético 20% (30µL) na camada subserosa da parede anterior da porção glandular, mantendo o local da aplicação pressionado por alguns segundos. O estômago foi lavado com salina 0,9% estéril gelada, para evitar a aderência da superfície externa da região ulcerada, a parede abdominal foi suturada com fio de algodão (nº 20) estéril. No grupo Sham, 10 animais foram submetidos à laparotomia, o estômago foi exposto e administrada uma injeção de salina estéril (30µL) na camada subserosa da parede anterior da porção glandular.

Após procedimento cirúrgico para indução da úlcera, os animais foram mantidos em gaiola de polipropileno com acesso diário à ração comercial, com tempo restrito nos períodos compreendidos entre 9 – 10h e 17 – 18h, possibilitando jejum adequado para administração do *Helicobacter pylori*, bem como das drogas padrão (amoxicilina 50mg/kg + claritromicina

25mg/kg + omeprazol 20mg/kg), do extrato hidroetanólico nas doses de 50, 100 e 200mg/kg e da fração DCM_2 nas doses de 100 e 200mg/kg obtidas da entrecasca de *Calophyllum brasiliense.*

5.5.2.2 Infecção dos ratos com *H. pylori*

Seguindo o método de Okabe et. al. (136), após 24h da indução da úlcera por ácido acético descrita acima, os animais foram inoculados intragastricamente com uma suspensão em caldo BHI de *Helicobacter pylori ATCC 43504* $9x10^8$ utilizando-se cânula própria para gavagem orogástrica, após esse procedimento os animais ficaram em repouso por 1 h. Nos animais do grupo controle, Sham e com úlcera induzida por ácido acético sem infecção por *H. pylori*, foram administrados somente caldo BHI via oral, seguido por um período de repouso também de 1h. Essa inoculação orogástrica do *H. pylori* foi mantida 2 vezes ao dia por durante 7 dias. Já a administração do extrato e fração do *C. brasiliense* e drogas padrão ocorreram duas vezes ao dia por um período de 14 dias consecutivos a partir do terceiro dia da indução da úlcera por ácido acético. Após esse período de tratamento, os animais foram conduzidos à morte por deslocamento cervical e realizada coleta sanguínea através da veia cava inferior com retirada do estômago para leitura, quantificação e qualificação das úlceras (70). Foi realizado exame histopatológico, determinação da urease e sorologia para determinação de anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori* (68).

5.5.2.3 Sorologia para determinação de anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori*

A coleta sanguínea foi realizada pela veia cava inferior, em tubos contendo EDTA, os plasmas foram separados e estocados a -20ºC até o momento da análise.

Para inicio do procedimento, todos os reagentes estavam a temperatura ambiente, sendo adicionados 100µL das amostras diluídas (1:100) ou dos controle prontos para a utilização nos poços das tiras de teste necessitadas, deixando um poço livre para o valor branco do substrato, as amostras foram incubadas durante 60 minutos (+/- 5 min.) a 37ºC (+/- 1ºC) em câmara úmida. No final do tempo de incubação os poços foram lavados (à mão),

aspirado o líquido de incubação dos poços, completado com 300µL de solução de incubação em cada poço, a solução de lavagem foi aspirada, esse processo foi repetido 3x (isto é, lavado 4x no total) por fim, a placa foi esvaziada, batendo-a sobre lenços de papel limpos; 100µL do conjugado IgG pronto foi pipetado para uso nos respectivos poços (sem valor branco do substrato); A microplaca foi incubada por 30 minutos (+/- 1 min.) à 37ºC (+/-1ºC) em câmara úmida. Em seguida, os poços foram lavados no final do tempo de incubação, adicionados 100µl da solução de substrato pronto para uso em cada um dos poços (incluindo o branco do substrato) e incubado durante 30 minutos (+/-1 min.) à 37º (+/-1ºC) em câmara úmida. Pipetado 100µl da solução de paragem em todos os poços, com agitação leve da placa de microtilulação para homogeneizar, por fim realizada leitura dentro de 60 minutos a 405nm contra o valor de branco do substrato.

Os títulos de anticorpos IgG anti-*H. pylori* foram realizados pela empresa Gênese determinados através da sorologia pelo método de ELISA lote: SBX-BI com validade: Fev/2009, da Virion/Serion (89).

5.5.2.4 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre citocinas anti e pró-inflamatórias.

A infecção por *H. pylori* desencadeia um processo inflamatório o qual pode ser avaliado através da dosagem das citocinas inflamatórias presentes neste quadro. Foram dosadas as citocinas IL1β, TNFα, VEGF. Porém, o *H pylori* induz apoptose de macrófagos em associação com alterações na via mitocondrial, tornando essencial também a dosagem de anti-IL10 (89, 71).

Todos os reagentes ficaram estocados em sala com temperatura de (25ºC) antes do uso no ensaio. Um diagrama dos padrões 0, 1:4096, 1:1024, 1:256, 1:64, 1:16 e 1:4 e controle I e II e amostras foram preparados em um mapa dos poços (lembrando que a placa permite apenas 96 ensaios e recomendado correr o ensaio em duplicata). Pipetados 200µl do Buffer em cada poço da placa, vedado e homogeneizado em um agitador de placas por 10 minutos à temperatura ambiente (25ºC). A solução tampão foi removida com auxílio de uma micropipeta, sendo removido qualquer excesso do tampão no fundo da placa com auxílio de papel toalha limpo. Adicionados 25µL do tampão de ensaio no padrão 0 e 25µL do tampão de

ensaio nos poços das amostras, adicionado ainda 25µL de cada padrão ou controle nos poços destinados aos mesmos. Como foi ensaiado amostra de plasma de ratos, foi adicionado 25µL do soro matriz no fundo dos poços dos padrões e controles e 25µL do tampão de extração como soro matriz no fundo dos poços de padrões e controles. Em seguida adicionado 25µL das amostras diluídas apropriadamente dentro dos poços. O frasco de grânulos foi colocado no vórtex e adicionado 25µL dos grânulos misturados a cada poço apropriado. (Nota: durante a adição dos grânulos misturados, contínua homogeneização foi mantida para evitar que os grânulos sedimentassem). O frasco foi selado e tampado com folha de alumínio, incubado com agitação em uma shaker de placa por toda a noite (18-20 horas) a 2-8ºC. Gentilmente foi removido o líquido por filtração a vácuo, a placa foi lavada duas vezes com 200µL/poço ou Buffer de lavagem, removendo o Buffer de lavagem por filtração entre cada lavada. Com remoção de qualquer excesso de Buffer de lavagem do fundo da placa usando uma toalha de papel absorvente. Adicionados 25µL do coquetel de anticorpos de detecção em cada poço. (Nota: Foi Permitido que o anticorpo de detecção estivesse à temperatura ambiente antes da adição). Selado, cobrerto com folha de alumínio e incubado por 2 horas com agitação em um shaker de placa à temperatura ambiente (20-25ºC), adicionados 25µL de Strptavidin-Phycoerythrin a cada poço contendo 25µL do coquetel de anticorpos de detecção, selado, coberto com folha de alumínio e incubado com agitação em um shaker de placa por 30 minutos à temperatura ambiente (20-25ºC). Gentilmente foi removido todo o conteúdo por aspiração, a placa foi lavada 2 vezes com 200µL /poço de Buffer de lavagem, removendo o Buffer de lavagem por aspiração entre cada lavagem. O excesso de Buffer da placa foi limpo com uma toalha de papel, adicionados 100µL do fluido de revestimento a todos os poços, coberto com folha de alumínio e os grânulos resuspendido por agitação da placa em shaker por 5 minutos. A placa foi corrida em instrumento Luminex, sendo os dados foram salvos e avaliada a fluorescência média das unidades usando uma curva apropriada.

Procedimento realizado pela empresa Gênese, utilizando o Kit plex de citocinas e quimiocinas de ratos (cat. RCYTO-80K), equipamento Luminex.

5.5.2.5 Avaliação a atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense* sobre a PGE_2

- **Expressão por proteínas totais**

O método de Bradford (137) foi utilizado para a determinação de proteínas totais. Esse método é baseado na interação entre o corante azul brilhante de Coomassie BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

Uma solução de Albumina bovina livre de ácidos graxos (2mg/mL) foi preparada e o reagente de Bradford (Bio-Rad Protein assay) foi diluida 1/10mL com solução salina (0,9%), foi feita uma diluição da solução padrão de albumina, onde foram pipetados 500µL da solução 2mg/mL e adicionados 9500µL de salina. Os pontos para construção de uma curva padrão utilizando albumina bovina diluída para obtenção de concentrações conhecidas (0 a 200µg/mL) foram preparados e as amostras diluídas de tal maneira que se encaixe na curva padrão. Foram pipetados em tubos de ensaio 50µL da diluição dos padrões da curva ou das amostras diluídas e adicionados nos tubos 1 mL do Reagente de Bradford diluído, homogeneizado em vórtex, aguardou-se 5 minutos e foram lidos em espectrofotômetro a 620nm.

- **Expressão por mg de tecido**

Com a opção de realizar o ensaio de sensibilidade regular, todos os reagentes foram colocados à temperatura ambiente antes do uso, conforme recomendação as amostras, controles e padrões foram ensaiados em duplicata. Todos os reagentes, padrões e amostras foram preparados, adicionados 150µL do diluente calibrador no poço do NSB e 100µL do calibrador diluente no poço padrão branco (B0), em seguida, adicionados 100µL do padrão ou amostra nos poços remanescentes e 50µL da solução de anticorpos primários a cada poço (excluindo o poço NSB), todos os poços exceto o NSB obtiveram a cor azul. Adicionados 50µL do conjugado de PGE2 a cada poço, todos os poços exceto o NSB ficaram com a cor violeta, a placa foi coberta com o adesivo próprio, incubada por 2 horas à temperatura ambiente em um agitador de microplaca orbital horizontal a 500+/-50rpm. Em seguida, cada

poço foi aspirado e lavado, repedindo o processo por 3 vezes para um total de 4 lavagens. Cada poço foi lavado com 400µL usando uma micropipeta multicanal, a completa remoção do líquido de cada passo é essencial para uma boa performance, depois de lavado, removido qualquer solução de lavagem remanescente por aspiração ou decantação, a placa foi invertida contra uma toalha de papel limpa, adicionads 200µl da solução substrato a cada poço, incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida foram adicionados 50µL da solução de parada em cada poço, a cor dos poços mudaram de azul para amarelo. A densidade óptica de cada poço foi determinada dentro de 30 minutos, usando um leitor de microplaca a 450nm. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de PGE_2 na amostra.

A concentração de PGE_2 do raspado da mucosa gástrica foi normalizada pela quantidade de raspado da mucosa em mg e pela quantidade de proteínas totais presentes no raspado da mucosa gástrica em mg.

5.5.2.6 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre a produção de urease pelo *H. pylori*.

A urease é uma enzima produzida por muitas espécies de microrganismos que podem hidrolisar a uréia com formação de amônia e dióxido de carbono. A amônia reage em solução para formar carbonato de amônia, resultando em alcalinização do meio. O *Helicobacter pylori* produz grandes quantidades de urease, e esta enzima pré-formada pode ser detectada em fragmentos e biópsia gástrica. Com o auxílio de uma pinça, foi introduzido um fragmento de tecido gástrico no minitubo contendo o gel de urease, de uma maneira que o fragmento ficou fixo no centro do tubo. O horário da inoculação dos fragmentos foi anotado, os minitubos foram deixados à temperatura ambiente. A mudança de coloração após 1 hora foi observada, e quando negativa realizada uma última leitura após 24 h. Para leitura e interpretação, a prova positiva representa o desenvolvimento de reação alcalina (coloração vermelha ou rosa forte), prova negativa representa ausência de alteração de coloração (amarelo ou alaranjado claro). Por se tratar de material biológico, todas as amostras foram manuseadas de acordo com normas de biossegurança, sendo utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) como

luvas, avental e máscara, em capela de fluxo laminar. (Gel de urease lote: 7772; Validade: Nov/2008; cód. MCT75; Reg. MS: 10287910058 - Newprov®).

5.5.2.7 Avaliação histopatológica

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Todos animais tiveram os estômagos retirados, os quais foram abertos pela grande curvatura, sendo verificada persistência da ulceração ou erosão. Quando presente, a úlcera foi medida no seu maior eixo. De cada estômago, metade foi fixada em formalina 10% tamponada e incluída em parafina. De cada bloco, foram feitos dois cortes de 5µm, sendo um corado pela Hematoxilina-Eosina (HE) e outro pelo método de Giemsa modificado, para pesquisa de *H. pylori*.

Todos os casos foram examinados por patologista, de acordo com os critérios de Liu et al. (138), analisando os parâmetros:

Inflamação - presença de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria;

Atividade - caracterizada pela presença de neutrófilos dentro da camada epitelial superficial e glandular;

Regeneração - caracterizada pela resposta proliferativa à lesão epitelial na qual se observam células epiteliais com núcleos aumentados, hipercorados e com aumento da relação núcleo-citoplasma, além de ocasionais figuras de mitose;

Atrofia - diminuição das estruturas glandulares;

Metaplasia - presença de células caliciformes de morfologia intestinal.

A outra metade do estômago foi utilizada para o teste de urease.

5.6 Análise fitoquímica preliminar dos extratos hidroetanólicos e fração DCM_2 de *C. brasiliense*

A análise fitoquímica preliminar dos extratos foi realizada sob supervisão dos Professores Ms. Rogério Alexandre Nunes dos Santos e Ms. Ângela Márcia Serlhost Beserra do Laboratório de Farmacognosia, do Curso de Farmácia da Universidade de Cuiabá (UNIC), de acordo com a metodologia descrita por Matos (139):

Saponinas - A produção de espuma persistente e abundante (colarinho) quando um tubo com extrato aquoso é agitado fortemente, indica a presença de saponinas;

Alcalóides - Em um tubo colocar 1mL do extrato, 1gota de ácido clorídrico e 1 gota do reagente de Dragendorff, que em contato com o sal precipita. A leitura é caracterizada pela formação de precipitado na presença do reagente Dragendorff (potássio e iodo bismutado);

Cumarinas - Com ajuda de uma micropipeta, fazer uma mancha de aproximadamente 1,5cm de diâmetro, em um pedaço de papel de filtro não fluorescente. Aplicar sobre uma das manchas uma gota de solução alcoólica de KOH N, expor à ação da luz U.V. por cerca de 2-3 minutos e observar a presença de fluorescência, o que indica a presença de cumarina;

Compostos fenólicos - Em um tubo, colocar 3 gotas do extrato e 3 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl3), agitar bem e observar qualquer variação de cor. A apresentação enegrecimento da cor é indicativa da presença de compostos fenólicos;

Taninos - Em um tubo, colocar 1mL do extrato, com 1 gota de ácido clorídrico e adicionar gota a gota a gelatina, e observar a presença de precipitação. A precipitação da gelatina é indicativa da presença de taninos no extrato analisado.

5.7 Análises estatísticas

Os resultados dos testes paramétricos envolvendo variáveis contínuas foram expressos em termos de média ± erro padrão da média ($\overline{X}$ ± EPM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma via, seguida do pós-

teste de Tukey-Kramer ou de Dunnett`s. Para comparações de freqüências utilizou-se o teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição de hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p<0,05$). Os asteriscos (*$p<0,05$; **$p<0,01$ e ***$p<0,001$) serviram para caracterizar o grau de significância estatística.

No caso de comparações entre os grupos ulcerados e inoculados com *H. pylori* versus ulcerado, usou-se o símbolo † para expressar o nível de significância estatística ($^{\dagger}p<0,05$; $^{\dagger\dagger}p<0,01$ e $^{\dagger\dagger\dagger}p<0,001$) nas Tabelas 7 e 10. Para a tabulação e análises dos dados utilizou-se o soft GraphPad Prism, versão 5.00 Demo Trial.

6. RESULTADOS

6.1 Determinação do peso seco e rendimento dos extratos e fração DCM_2

Na **Tabela 1**, podem ser observados os pesos secos e rendimentos dos extratos e fração das plantas utilizadas para triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro*. Os pesos secos variaram de 89,36 a 99,25%, sendo maior para o extrato hidroetanólico da entrecasca de *Calophyllum brasiliense*.

Os rendimentos dos extratos e fração variaram de 4,2 a 27,32 %, sendo o maior rendimento para o extrato metanólico da folha de *Calophyllum brasiliense* e o menor para o extrato diclorometânico da entrecasca de *C. brasileinse.*

Tabela 1. Pesos secos e rendimentos dos extratos das plantas e fração DCM_2 submetidas à triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro*.

Planta	Farmacógeno	Solvente	Peso seco (mg/100 mg)	Rendimento (%)
Hyptis suaveolens	Planta inteira	Metanol	95,34	9,38
Hyptis crenata	Planta inteira	Metanol	89,36	16,65
Strychnos pseudoquina	Entrecasca	Metanol	95,01	19,00
Vaitarea macrocarpa	Cerne	Metanol	96,01	9,66
Simaba ferruginea	Rizoma	Etanol-Água 75%	97,58	8,10
	Folhas	Etanol-Água 75%	92,60	7,41
Lafoensia pacari	Entrecasca	Etanol-Água 75%	98,23	14,90
Stryphnodendron obovatum	Entrecasca	Etanol-Água 75%	97,64	20,17
Calophyllum brasiliense	Entrecasca	Hexano	93,30	10,36
		Diclorometano	95,26	4,20
		Acetato de Etila	89,80	5,20
		Metanol	95,31	16,69
		Etanol-Água	99,25	10,30
		Fração DCM2	95,00	21,26
	Folhas	Hexano	94,90	10,74
		Diclorometano	98,00	5,70
		Acetato de Etila	94,28	5,48
		Metanol	96,88	27,32
		Etanol-Água	97,45	8,40

Fonte: Extratos metanólicos. Jesus, N.Z.T. (2007) (140)

6.2 Triagem da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* dos extratos e fração DCM_2, pelo método de difusão em disco

Na **Tabela 2** estão apresentados os resultados da triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro,* pelo método de difusão em disco, dos extratos e fração das plantas *Vaitarea macrocarpa* (EM*Vm*), *Hyptis suaveolens* (EM*Hs*), *Hyptis crenata* (EM*Hc*), *Strychnos pseudoquina* (EM*Sp*), *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*), *Simaba ferruginea* (EHE*Sf*),

Lafoensia pacari (EHE*Lp*) e *Stryphnodendron obovatum* (EHE*So*). Mostraram-se ativos neste ensaio os extratos EM*Hc*, EHE*Sf*, EHE*So e* EHE*Cb*, sendo o último mais ativo, apresentando halos que variam de 8 a 14mm nas doses de 0,0625 a 1mg/disco. Os extratos EM*Vm,* EM*Hs,* EM*Sp* e EHE*Lp*, mostraram-se inativos.

Nessa mesma **Tabela 2** podem ser vistos também os resultados da avaliação anti-*Helicobacter pylori in vitro* de diferentes extratos da entrecasca, folhas e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense*. Da entrecasca, os extratos que apresentaram atividade foram diclorometânico e hidroetanólico, sendo o último mais ativo e potente, apresentando atividade até a dose de 0,25 mg/disco. Das folhas, os extratos ativos foram o hexânico e diclorometânico, sendo o primeiro mais ativo e potente, apresentando atividade até a dose de 0,5 mg/disco. Estes resultados mostram que os extratos da entrecasca foram mais ativos do que os das folhas.

A fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* mostrou a maior atividade e potência dentre os produtos testados, com halos de inibição que variou de 10 a 16 mm, sendo ativo até a dose de 0,125mg/disco.

A claritromicina (15µg/disco) utilizada como droga padrão do ensaio, apresentou halos de inibição muito superior aos extratos e fração, variando de 25 a 40 mm.

Tabela 2. Avaliação da atividade dos extratos das plantas e fração DCM_2 submetidas à triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro*, pelo método de difusão em disco.

Planta	Farmacógeno	Solvente	Diâmetro dos halos de inibição (mm)[a]					
			Dose (mg/disco)					
			0,0625	**0,125**	**0,25**	**0,50**	**1,00**	**Claritromicina 15 ug**
Strychnos pseudoquina		Metanol	-	-	-	-	-	28
Hyptis crenata	Planta inteira	Metanol	-	-	8	**10**	**12**	29
Hyptis suaveolens	Planta inteira	Metanol	-	-	-	-	-	30
Vaitarea macrocarpa	Cerne	Metanol	-	-	-	-	-	27
Lafoensia pacari	Entrecasca	Etanol-Água 75%	-	-	-	-	-	40
Simaba ferruginea	Rizoma	Etanol-Água 75%	-	-	8	8	**10**	23
	Folhas	Etanol-Água 75%	-	-	-	-	-	23
Stryphnodendron obovatum	Entrecasca	Etanol-Água 75%	-	-	8	**10**	**12**	26
Calophyllum brasiliense	Entrecasca	Hexano	-	7	-	7	8	35
		DCM	7	8	**10**	8	**10**	35
		Acetato de Etila	7	7	8	8	8	40
		Metanol	7	7	8	8	8	30
		Etanol-Água 75%	8	8	**10**	**12**	**14**	22
		Fração DCM2	8	**10**	**12**	**14**	**16**	30
	Folhas	Hexano	7	8	8	**10**	**12**	40
		DCM	-	-	-	8	**10**	42
		Acetato de Etila	-	-	-	-	-	35
		Metanol	-	-	-	-	-	25
		Etanol-Água 75%	-	-	-	-	-	25

[a]Considerados ativos os extratos ou fração com halos de inibição ≥10 mm (174)

6.3 Triagem da atividade anti-*Helicobacter pylori* dos extratos das plantas e fração DCM_2 *in vitro,* pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Na **Tabela 3** estão apresentados os resultados da triagem anti-*Helicobacter pylori in vitro,* pelo microdiluição em caldo, dos extratos das plantas *Vaitarea macrocarpa* (EM*Vm*), *Hyptis suaveolens* (EM*Hs*), *Hyptis crenata* (EM*Hc*), *Strychnos pseudoquina* (EM*Sp*), *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*), *Simaba ferruginea* (EHE*Sf*), *Lafoensia pacari* (EHE*Lp*) e *Stryphnodendron obovatum* (EHE*So*) e extratos e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense*. Mostraram-se ativos neste ensaio os extratos EM*Hc*, EHE*Sf*, EHE*Lp,* EHE*So e* EHE*Cb*, sendo os dois últimos mais ativos e potentes, apresentando CIMs de 31µg/mL, podendo ser comparáveis em termos de resultados por este método. Os extratos EM*Vm,* EM*Hs,* e EM*Sp*, mostraram-se inativos com CIMs >1.000µg/mL.

Nesta mesma tabela podem ser avaliadas as CIMs de diferentes extratos da entrecasca e folhas e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense*. Todos os extratos da entrecasca e folhas de *C. brasiliense* foram ativos, porém os extratos hexânico e hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca mostraram-se mais ativas e potentes, apresentado CIM de 31µg/mL.

Tabela 3. Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* dos extratos das plantas utilizadas na triagem e fração DCM_2, pelo método da microdiluição em caldo.

Planta	Farmacógeno	Solventes	CIM em µg/mL
Strycnos pseudoquina (EM*Sp*)	Entrecasca	Metanol	>1.000
Hyptis crenata (EM*Hc*)	Planta inteira	Metanol	250
Hyptis suaveolens (EM*Hs*)	Planta inteira	Metanol	>1.000
Vaitarea macrocarpa (EM*Vm*)	Cerne	Metanol	>1.000
Simaba ferruginea (EHE*Sf*)	Rizoma	Etanol-Água 75%	250
	Folhas	Etanol-Água 75%	62
Stryphnodendron obovatum (EHE*So*)	Entrecasca	Etanol-Água 75%	**31**
Lafoensia pacari (EHE*Lp*)	Entrecasca	Etanol-Água 75%	500
Calophyllum brasiliense	Entrecasca	Hexano	**31**
		Diclorometano	125
		Acetato de Etila	125
		Metanol	125
		Etanol-Água 75%	**31**
		Fração DCM_2	**31**
	Folhas	Hexano	62
		Diclorometano	125
		Acetato de etila	250
		Metanol	125
		Etanol-Água 75%	62

Considerados ativos as CIMs menosres que 1000µg/mL.

6.4 Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense*.

O extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense*, administrados via oral, não provocaram alterações comportamentais em camundongos, exceto nos animais que receberam as doses de 5000mg/kg do extrato hidroetanólico e 3000mg/kg da fração DCM_2, que apresentaram diarréia nas primeiras horas após a administração. A ocorrência de

outros sinais e sintomas e morte não foram observadas em nenhum dos animais dos grupos tratados **(Tabela 4**).

Tabela 4. Efeitos da administração oral do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre as atividades comportamentais gerais, em camundongos.

Dose (mg/kg v.o)	**Morte**	**Efeitos comportamentais**	
		EHE*Cb*	**Fração DCM_2**
250	0/3	Sem alterações	Sem alterações
500	0/3	Sem alterações	Sem alterações
1000	0/3	Sem alterações	Sem alterações
3000	0/3	Sem alterações	diarréia
5000	0/3	diarréia	---

6.5 Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori in vivo* do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense*.

A inoculação de *H. pylori* em animais ulcerados por ácido acético aumentou significativamente o volume da úlcera de 11,95±5,05 para 79,90±4,97 ($p<0,001$). O tratamento com extrato hidroetanólico de *C. brasiliense* nas doses de 50, 100 e 200mg/kg, reduziu o volume de úlcera nos animais ulcerados e inoculados com *H. pylori* significativamente para 22,17±11,00, 22,23±8,37 e 13,42±5,33, respectivamente ($p<0,001$). O tratamento com a fração DCM_2 de *C. brasiliense* nas doses de 100 e 200mg/kg reduziu para 20,90±4,98 e 9,25±2,87, respectivamente ($p<0,001$), conforme **Tabela 5**.

Tabela 5. Avaliação do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* sobre o retardo na cicatrização da úlcera gástrica induzida por ácido acético, na presença de *Helicobacter pylori*.

Grupo			***N***	**Área ulcerada (mm^2)[a]**	**Taxa de cura (%)**
Sham			9	0,00	-
Normal			10	0,00	-
Ulcerado			10	11,95 ± 5,05	-
Ulcerado / *H. pylori* (não tratado)			9	79,90 ± 4,97†††	-
Tratamento (mg/kg v.o.)	EHE*Cb*	50	6	22,17 ± 11,00***	72
		100	7	22,23 ± 8,37***	73
		200	8	13,42 ± 5,33***	83
	DCM_2	100	6	20,90 ± 4,98***	74
		200	8	9,25 ± 2,87***	88
	Padrão	[b]	10	0,00***	100

[a] Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.). ANOVA uma via, seguida do teste de Tukey-Kramer. †††p<0,001 - avaliação do grupo ulcerado inoculado com *H. pylori* versus grupo ulcerado e ***p<0,001 - avaliação dos grupos tratados versus grupo ulcerado com *H. pylori* sem tratamento. Tratamentos com: EHE*Cb* – extrato hidroetanólico e DCM_2 – fração, ambos da entrecasca de *Calophyllum brasiliense*. [b] Amoxicilina 50 mg/kg / Claritromicina 25 mg/kg / Omeprazol 20 mg/kg .

6.6 Análise sorológica para determinação dos anticorpos IgG anti-*Helicobacter pylori* pelo método ELISA.

As análises sorológicas para determinação dos anticorpos IgG anti-*H. pylori* foram negativas em todos os grupos ensaiados **(Tabela 6)**.

Tabela 6. Determinação dos anticorpos IgG anti-Helicobacter pylori pelo método Elisa.

Grupos			Anticorpos anti-*H. pylori* IgG [a](U/mL)
Normal			0,36±0,01
Ulcerado			0,30±0,03
Ulcerado / *H. pylori* (não tratado)			0,30±0,01
Tratamento (mg/kg v.o.)	EHE*Cb*	200	0,32±0,01
	DCM_2	100	0,29±0,01
		200	0,28±0,007
	Padrão	[b]	0,31±0,01

[a]Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 6-10 ratos/grupo. Valores de referência para o teste: Positivo >30 U/mL; Indeterminado 20 – 30 U/mL; Negativo <20 U/mL.
[b]Amoxicilina 50 mg/kg / Claritromicina 25 mg/kg / Omeprazol 20 mg/kg.

6.7 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre a expressão de citocinas anti e pró-inflamatórias.

Na **Tabala 7** podem ser vistos os valores das citocinas IL1-β, IL-10, TNF-α e VEGF. Os níveis basais (normal) foram de 0,553±0,37; 1,36±0,82; 0 e 0, respectivamente. No grupo ulcerado por ácido acético sem *H. pylori* foram de 0,218±0,16; 9,25±3,36; 0 e 0, respctivamente. No grupo ulcerado por ácido acético com *H. pylori*, os níveis de citocinas foram de 0,620±0,25; 20,02±7,90; 0 e 0, respectivamente. A inoculação de *H. pylori* promoveu um aumento siginificattivo apenas dos níveis de IL 10 (20,02±7,90, $p<0,05$), em relação ao grupo normal. O tratamento com o extrato hidroetanólico na dose de 200mg/kg e

fração DCM_2 nas doses de 100 e 200mg/kg não alterou os níveis de citocinas, em relação ao grupo ulcerado com *Hp*.

Tabela 7. Efeito do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* sobre os níveis plasmáticos das citocinas anti e pró-inflamatórias.

Grupos			IL-1β	IL-10	[a]TNF-α	[a]VEGF
Normal			0,553±0,37	1,36±0,82	0	0
Ulcerado			0,218±0,16	9,25±3,36	0	0
Ulcerado / *H. pylori* (não tratado)			0,620±0,25	20,02±7,90*	0	0
Tratamento (mg/kg v.o.)	EHE*Cb*	200	0,412±0,14	8,91±2,18	0	0
	DCM_2	100	1,415±0,14	12,14±5,06	0	0
		200	3,010±2,19	9,34±3,90	0	0
	Padrão	[b]	1,830±1,08	14,56±1,82	0	0

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de 6 animais/grupo. ANOVA uma via, seguida de teste de Dunnett. * $p<0,05$. [a] Indica que os valores ficaram abaixo da linearidade da curva de detecção, com base na curva de calibração para cada citocina. [b]Amoxicilina 50 mg/kg / Claritromicina 25 mg/kg / Omeprazol 20 mg/kg.

6.8 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre PGE_2 do raspado da mucosa gástrica

O tratamento com a fração DCM_2 de C. brasiliense na dose de 200mg/kg aumentou a concentração de PGE_2 na mucosa gástrica dos ratos ulcerados com ácido acético e inoculados por *H. pylori*, comparados ao grupo normal não ulcerado ($p<0,001$) e ao grupo ulcerado com ácido acético sem inoculação de *H. pylori* ($p<0,01$). O grupo ulcerado, inoculado com *H. pylori* e tratado com as drogas padrão para erradicação do *H. pylori*, também teve os níveis de PGE_2 aumentados com relação ao grupo normal não ulcerado ($p<0,01$) **(Figura 13)**.

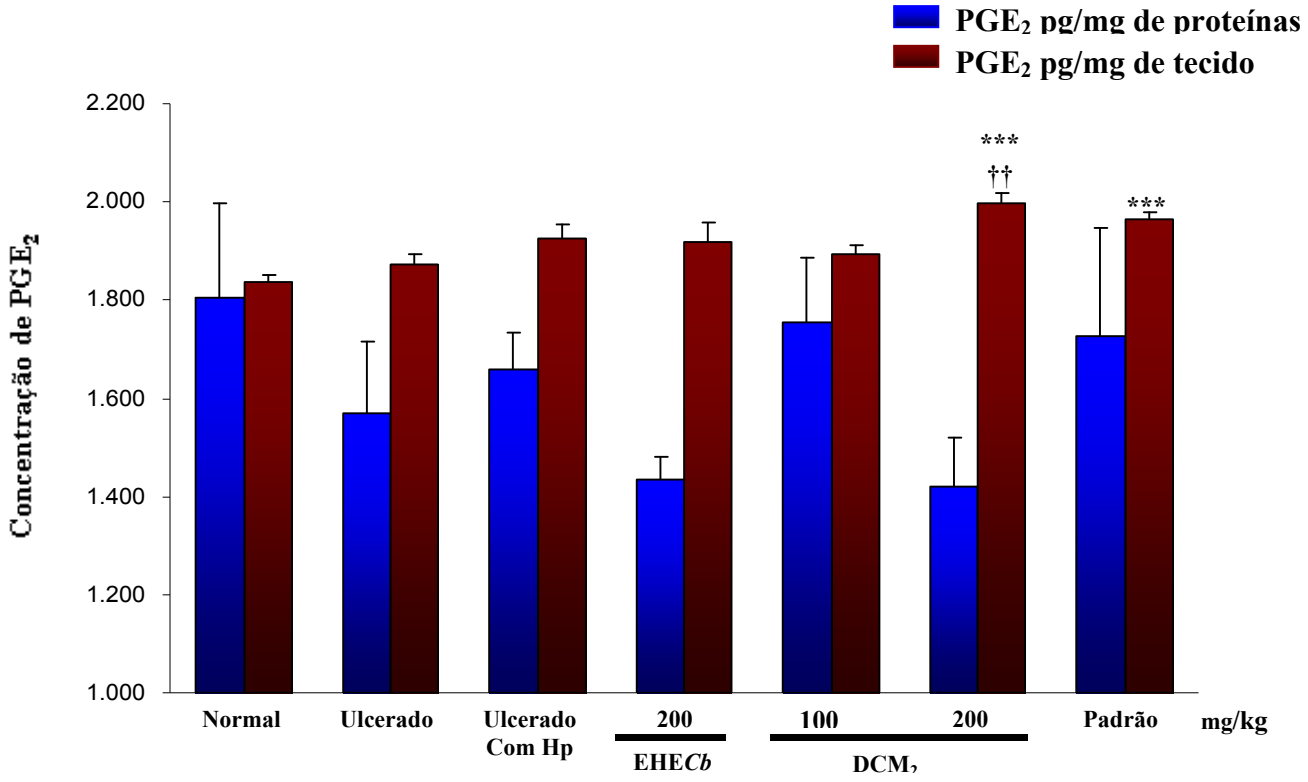


Figura 13. Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense* na concentração de PGE_2 da mucosa gástrica de ratos ulcerados e inoculados com *H. pylori*. Os ratos foram tratados durante 14 dias com extrato hidroetanólico na dose de 200mg/kg, fração DCM_2 nas doses de 100 e 200mg/kg e tratamento padrão: claritromicina 25mg/kg / amoxicilina 50mg/kg / omeprazol 20mg/kg. Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) de *n* de 6 a 10 animais por grupo. ANOVA uma via, seguida de teste de Tukey-Kramer. $^{***}p<0,001$ vs grupo normal não ulcerado; $^{††}p<0,01$ vs grupo ulcerado.

6.9 Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* sobre a produção de urease.

Na determinação da urease, todos os animais dos grupos sham, controle e ulcerado por ácido acético sem inóculo de *H. pylori* foram negativos, enquanto que o grupo ulcerado por ácido acético e inoculado com *H. pylori*, todos os animais apresentaram testes de urease positivos. O extrato hidroetanólico de *C. brasiliense* aumentou a negatividade do teste de urease, atingindo 75% ($p<0,01$) na dose de 200mg/kg. A fração DCM_2 teve negatividade do teste ainda mais acentuada, atingindo 89% ($p<0,001$) na dose de 200mg/kg, o que foi maior do que o resultado apresentado pelo grupo tratado com o esquema tríplice padrão

(Amoxicilina 50mg/kg, Claritromicina 25mg/kg e Omeprazol 20mg/kg) com 70% (p<0,01) de negatividade (**Tabela 8)**.

Tabela 8. Efeito do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* sobre a produção de urease pelo *H. pylori*.

Grupos			*n*	Uréase		Valores de *p*
				Positiva	Negativa	
Sham			9	0	9	-
Normal			10	0	10	-
Ulcerado			10	0	10	-
Ulcerado / *H. pylori* (não tratado)			9	9	0	-
Tratamento (mg/kg v.o.)	EHE*Cb*	50	8	3	5	0,009
		100	7	2	5	0,004
		200	8	2	6	0,002
	DCM_2	100	6	1	5	0,001
		200	8	1	7	0,0004
	Padrão	[b]	10	3	7	0,003
Total			**85**	**21**	**64**	

Tratamento com extrato hidroetanólico (EHE*Cb*) nas doses de 50, 100 e 200mg/kg e com 100 e 200 mg/kg da fração DCM_2 de *C. brasiliense.* [b] amoxicilina 50 mg/kg / claritromicina 25 mg/kg / omeprazol 20 mg/kg. O teste exato de Fisher foi empregado para comparações das freqüências dos grupos tratados versus ulcerado com *Hp.*

6.10 Análise histopatológica

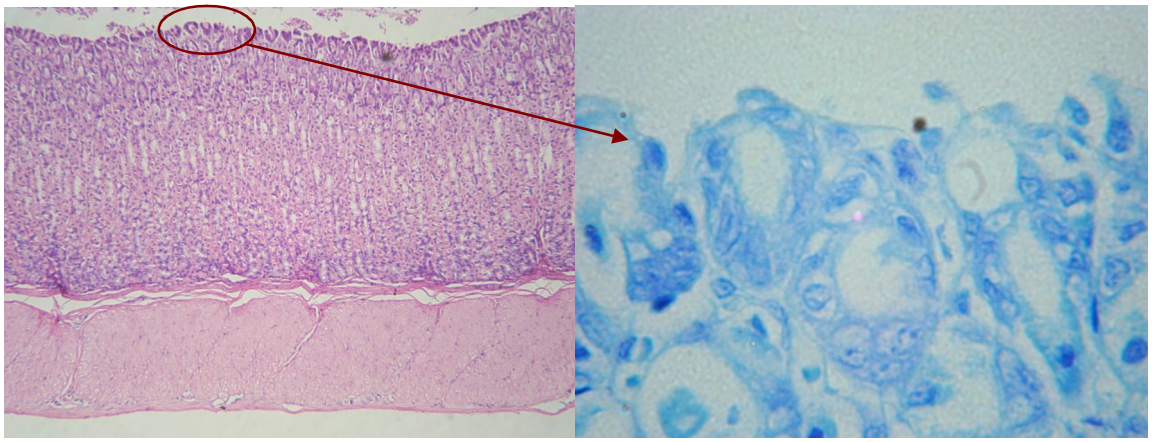
Todos os animais dos grupos normal e Sham mostraram mucosa gástrica intacta, não apresentando qualquer alteração em suas morfologias. No grupo ulcerado por ácido acético sem inoculação de *H. pylori,* observou-se um animal (10%) com presença de inflamação, alterações regenerativas e persistência da úlcera/erosão. O grupo ulcerado por ácido acético e inoculado por *H. pylori* apresentou maior número de animais com inflamação (89%, p<0,001), atividade (44%, p<0,05) e persistência da úlcera/erosão (78%, p<0,001) comparado ao grupo ulcerado não inoculado. No grupo tratado com drogas padrão para erradicação do *H. pylori*, um animal (10%) mostrou inflamação e alteração regenerativa e nos grupos tratados

com extrato e fração DCM_2 de *C. brasiliense*, houve redução significativa ($p<0,05$), no número de animais que apresentaram inflamação e persistência da úlcera/erosão nas doses de 100 e 200mg do extrato hidroetanólico e de 100 e 200 mg/kg da fração DCM_2. Com relação à presença do *H. pylori,* os grupos tratados com extrato hidroetanólico nas doses de 100 e 200mg/kg apresentaram diminuição significativa (2/7 e 1/8 $p<0,01$ e $<0,001$) respectivamente, na observação deste patógeno; com a fração DCM_2 nas doses de 100 e 200mg/kg de *C. brasiliense,* observou-se ausência do *H. pylori* na mucosa gástrica de todos os animais (**Tabela 9 e Figura 14).**

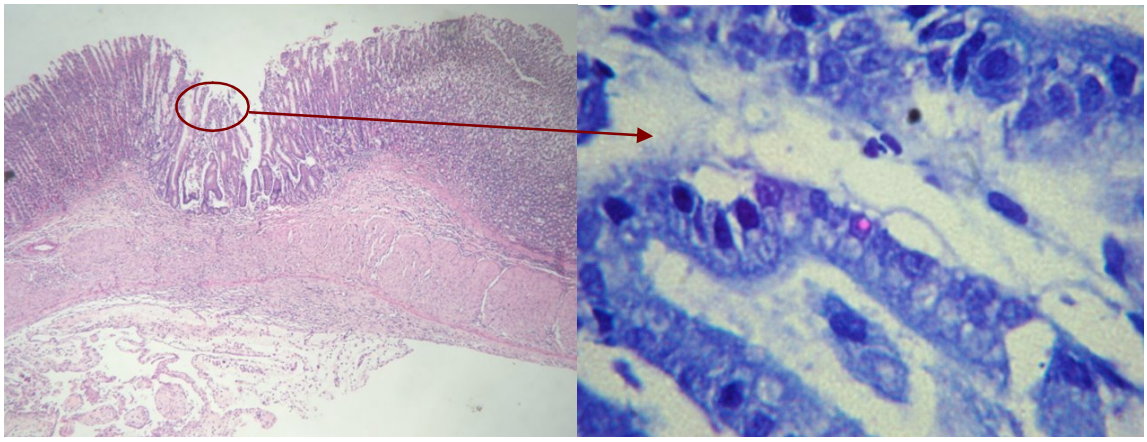
Tabela 9. Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* através da análise histopatológica.

Grupos			***H. pylori***	**Inflamação**	**Atividade**	**Regeneração**	**Persistência da úlcera/ erosão**	**Atrofia**	**Metaplasia**
Sham			0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
Normal			0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Ulcerado			0/10	1/10	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10
Ulcerado / *H. pylori* (não tratado)			9/9†††	8/9†††	4/9†	2/9	7/9†††	0/9	0/9
Tratamento (mg/kg v.o.)	EHE*Cb*	50	3/8**	6/8	3/8	1/8	4/8	0/8	0/8
		100	2/7**	2/7**	0/7	2/7	0/7**	0/7	0/7
		200	1/8***	2/8**	2/8	2/8	2/8*	0/8	0/8
	DCM_2	100	0/7***	2/7**	1/7	4/7	4/7	0/7	0/7
		200	0/8***	2/8**	0/8	2/8	2/8*	0/8	0/8
	Padrão	[b]	0/10***	1/10***	0/10*	1/10	0/10***	0/10	0/10

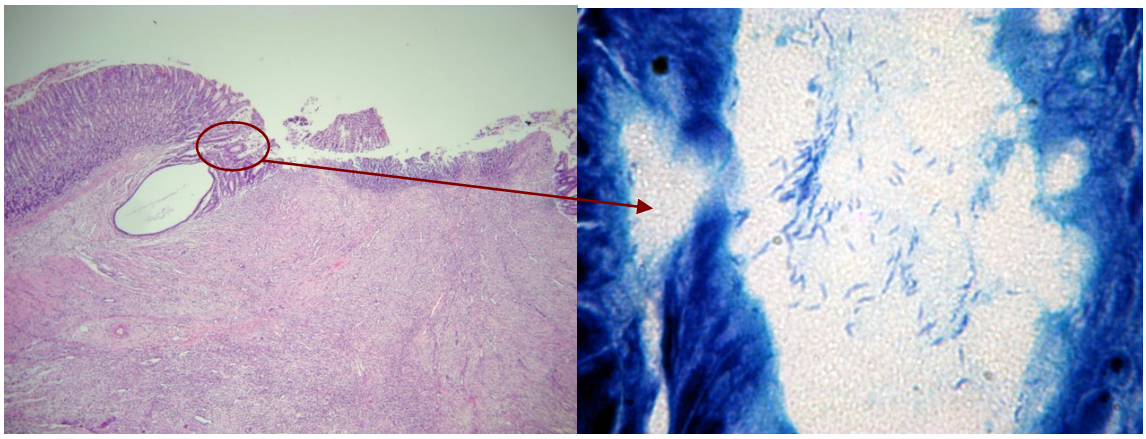
As abreviações dos extratos hidroetanólico e fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* foram EHE*Cb* e DCM_2, respectivamente. b amoxicilina 50 mg/kg / claritromicina 25 mg/kg / omeprazol 20 mg/kg. †p<0,05; ††p<0,01; †††p<0,001 foram utilizados na comparação do grupo ulcerado com *H. pylori* versus grupo ulcerado e *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 foram utilizados nas comparações dos grupos tratados versus grupo ulcerado com *H. pylori* sem tratamento. Teste exato de Fisher.



A – Controle normal



B – Ratos ulcerados por ácido acético



C – Ratos ulcerados e inoculados com *H. pylori*

Figura 14. Fotomicrografia da parede gástrica. A - parede gástrica não ulcerada de ratos normais (HE 100X e Giemsa 1000X); B - Aparência histológica da reepitelização da úlcera gástrica induzida por ácido acético após 17 dias de indução da úlcera por ácido acético sem a inoculação de *H. pylori* (HE 40X e Giemsa 1000X); C – persistência da úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos inoculados com *H. pylori*, após 17 dias de ulceração (HE 40X e Giemsa 1000X).

6.11 Abordagem fitoquímica preliminar dos extratos hidroetanólicos da entrecasca e folhas e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*).

Os resultados das análises fitoquímicas estão apresentados na **Tabela 10**.

A análise fitoquímica preliminar do extrato hidroetanólico da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* revelou as presenças de alcalóides, antraquinonas, catequinas, compostos fenólicos, esteróides, flavanonas, flavanóides, flavanóis, flavanonóis, leucoantocianidinas, saponinas e xantonas.

O extrato hidroetanóico das folhas de *Calophyllum brasiliense* revelou as presenças de alcalóides, antraquinonas, catequinas, compostos fenólicos, esteróides e saponinas.

A fração DCM_2 da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* apresentou catequinas, compostos fenólicos, cumarinas, esteróides, flavanonas, favanóides, flavanóis, flavanonas, taninos, triterpenóides e xantonas.

Tabela 10. Análise fitoquímica preliminar dos extratos hidroetanólicos da entrecasca e folhas e fração DCM_2 de *Calophyllum brasiliense* (EHE*Cb*).

Classe química	**EHE*Cb* Entrecasca**	**EHE*Cb* Folhas**	**[a]DCM_2 Entrecasca**
Alcalóides	+	+	0
Antraquinonas	+	+	-
Catequinas	+	+	+
Compostos fenólicos	+	+	+
Cumarinas	-	-	+
Esteróides	+	+	+
Flavanonas	+	-	+
Flavanóides	+	-	+
Flavanóis	+	-	+
Flavanonas	+	-	+
Flavanonóis	+	-	-
Leucoantocianidinas	+	-	-
Saponinas	+	+	-
Taninos	-	-	+
Triterpenóides	-	-	+
Xantonas	+	-	+

Positivo (+); Negativo (-). Não realizado (0); [a]Fonte: DCM_2 Sartori, NT, 1997 (20).

Na fração DCM_2 da entrecasca de *C. Brasiliense* foi demonstrada a presença das cromanonas: ácido inofilóidico, ácido brasiliênsico e ácido isobrasiliênsico (29).

7. DISCUSSÃO

O Brasill possui cinco áreas de grande abundância de plantas nativas, estando entre elas o bioma Cerrado. Esse bioma é apontado como grande detentor de diversidade biológica, sendo a formação savânica apontada com a maior diversidade vegetal do mundo, especialmente quando se consideram as espécies lenhosas (141).

Existem mais espécies vegetais (diversidade específica) em áreas amostrais de Floresta Amazônica do que nas de Cerrado de mesmo tamanho, salientando, porém, que a diversidade taxonômica é certamente muito maior no último. Essa diversidade é relativa aos táxons mais elevados (gênero, família e ordem), mostrando a importância do Cerrado para pesquisas com plantas medicinais. Isto porque, quanto maior for a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas. Por isso, a gama e o potencial de compostos bioativos produzidos pelas espécies do Cerrado seriam maiores que as da Floresta Amazônica (26).

Dentre as plantas de ocorrência no Cerrado, *Calophyllum brasiliense* tem recebido especial destaque, não só por seus aspectos químicos e farmacológicos (27), como também por estar sendo produzida em larga escala no país, para atender a projetos de reflorestamento (142), facilitando a disponibilidade do farmacógeno para a produção de possível fitoterápico.

As doenças gastrintestinais são uma das causas mais importantes de morbidade em países não industrializados e muitos medicamentos empregados para o tratamento de úlceras pépticas têm diminuído estas taxas de morbidade, porém podem produzir muitos efeitos adversos, além do alto custo financeiro para populações mais carentes (143). O uso de plantas medicinais e o desenvolvimento de fitoterápicos, a baixo custo, representariam uma alternativa para o tratamento dos problemas gastrintestinais a uma grande parcela da população que não tem acesso a medicamentos (28).

A infecção por *H. pylori* é a principal causa de úlcera péptica, sendo sua prevalência mundial em tono de 40% em países desenvolvidos e mais de 80% em países em desenvolvimento (144). Numerosos estudos tem se concentrado na erradicação da infecção

pelo *H. pylori* usando plantas medicinais tradicionais (121), visto que as drogas utilizadas na prática médica atual no tratamento da úlcera gastroduodenal e/ou adenocarcinoma gástrico vêm apresentando resistência e têm levado a uma taxa de cura incompleta, além de apresentarem efeitos colaterais e alto custo no tratamento, em geral por múltiplos medicamentos (145, 146).

Nesse estudo foi realizada inicialmente uma triagem da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro*, pelos métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, considerados os mais comumente utilizados para a triagem de extratos de plantas com potencial antibacteriano (147).

Os extratos metanólicos de Vatairea macrocarpa (EMVm), Hyptis suaveolens (EMHs), Hyptis crenata (EMHc) e Strychnos pseudoquina (EMSp); hidroetanólicos de Simaba ferruginea (EHESf – rizoma e folhas), Lafoensia pacari (EHELp), Stryphnodendron obovatum (EHESo) e Calophyllum brasiliense (EHECb – folhas e entrecasca) foram submetidos a triagem anti-H. pylori in vitro (difusão em disco e microdiluição em caldo), visando a seleção de um extrato para continuidade dos estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos. Ressalte-se que todas são plantas medicinais ensaiadas encontram-se no cerrado mato-grossense e tem ampla utilização popular para o tratamento de afecções gastroduodenais e outras, já que uma planta medicinal nunca tem uma única indicação terapêutica (140).

O método da difusão em disco é recomendado para o estudo de substâncias polares, permitindo a avaliação de diferentes compostos contra um microorganismo e assim o estabelecimento de seu espectro antibacteriano. Para extratos não-polares, o uso de técnicas de difusão parece ser inadequado, em virtude da dificuldade de difusão no ágar, embora muitos trabalhos com este tipo de técnica tenham sido publicados (148).

Os resultados da triagem anti-*H. pylori* pelo método de difusão em disco demonstram que os extratos e fração DCM_2 de *C. brasiliense* possuem atividade anti-*H. pylori in vitro*. Os EM*Hc*, EHE*Sf* e EHE*So* também apresentaram atividade, embora menores que os observados para *C. brasiliense*. Por outro lado, os EHE*Lp,* EM*Sp,* EM*Hs* e EM*Vm* não apresentaram nenhuma atividade anti-*H. pylori in vitro*, por este método.

Dos extratos das plantas triadas pelo método da difusão em disco, *C. brasiliense* foi a que apresentou a maior atividade anti-*H. pylori*, sendo esta distribuída em todos os extratos da entrecasca da planta e relacionada às presenças de compostos de naturezas e polaridades diferentes. No entanto, os compostos mais ativos contra *H. pylori* concentram-se nos extratos hidroetanólico (mais polar) e hexânico (mais apolar), podendo esta ação, responder, em parte, pelos resultados antiúlceras encontrados por Sartori (28) nos extratos metanólico e hexânico de *C. brasiliense*. Conforme abordagem fitoquímica preliminar realizada nesse estudo e os achados da literatura (31, 146), são candidatos prováveis à ação anti- *H. pylori in vitro* do EHE*Cb* (predominantemente polar) as xantonas (30), não descartando-se os flavonóides (146) e as catequinas (42). No caso do EH*Cb* (apolar), pode-se apontar, com base na literatura, em nossos resultados fitoquímicos e no trabalho de Canepelle et al. (29) com a fração DCM_2 (predominatemente apolar) como prováveis responsáveis por esta ação as cromanonas - ácidos brasiliênsico, isobrasiliênsico e inofilóidico (149), sem descartar as xantonas preniladas (30), cumarinas (18), catequinas (42) e flavonóides (146).

Na triagem anti-*H. pylori in vitro*, pelo método da microdiluição em caldo, confirma-se a potente ação anti-*H. pylori* dos extratos hidroetanólico e hexânico da entrecasca de *C. brasiliense*, sendo este resultado comparável somente ao observado para o EHE*So*.

No método de microdiluição em caldo, o composto teste é misturado ao meio líquido apropriado, previamente inoculado com o microorganismo, permitindo determinar se um composto é bacteriostático (mínima concentração bacteriostática) ou bactericida (mínima concentração bactericida – CIM). Apresenta maior sensibilidade às drogas do que o método de difusão em disco, por permitir o contato direto entre a droga e o microorganismo, sendo, portanto, apropriado para ensaios de substâncias polares e não-polares (148).

Em ambos os modelos, difusão em disco e microdiluição em caldo, a purificação do extrato hexânico com obtenção da fração DCM_2, levou a uma maior potência e atividade anti-*H. pylori in vitro* para *C. brasiliense.* Da fração DCM_2, Caneplelle et al. (29) isolaram os ácidos brasiliênsico, isobrasiliênsico e inofilóidico. Pretto et al. (35) não detectaram qualquer atividade antibacteriana para o ácido brasiliênsico. Por outro lado, Cottiglia et al. (149) mostraram potente atividade contra bactérias gram-positivas para os ácidos brasiliênsico e isobrasiliênsico. É provável que na atividade anti-*H. pylori in vitro* observada para a fração DCM_2 estejam envolvidos essas três cromanonas.

Por apresentar maior potência e atividade anti-*H. pylori* nos testes *in vitro*, o extrato hidroetanólico e a fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* foram selecionados para realização de ensaios anti-*H. pylori in vivo*.

Para avaliar a toxicidade do EHE*Cb* e da fração DCM_2 de *C. brasiliense*, bem como estimar as doses a serem empregadas nos testes *in vivo*, realizou-se o teste hipocrático. Nesse ensaio, o extrato hidroetanólico e a fração DCM_2 não apresentaram sinais e sintomas de toxicidade aguda oral nos camundongos, a não ser uma discreta e reversível diarréia, nos grupos que receberam as maiores doses (5 e 3 g/kg, respectivamente). Conforme vistos na Tabela 3, o extrato hidroetanólico mostrou menor tendência de toxicidade aguda do que a fração DCM_2, possivelmente por apresentar compostos polares, menos absorvíveis e mais facilmente metabolizados e excretados. Sartori et al. (31) demonstraram que doses orais de até 600 mg/kg da fração DCM_2 não provocaram alterações comportamentais nos animais e mesmo com 1g/kg nenhum dos animais veio a óbito. No estudo de toxicidade sub-crônica, Sartori (28) mostrou baixa toxicidade oral, em ratos, para a fração DCM_2.

Tendo em vista a ausência aparente de toxicidade aguda oral para o extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense* (31) e a baixa toxicidade sub-crônica referida para DCM_2 (28), avaliou-se a atividade anti-*Helicobacter pylori in vivo* destes, usando-se o modelo de úlcera crônica por ácido acético e posterior inoculação com *H. pylori*, em ratos Wistar, empregando-se o método modificado de Okabe e Pfiffer (150).

É de conhecimento que os ratos não desenvolvem úlceras espontâneas. A úlcera crônica por injeção de ácido acético na área da subserosa gástrica, diferentemente de úlceras agudas, penetra na camada muscular da área glandular e ocasionalmente reincide após cicatrização, deste modo assemelhando-se com a úlcera gástrica humana, em termos de característica patológica e de processo cicatricial (150), sendo, portanto, escolhida para estudo da atividade anti-*H. pylori* do extrato hidroetanólico e fração DCM_2 de *C. brasiliense*.

Na tentativa de estabelecer a ligação patogênica entre o *H. pylori* e as injúrias gastroduodenais, numerosos modelos animais têm sido investigados. Os estudos prévios utilizaram furão, macacos, camundongos e porcos para avaliar a habilidade do *H. pylori* ou espécies relacionadas, em produzir inflamação gástrica que pudesse simular a gastrite aguda e crônica humanas (151).

Bui et al. (151) foram os primeiros a descreverem que a inoculação de *H. pylori* poderia retardar a cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético, em ratos Sprague-Dawley, mas nenhuma tentativa foi feita para elucidar este efeito.

O estabelecimento de infecção persistente por *H. pylori* em animais de laboratório e que reproduza completamente as características básicas da infecção em humanos (uma intensa gastrite ativa crônica antral ou difusa) e suas complicações (atrofia da mucosa e metaplasia intestinal) ou suas patologias associadas (úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma), não é uma tarefa fácil. Em 1996, Hirayama et al. (152) descobriram que o gerbil mongoliano (*Meriones unguiculatus*) pode ser facilmente infectado com *H. pylori*, resultando em úlceras crônicas gástricas de alta incidência, modelo este que mimetiza a infecção humana. Ikeno et al. (153) complementaram esse modelo, caracterizando histológica e histoquimicamente a mucosa gástrica normal e infectada com *H. pylori* destes animais. No entanto, o desenvolvimento da úlcera gástrica ocorre de forma bastante lenta, levando pelo menos 24 semanas após a inoculação da bactéria (153, 154). Segundo Keto et al. (155), o *H. pylori* retarda a cicatrização de úlceras gástricas por ácido acético em gerbis de forma semelhante ao observado em ratos e camundongos.

Li et al. (156) forneceram uma evidência que a inoculação de cepas de *H. pylor*i CagA e VacA negativas também retardam a cicatrização de úlceras gástricas possivelmente por excessiva apoptose, sem, no entanto, determinarem as secreções endócrina e exócrina gástricas no curso da cicatrização e sem estabelecerem as comparações com cepas de *H. pylor*i CagA e VacA positivas.

Konturek et al. (157) em estudo mais completo, analisaram o efeito da inoculação em camundongos BALB/c com cepas de *H. pylori* CagA e VacA positivas e negativas, mostrando redução das secreções de gastrina e pepsina gástricas seguida de aumento na gastrina plasmática e queda no conteúdo de somatostatina luminal. A área ulcerada do grupo veículo iniciou a redução a partir do 2º dia de indução da úlcera, com completa cicatrização no 28ª dia, ao contrário do ocorrido nos grupos tratados com cepas de *H. pylori,* particularmente no grupo CagA e VacA positivas. O fluxo sangüíneo gástrico foi reduzido e mudanças histopatológicas como edema ou congestão da superfície epitelial após 7 dias, infiltração inflamatória após 14 dias com aumento após 28 dias da inoculação e aumentos dos níveis de IL-1β e IL-12, foram constatados em todos os dias testados, sendo maiores no grupo CagA e VacA positivas.

Nossos resultados indicam que ratos Wistar com úlceras gástricas pré-existentes, produzidas experimentalmente pela injeção de ácido acético, desenvolveram úlceras ativas quando expostas ao *H. pylori*, de modo semelhante aos obtidos por Konturek (157, 93, 158), utilizando espécies animais diferentes. Mais recentemente, Ibrahim et al. (159), ao adaptarem o método de Okabe e Pfiffer (150), desenvolveram o modelo de infecção em ratos Wistar por *H. pylori*, obtido de cepas de isolados clínicos, pela indução prévia de úlcera crônica gástrica por ácido acético, para avaliação da atividade anti-*H. pylori in vivo* de extratos de plantas medicinais, porém sem informar se a inoculação pela bactéria interferiu no processo cicatricial, apesar de demonstrar no exame histopatológico a presença do *H. pylori*.

A administração oral do EHE*Cb* e DCM_2 em ratos Wistar ulcerados com ácido acético e inoculados com *H. pylori* acelerou a cicatrização da lesão ulcerosa, com potências e atividades semelhantes, porém de modo menos intenso do que o tratamento com as drogas padrões. Sartori (28), em sua dissertação, usando extratos da entrecasca de *C. brasileinse*, refere-se ao efeito preventivo do extrato metanólico sobre as úlceras gástricas agudas induzidas por etanol e indometacina em ratos, dos extratos diclorometânico e hexânico sobre as úlceras agudas induzidas por etanol e indometacina em camundongos e do extrato hexãnico sobre as úlceras agudas induzidas por indometacina na mesma espécie animal. Sartori et al. (31) mostraram que a fração DCM_2, oriunda do extrato hexãnico da entrecasca de *C. brasiliense* reduziu o desenvolvimento de lesões gástricas agudas em ratos e camundongos, por inibição da produção de secreção gástrica e da acidez livre e total, bem como pelo aumento da produção de muco e dos níveis de compostos sulfidrílicos da mucosa gástrica. Em seu estudo, Reyes-Chipa et al. (18) mostraram inibição da bomba H^+, K^+ -ATPase gástrica por xantonas preniladas isoladas do extrato metanólico do cerne de *C. brasiliense*.

A infecção humana ou animal por *H. pylori* é acompanhada por uma forte produção de anticorpos dos tipos IgG e IgA, tanto no soro como na mucosa gástrica (104). Testes sorológicos podem detectar anticorpos específicos para *H. pylori* tanto no soro quanto na saliva. Ensaios sorológicos são os únicos testes que não dão resultados falso-positivos em pacientes cuja infecção tenha sido erradicada. Tanto os ensaios IgA quanto IgG têm sido desenvolvidos, mas a sensibilidade do método IgG é um pouco maior. Os títulos de anticorpos de *H. pylori* diminuem, embora devagar, após a erradicação da infecção, assim a queda nos níveis de anticorpos depois de um período de meses pode ser considerada uma indicação de sucesso da terapia. Nesse estudo, os resultados das dosagens sorológicas de anticorpos IgG

anti-*H. pylori,* em ratos Wistar com úlcera gástrica crônica e inoculados com *H. pylori*, realizadas após 2 semanas da inoculação foram negativos. Kumagai et al. (160) referem que a resposta primária à IgG aparece após 2 a 8 semanas da inoculação do *H. pylori*, em gerbis, sem quadro de gástrica estabelecida. Diferenças no tempo para a realização do ensaio de ELISA, diferenças de espécies animais e do modelo utilizado podem explicar a negatividade observada para a resposta à IgG em nosso estudo.

Para avaliar o efeito do EHE*Cb* e da fração DCM_2 em animais ulcerados por ácido acético e inoculados com *H. pylori*, as citocinas IL-1β, IL-10 e TNF-α e o VEGF foram determinados no plasma dos animais e a PGE_2 na mucosa gástrica.

Nos últimos anos, as evidências acumuladas sugerem que em ambos os modelos animais e humanos, a resposta imune celular do hospedeiro é uma importante determinante no curso da infecção por *H. pylori* (157). O padrão de resposta é uma mistura de Th1-Th2-T, com infiltrado neutrofílico e mononuclear no início e após a cicatrização da úlcera. Os indivíduos infectados expressam citocinas pró (IFN-γ, IL-1β, IL-8, IL-12A, TNF-α, IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) em suas mucosas gástricas, sendo estas últimas implicadas na manutenção do estado crônico da infecção (106).

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa que medeiam muitas das funções dessas células, produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos (161).

A citocina pró-inflamatória IL-1β é o mais potente dos agentes conhecidos que são citoprotetores gástricos, antiúlceras, anti-secretórios e inibidores do esvaziamento gástrico (109, 164). Ela age sobre as células parietais através do aumento da síntese de PGE_2 (16, 163), como também via inibições da atividade da ornitina descarboxilase e da liberação de histamina na mucosa gástrica (93, 164) e elevação do NO (175). Nossos resultados apontam elevação não significante dos níveis de Il-1β ($p>0,05$), possivelmente em virtude do elevado erro padrão no grupo Ulcerado com *H. pylori*, quando tratado com a fração DCM_2 (200mg/kg), o que pode ter contribuído para a redução da injúria gástrica.

TNF- α, uma outra citocina pró-inflamatória, também inibe a secreção gástrica, porém em menos extensão que a IL-1β (109).

A produção da mucosa gástrica de IL-10 e TNF- α encontra-se elevada em pacientes com gastrite crônica associada à infecção por *H. pylori*.e a secreção de citocinas da mucosa gástrica varia com importantes aspectos histopatológicos da inflamação gástrica (165). Embora a secreção de IL-10 na infecção por *H. pylori* possa ser protetora por inibir a resposta imune mediada por células, por outro lado o limitante dano tecidual causado pela inflamação

pode contribuir com a falha da resposta imune em eliminar o microorganismo (100). Em nosso estudo, os níveis de IL-10 aumentaram significativamente apenas no grupo de animais ulcerados com ácido acético e inoculados com cepas de *H. pylori* (CagA e VacA positivas) sem tratamento, estando em acordo com os trabalhos de Bodger et al (165) e Karttunen et al (166). O EHE*Cb* e a fração DCM_2 reduziram os níveis de IL-10 no grupo de animais ulcerados com ácido acético e inoculados com cepas de *H. pylori* (CagA e VacA positivas) aos valores do grupo Ulcerado, embora de modo não significante ($p>0,05$), talvez em virtude do elevado erro padrão no grupo Ulcerado com *H. pylori*, possivelmente por sua ação anti-*H. pylori*.

VEGF tem sido apontada como um fator que promove a cicatrização da úlcera gástrica, possivelmente por estimular a angiogênese ou a proliferação da matriz extracelular, que inclui a deposição de colágeno na base da úlcera (136).

Nesse estudo não foi possível avaliar a participação do TNF-α e VGEF no efeito anti-*H. pylori/*anti-úlcera do EHE*Cb* e da fração DCM_2, visto que estes fatores estavam abaixo dos limites de detecção, em todos os grupos experimentais ensaiados.

Adicionalmente, tem sido demonstrado que a PGE_2, derivada da COX-1 e COX-2, está envolvida na regulação da inflamação da mucosa gástrica e também contribui para a manutenção da integridade desta durante a infecção por *H. pylori* via vários mecanismos, incluindo o aumento do fluxo gástrico da mucosa, da síntese de muco e bicarbonato e inibições da motilidade gástrica, da liberação de enzimas e radicais livres de neutrófilos e da secreção gástrica (167, 168). Em nosso estudo, o nível de PGE_2 foi elevado apenas nos grupos que receberam DCM_2 na dose de 200 mg/kg e as drogas padrões (esquema tríplice), quando se quantificou este mediador em termos teciduais, indicando a participação da PGE_2 no efeito antiúlcera da fração DCM_2, mas não do EHE*Cb* de *C. brasiliense*.

Como demonstrados nesse estudo, o EHE*Cb* e a fração DCM_2 apresentaram ações anti-*H. pylori in vitro*. A interpretação desses dados, porém deve ser feita à luz das limitações inerentes da experimentação *in vitro* que é muito valiosa no esclarecimento de mecanismos fisiopatológicos, porém não devem ser diretamente extrapolados para a situação *in vivo* onde atuam inúmeros fatores não controlados. Assim, avaliou-se o efeito do EHE*Cb* e fração DCM_2 em modelo animal com úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético e inoculado com *H. pylori*.

Para comprovação da presença do *H. pylori in vivo* foram realizados o teste de urease e a análise histopatológica, monitorados pelo grau de lesão gástrica.

A urease, uma enzima produzida pelo *H. pylori*, atua promovendo a hidrólise da uréia substrato este presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia que atua como receptor de íons H^+, gerando pH neutro no interior da bactéria, contribuindo para a sobrevivência destes organismos no ambiente estomacal altamente ácido (91). O teste rápido de urease é considerado um dos mais úteis e mais baratos entre os ensaios invasivos, com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 89,5% (169), porém resultados falso-positivos podem ocorrer, pois também existem outras espécies bacterianas que podem ser isoladas da cavidade oral e/ou gástrica (*Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus*) e que são produtoras de urease (170). Nossos resultados mostram que o EHE*Cb* e a fração DCM_2 reduziram de forma significativa e superior ao padrão o número de animais que apresentaram teste de urease positivo, indicando presença de atividade anti-*H. pylori in vivo*.

O exame histopatológico é considerado um dos testes mais específicos no diagnóstico da infecção pelo *H. pylori,* apresentando sensibilidade de 98% e especificidade de 97% (171, 169).

Os achados histopatológicos confirmam os resultados encontrados no teste de urease, no qual o tratamento com EHE*Cb* e DCM_2 dos animais ulcerados e colonizados com *H. pylori*, reduz a detecção do microorganismo no corte histológico corado por Giemsa, sendo que a fração DCM_2 comportou-se de modo semelhante ao padrão para este ensaio. Além disso, parâmetros como inflamação, persistência da úlcera e atividade neutrofílica característicos do quadro infeccioso por *H. pylori* foram reduzidos pela administração do EHE*Cb* e DCM_2, porém de formas menos intensas do que o padrão, confirmando a ação anti-*H pylori* dos preparados de *C. brasiliense*.

Na abordagem fitoquímica preliminar realizadas para o EHE*Cb* e fração DCM_2, destacam-se as presenças de xantonas e flavonóides, em ambos as preparações, indicando que na ação gastroprotetora e anti- *H. pylori* do EHE*Cb* e fração DCM_2 podem estar envolvidas as xantonas, além dos flavonóides, atuando por mecanismos distintos. Adicionalmente, Canepelle et al. (29) isolaram da mesma fração DCM_2, as cromanonas - ácidos brasiliênsico, isobrasilênsico e inofilóidico – potenciais compostos responsáveis pelos efeitos antiúlceras observados nesse estudo com DCM_2.

Com base nos resultados obtidos e os achados da literatura, faz-se necessário o isolamento dos princípios ativos presentes no EHE*Cb* e DCM_2, de modo a caracterizar-se os

responsáveis pela atividade anti-ulcera /anti- *H. pylori.* Além do mais, novos ensaios precisam ser realizados, como o de isolamento do microorganismo após colonização gástrica, disponibilizando assim, mais um teste diagnóstico para avaliação da atividade anti- *H. pylori*. Paralelamente a esse ensaio, seria importante avaliar o EHECb e DCM_2 em diferentes estágios da infecção, visando a detecção de anticorpos anti-*H. pylori* IgG e IGA.

CONCLUSÃO

Com base na análise dos resultados obtidos e fundamentação teórica podemos concluir que:

- *Calophyllum brasiliense*, *Hyptis crenata*, *Simaba ferruginea*, *Stryphnodendron obovatum* e *Lafoensia pacari* apresentaram atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro*. Os extratos de *Strychnos pseudoquina, Hyptis suaveolens* e *Vaitarea macrocarpa* foram inativos em ambos os bioensaios;
- Os EHE*Cb* e EH*Cb* da entrecasca de *C. brasiliense* foram os mais potentes e ativos nos ensaios anti-*H. pylori in vitro*;
- O EHE*Cb* e a fração DCM_2 da entrecasca de *C. brasiliense* mostraram baixa toxicidade para camundongos Swiss, quando administrado pela via oral;
- EHE*Cb* e fração DCM_2 mostraram-se com atividade anti-*H. pylori* em ratos Wistar com úlcera prévia induzida, sendo a fração DCM_2 mais ativa;
- Os níveis das citocinas IL1-β, TNF-α e VEGF não diferiram entre os diferentes grupos analisados;
- Os níveis da citocina IL10 estavam elevados no grupo com úlcera gástrica, inoculado com *H. pylori*, mostrando que havia um processo de cronificação da úlcera;
- Os níveis de PGE_2 estavam elevados no grupo tratado com a dose de 200mg/kg da fração DCM_2, indicando ação gastroprotetora dependente em parte deste eicosanóide;
- O EHE*Cb* e a fração DCM_2 reduziram de modo superior ao esquema tríplice padrão, o número de animais que apresentaram teste de urease positivo,
- O EHE*Cb* e a DCM_2, reduziram a detecção do microorganismo no corte histológico corado pelo Giemsa, bem como a inflamação, persistência da úlcera e atividade neutrofílica pela H-E;
- As análises fitoquímicas para o EHE*Cb* e DCM_2 revelaram que a entrecasca de *C. brasiliense* possui diversas classes de metabólitos secundários, com destaques para os flavonóides, xantonas e cromanonas (ácidos brasiliênsico, isobrasiliênsico e inofilóidico) isoladas da fração DCM_2, potenciais classes de metabólitos e compostos responsáveis pelos efeitos anti-*H. pylori/*antiúlcera destes preparados;

- Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* somados aos achados descritos na literatura para *C. brasiliense*, indicam que o EHE*Cb* e DCM_2 produzem seus efeitos anti-*H. pylori/*antiúlcera por diferentes compostos e envolvendo diferentes mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Miguel MD, Miguel OG. Desenvolvimento de Fitoterápicos. Ribeirão Preto (SP): *Tecnomedd*; 2004.

2 WHO. Traditional Medicine. 2003: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134.

3 Guarim Neto G (Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Biociências). Uso da Biodiversidade: Flora Medicinal do Cerrado do Leste Mato-Grossense: Uma abordagem Etnobotãnica/Etnoecológica. Relatório Técnico, Departamento de Botânica e Ecologia; 2001. CNPQ – Proc. Nº400061/99-6

4 http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm.

5 Simões CMO, Guerra MP, et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2004; 5ª ed.: 14-15.

6 Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. *ARGOS* 2001; 523p.

7 IBAMA http://www.ibama.gov.br acesso em 16/07/2008.

8 Mauro RA, Aguiar LMS, Silva MP, Pott A, Pott VJ. Fauna e Flora do Cerrado, Campo Grande, 2004. Disponível em: < http:// www.cnpgc.embrapa.br/~rodiney/series/

9 Durigan G, Silveira ÉR. Recomposição da mata ciliar em domínio de cerrado, Assis, SP. *Scientia Forestalis* 1999; 56: 135-144.

10 Caneppele D. Estudo químico de constituintes com potencial atividade antiúlcera da casca do caule de Calophyllum brasiliense Camb. (guanandi). Dissertação de mestrado da Uiversidade Federal de Mato Grosso 1998: 46.

11 Guarim Neto G. Plantas utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia/CNPq 1987:58p.

12 Carvalho PEC. Espécies Arbóreas Brasileiras. Brasília: *EMBRAPA* 2003; Vol 1: 487-494.

13 Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: *Instituto Plantarum* 1992: 352p.

14 Botrel MCG, Souza AM, Carvalho D, Pinto SIC, Moura MCO, Estopa RA. Caracterização genética de Calophyllum brasiliense Camb. Em duas populações de mata ciliar. *Sociedade de Investigações Florestais* 2006; 30 (5): 821-827.

15 Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas. *Instituto Plantarum* 2002; 511p

16 Souza AM. Estrutura genética de populações naturais de Calophyllum brasiliense Camb. na bacia do Alto Rio Grande. Tese de Doutorado – Lavras; UFLA: Minas Gerais 2006.

17 Correia MP. Dicionário das plantas úteis no Brasil e das exóticas cultivadas. Vol. III. Edição Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional Brasília 1984.

18 Reyes-Chilpa R, Baggio CH, Alavez-Solano D, Estrada-Muniz E, Kauffman FC, Sanches RI, et al. Inhibition of gastric H+,K+-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthones isolated from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 105: 167-172.

19 Buffon DE. Isolamento e identificação de princípios ativos de Calophyllum brasiliense Camb. (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado Universidade do Vale do Itajaí 2005; 17.

20 Ito C, Itoigawa M, Mishina Y, Cechinel filho V, Murainaka T, Tokuda H, et al. Chemical Constituintes of Calophyllum brasiliense: Struture Elucidation of Seven New Xanthones and Their Cancer Chemopreventive Activity. *Journal of Natural Products* 2002; 65: 267-272.

21 Mundo SR. Caracteres morfoanatômicos de folhas e caule de espécies brasileiras de uso medicinal: Calophyllum brasiliense CAMBESS. (Clusiaceae), Cupania vernalis CAMBESS. (Sapindaceae) e Lafoensia pacari A. ST.-HIL. (Lythraceae). Mestrado em Ciências Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba; 2007: 79p.

22 King FE, King TJ. The chemistry of extractives from hardwoods. XV. The constitution of Methyl vinhaticoate. *Journal Chemical Society* 1953: 4153-4168.

23 Pereira MOS, Gottlieb OR, Magalhães MT. A química de Gutíferas brasileiras XIII: Novas xantonas do Calophyllum brasiliense. *Instituto Central de Química-UFMG*; Belo Horizonte 1967.

24 Pereira MOS, Mesquita AAL, Gottlieb OR, Magalhães MT. A química de Gutíferas brasileiras XII. Pergamon Press 1967; 24: 1601-1610.

25 Stout GH, Krahn MM, Breck GD. Calophyllum products. II.Brasiliensic and inophylloic Acids. *Tetrahedron Letters* 1968; 29: 3285-90.

26 Gottlib OR & Borin MRMB. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 66; 1994: 205-210.

27 Lima EF, Baragão GB, Moraes MPL, Sousa Junior PT. Estudos químicos dos constituintes farmacologicamente ativos da casca do caule da Calophyllum brasiliense (guanandi). *SBPC*, Cuiabá 1994; Resumo c.6-014.

28 Sartori NT. Triagem de plantas medicinais popularmente utilizadas como antiúlcera em Mato Grosso e avaliação do efeito antiúlcera da fração diclorometânica (DCM2) de Calophyllum brasiliense Camb. (Guanandi). Mestrado em Saúde e Ambiente do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá; 1997: 115p.

29 Caneppele D, Vieira PC, Dall`oglio EL, Silva LE, Sousa Jr PT. Unequivocal NMR assignments: O-methoxy-methyl esters derivatives of acid chromanones from Calophyllum brasiliense CAMB. (Guanandi). *Natural Products Research* 2008; 22(10): 846-53.

30 Reyes-Chilpa, Jimenez-Estrada M, Estrada-Muniz E. Antifungal xanthones from Calophyllum brasiliense heartwood. *Journal of Chemical Ecology* 1997; 23 (7): 1901-1911.

31 Sartori NT, Canepelle D, Sousa PT, Martins DTO. Gastroprotective effect from Calophyllum brasiliense Camb. Bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* 1997; 67: 149-156.

32 Carvalho PER. "Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira" Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994; 640p.

33 Silva KL, Santos AR, Mattos PE, Yunes RA, Delle-Monache F Chechinel-Filho V. Chemical composition and analgesoc activity of Calophyllum brasiliense leaves. *Therapie*. 2001; 56 (4): 431-4.

34 Herta-Reyes M, Basualdo MC, Abe F, Jimenez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. HIV-1 Inhibitory Compunds from Calophyllum brasiliense Leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27 (9): 1471-1475.

35 Pretto JB, Cechinel-Filho V, Noldin VF, Sartori MRK, Isaias DRB, Cruz AB. Antimicrobial activity of fractions and compounds from Calophyllum brasiliense (Clusiaceae/Guttiferae). *Zeitschrift für Naturforschung* 2004; 59c: 657-662.

36 Yasunaka K, Abe F, Nagayama A, Okabe H, Lozada-Pérez L, López-Villafranco E, et al. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Jounal of Ethnopharmacology* 2005; 97 (2): 293-9.

37 Abe f, Nagafugi S, Okabe H, Akahane H, Estrada-Muniz E, Huerta-Reyes M, et al. Trypanocidal constituintes in plants3. Leaves of Garcinia intermédia and heartwood od Calophyllum brasiliense. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27 (1): 141-3.

38 Ruiz-Marcial C, Reyes-Chilpa R, Estrada E, Reyes-Esparza J, Fariaz GG, Rodrigues F. Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from Calophyllum brasiliense. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007; 59 (5): 719-25.

39 Kimura S, Ito C, Jyoko N, Segawa H, Kuroda J, Okada M, et al. Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from Calophyllum brasiliense that acts by induction of apoptosis. *International Journal* of *Cancer* 2005; 113 (1): 158-65.

40 Brenzan MA, Nakamura CV, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Cortez DAG. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from Calophyllum brasiliense leaves against Leishmania amazonensis. *Parasitology research* 2007; 101: 715-722.

41 Braga FC, Serra CP, Viana Júnior NS, Oliveira AB, Côrtes SF, Lombardi JA. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. *Fitoterapia* 2007; 78: 353-358.

42 Noldin VF, Isaias DB, Chechinel-Filho V. Gênero Calophyllum: importância química e farmacológica. *Quimica Nova* 2006; 29 (3): 549-554.

43 Plattner RD, Spencer GF, Weisleder D, Kleiman R. Chromanone acids in Calophyllum brasiliense seed oil. *Phytochemistry* 1974; 13: 2597-2662.

44 Marshall, BJ; Warren, JR. Unidentified curve bacilli the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984 1(8390): 1311-5.

45 Vaz, C. L. G. Zaterka, S. II Consenso Brasileiro sobre Helicobacter pylori. *Arquivos de Gastroenterologia* 2005; 42(2): 128-132.

46 Marshall BJ and Goodwin CS. Revised nomenclature of Campylobacter pyloridis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1987; 37 (1): 68.

47 Goodwin CS and Armstrong JA. Microbiological aspects of Helicobacter pylori (Campylobacter pylori). European *Journal of Clinical Microbiology & Infections Diseases* 1990; 9 (1): 1-13.

48 Dunn BR, Cohen H, Blasé MJ. Helicobacter pylori. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10; 720-41.

49 Alarcón, T.; Domingo, D.; López-Bres, M.; Antibiotic resistance problems with Helicobacter pylori. Elsevier. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1999; 12: 19-26.

50 Brown LM. Helicobacter pylori: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiologic Reviews* 2000; 22(2): 283-297.

51 Bateson MC. Current concepts in medicina: Helicobacter pylori. *Journal of Postgraduate Medicine* 2000; 76; 141-144.

52 Souto, F. J. D.; Fontes, C. J. F. ; Rocha, G. A.; Oliveira, A. M. R.; Mendes, e. N.; Quairoz, D. M. M. Prevalence of Helicobacter pylori infection in rural área of state of Mato Grosso, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1998; 93 (2): 171-174.

53 Blaser MJ and Atherton JC. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2004;113(3): 321-333.

54 Das JC and Paul N. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Indian Hournal of Pediatrics* 2007;74 (3): 287-290.

55 Ladeira, M. S. P.; Salvadori, D. M. F; Rodrigues, M. A. M.. Biopatologia do Helicobacter pylori. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39 (4): 335 – 342.

56 Parsonnet J. Helicobacter pylori: the size of the problem. Gut 1998; 43 (suppl 1): S6-S9.

57 Blaser MJ, Berg DE. Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 107 (7): 767-773.

58 Bittencourt PFS, Rocha GA, Penna FJ, Queiroz DMM. Gastroduodenal peptic ulcer and Helicobacter pylori infection in children and adolescents. *Jornal de Pediatria* 2006; 82 (5): 325-334.

59 Webb PM, Knignt T, Greaves S, Wilson A, Newell DG, Elder J, Forman D. Relation between infection with Helicobacter pylori and living conditions in childhood: evidence for person person transmission in early life. *British Medical Journal* 1994; 308: 750-753.

60 Perez-Perez GI, Witkin SS, Decker MD, Blaser MJ. Seroprevalence of Helicobacter pylori Infection in Couples. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29 (3): 642-644.

61 Dominici P, Bellentani S, Di Biase AR, Saccoccio G, Le Rose A, Masutti F et al. Familial clustering of Helicobacter pylori infection: population based study. *British Medical Journal* 1999; 319: 537-541.

62 Kivi M, Tindberg Y, Sörberg M, Casswall TH, Befrits R, Hellström PM, et al. Concordance of Helicobacter pylori Strains within Families. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 5604-5608.

63 Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of Helicobacter pylori Infection. *Helicobacter* 2004; 9 (suppl 1): 1-6.

64 Go MF. Review article: natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Alimentary* Pharmacology *& Therapeutics* 2002; 16 (suppl. 1): 3-15.

65 Stone, MA. Transmission of Helicobacter pylori. *Postgraduate medical journal* 1999; 75: 198-200.

66 Duynhoven YTHP, Jonge R. Transmission of Helicobacter pylori: a role for food? Bulletin of the *World Health Organization* 2001; 79: 455-460.

67 Kodaira MS, Escobar AMU, Grisi S. Aspectos epidemiológicos do Helicobacter pylori na infância e adolescência. *Cadernos de Saúde Pública* 2002; 36 (3): 356-69.

68 Goodman KJ, Correa P. The transmission of Helicobacter pylori. A critical Review of the Evidence. *International Journal of Epidemiology* 1995; 24 (5): 875-887.

69 WHO, 2000. Water Supply and Sanitation Council, Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000 Report New York: UNICEF.

70 Rocha GA, Rocha AMC, Silva LD, Santos A, Bocewicz ACD, Queiroz RM, et al. Transmission of Helicobacter pylori infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. *Tropical Medicine and International Health* 2003; 8 (11): 987-991.

71 Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM. Intrafamilial clustering of Helicobacter pylori infection. *New England Journal of Medicine* 1990; 322 (6): 359-63.

72 Lehours P, Yilmaz O. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2007; 12 (1): 1-3.

73 Egemen A, Yilmaz Ö, Akil Í, Altuglu I. Evaluation of association between hepatitis A and Helicobacter pylori infections and routes of transmission. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2006; 48: 135-139.

74 Lin D-B, Tsai T-P, Yang C-C, Wang E-M, Nieh W-T, Ling U-P, et al. Association between seropositivity of antibodies against hepatitis A virus and Helicobacter pylori. The *American journal of tropical medicine and hygiene*. 2000; 63 (3,4): 189-191.

75 Luzza F, Imeneo M, Maletta M, Paluccio G, Giancotti A, Perticone F, et al. Seroepidemiology of Helicobacter pylori infection and hepatitis A in a rural area: evidence against a common mode of transmission. *Gut* 1997; 41: 164-168.

76 Furuta T, Kamata T, Takashima M, Futami H, Arai H, Hanai H, et al. Study of Transmission Routes of Helicobacter pylori in Relation to Seroprevalence of Hepatitis A vírus. *Journal of Clinical microbiology* 1997; 35 (7): 1891-1893.

77 Yang YJ, Wang SM, Chen CT, Huang MC, Chang CJ, Liu CC. Lack of evidence for fecal-oral transmission of Helicobacter pylori infection in Taiwanese. *Journal of the Formosan Medical Association* 2003; 102 (6): 375-8.

78 Tytgat GN. Endoscopic transmission of Helicobacter pylori. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 1995; 9 (2): 105-10.

79 Cronmiller JR, Nelson DK, Jackson DK, Kim CH. Efficacy of Conventional Endoscopic Disinfection and Sterilization Methods Against Helicobacter pylori Contamination. *Helicobacter* 1999; 4 (3): 198-203.

80 Engstrand L. Helicobacter in water and waterborne routes of transmission. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 90: 80S-84S.

81 Fox JG. Non-human reservoirs of Helicobacter pylori. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1995; 9 (2): 93-103.

82 Handt LK, Fox JG, Dewhirst FE, Fraser GJ, Paster BJ, Yan LL, et al. Helicobacter pylori Isolated from the dosmestic cat: Public Health Implications. *Infection and Immunity* 1994; 62 (6): 2367-2374.

83 Souza ML, Kobayasi S, Rodrigues MAM, Saad-Hossne R, Naresse LE. Prevalência de Helicobacter em cães oriundos do biotério central da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) – Botucatu. *Acta Cirurgica Brasileira* 2004; 19 (5).

84 Blaser MJ. Ecology of Helicobacter pylori in the Human Stomach. *The Journal of Clinical Investigation* 1997; 100 (4): 759-762.

85 Blaser MJ. Helicobacters are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. *Gut* 1998; 43: 721-727.

86 Algood HMS and Cover TL. Helicobacter pylori Persistence: an Overview of Interactions between H. pylori and Host Immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; p. 597-613.

87 D`Elios MM and Andersen LP. Helicobacter pylori Inflammation, Immunity and Vaccines. *Helicobacter* 2007; 12 (Suppl. 1): 15-19.

88 Velin D and Michetti P. Immunology of Helicobacter pylori. *Digestion* 2006; 73; 116-123.

89 Doorn, L-J van; Scheeberger, P.M.; Nouhan, N.; Plaisier, A. P.; Quint, W. G. V.; Boer, W. A. Importance or Helicobacter pylori cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment. GUT. *British Medical Journal*2000; 46: 321-326.

90 Padol IT, Hunt RH Efect of TH1 cytokines on acid secretion in pharmacologically characterized mouse gastric glands. *Gut* 2004; 53: 1075-1081.

91 Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA Microbiologia Médica. *Guanabara Koogan* 2000; 212-213.

92 Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Karczewska E, Drozdowicz D, et al. Helicobacter pylori infection delays healing of ischemia-reperfusion induced gastric ulcerations: new animal model for studying pathogenesis and therapy of H. pylori infection. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2000; 12: 1299-1313.

93 Ross JS, Bui HX, Rosario Ad, Sonbati H, George M, Lee CY. Helicobacter pylori: Its role in the pathogenesis of peptic ulcer disease in a new animal model. *American Journal of Pathology* 1992; 141 (3): 721-727.

94 Kaunitz JD. Barrier Function of Gastric Mucus. Presented at the 1063rs *Meeting of The Keio Medical Society in Tokio* 1997.

95 Quigley EM, Turnberg LA. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. Studies in control subjects and in duodenal ulcer patients. *Gastroenterology* 1987; 92 (6): 1876-84.

96 Talley NJ, Ormand JE, Frie CA, Zinsmeister AR. Stability of pH gradients in vivo across the stomach in Helicobacter pylori gastritis, dyspepsia and health. *American Journal of Gastroenterology* 1992; 87 (5): 590-4.

97 Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling H-O, et al. The spatial orientation of Helicobacter pylori in the gastric mucus. *PNAS* 2004; 101 (14) 5024-5029.

98 Dubois A, Borén T. Helicobacter pylori is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cellular Microbiology* 2007; 9 (5): 1108-1116.

99 Amieva MR, Slama NR, Tompkins LS, Falkow S. Helicobacter pylori enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cellular Microbiology* 2002; 4 (10): 677-690.

100 O`Keeffe J, Moran AP. Conventional, Regulatory, and Unconventional T Cells in the Immunologic Response to Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2008; 13: 1-19.

101 Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. Immune responses to Helicobacter pylori colonization: mecanisms and clinical outcomes. *Clinical Sciense* 2006; 110: 305-314.

102 Franchi L, McDonald C, Kanneganti T-D, Amer A, Núnez G. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors: Intracellular Pattern Recognition Molecules for Pathogen Detection and Host Defense. *The Journal of Immunology* 2006: 3507-3513.

103 Bodger K, Crabtree JE. Helicobacter pylori and gastric inflammation. *British Medical Bulletin* 1998; 54 (1): 139-150.

104 Akhiani AA. The role of type-specific antibodies in colonization and infection by Helicobacter pylori. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2005; 18: 223-227.

105 Shimoyama T, Crabtree JE. Bacterial factors and immune pathogenesis in Helicobacter pylori infection. *Gut* 1998; 43 (1): S2-S5.

106 Moorchung N, Srivastava AN, Gupta NK, Ghoshal UC, Achyut BR, Mittal B. Cytokine gene plymorphisms and the pathology of chronic gastritis. *Singapore Medical Journal* 2007; 48 (5): 447-454.

107 Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonization during Helicobacter pylori infection. *Gut* 2004; 53: 1082-1089.

108 Zambon, DF, Basso D, Navaglia F, Germano F, Gallo N, Milazzo M, et al. Helicobacter pylori virulence genes and host IL-1RN e IL-1β genes interplay in favouring the development of peptic ulcer and intestinal metaplasia. *Cytokine* 2002; 18 (5): 242-251.

109 El-Omar EM. The role of Interleukin-l beta in Helicobacter pylori-associated disease. *The Netherlands Journal of Medicine* 2004; 62 (3): 47-54.

110 El-Omar EM, Carrington M, Chow W-H, McColl KEL, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.

111 Hou L, El-Omar EM, Chen J, Grillo P, Rabkin CS, Baccarelli A, et al. Polymorphisms in Th1-type cell-mediated response genes and risk of gastric cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28 (1): 118-123.

112 Godoy, A. P. O.; Ribeiro, M. L.; Benvengo, Y. H. B.; Vitiello, L.; Miranda, M. C. B.; Mendonça, S. and Pedrazzoli Jr, J. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factores in Helicobacter pylori clinical isolates. *BMC Gastroenterology* / 3:20 / August 2003.

113 Egan BJ, Katicic M, O`Connor HJ, O`Morain CA. Treatment of Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2007; 12 (1): 31-37.

114 Dzieniszewski J, Jarosz M. Guidelines in the Medical Treatment of Helicobacter pylori *Infection. Journal of physiology and pharmacology* 2006; 57(3): 143-154.

115 Malfertheiner P, Megraud F, O`Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56 (6): 772-81.

116 Walsh JH, Peterson WL. The treatment of Helicobacter pylori infection in the management of peptic ulcer disease. *The New England Journal of Medicine* 1995; 984-991.

117 Megraud F. Strategies to treat patients with antibiotic resistant Helicobacter pylori. *International Journal* of *Antimicrobial Agents* 2000; 16: 507-509.

118 Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa H. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 175-179.

119 Tcder-Unal M, Can F, Demirbilek M, Karabay G, Tufan H, Arslan H. The bactericidal and morphological effects of peroxynitrite on Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2008; 13: 42- 48.

120 Nariman F, Eftekhar F, Habibi Z, Falsafi T. Anti-Helicobacter pylori Activities of six Iranian Plants. *Helicobacter* 2004; 9 (2): 146-151.

121 Wang Y-C, Huang T-L. Screening of anti-Helicobacter pylori herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS *Immunology and Medical Microbiology* 2005; 43: 295-300.

122 O`Mahony R, Al-Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, et al. Bactericidal and anti-adhesive proprieties of culinary and medicinal plantas against Helicobacter pylori. *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11 (47): 7499-7507.

123 Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, et al. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against Helicobacter pylori. *Microbiology* and *immunology* 2004; 48 (4): 251-261.

124 Wang Y-C, Huang T-L. Anti-Helicobacter pylori activity of Plumbago zeylanica L. FEMS *Immunology and Medical Microbiology* 2005; 43: 407-412.

125 Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., et al. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 175 – 179.

126 Wang, Yuan-Chuen, Huang, Tung-Liang. Screening of anti-Helicobacter pylori herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS *Immunology and Medicinal Microbiology* 2005; 43: 295 – 300.

127 Chun, S-C, Wattem, D. A., Lin, U-T, Shetty, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (Origanum vulgare) with antimicrobial activity against Helicobacter pylori. *Process Biochemistry* 2005; 40: 809 – 816.

128 Yesilada, E.; Gürbüz, I.; Shibata, H. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-Helicobacter pylori activity. *Journal of Etnopharmacology* 1999; 66: 289 – 293.

129 Isobe, T.; Doe, M.; Marimoto, Y; et al. The Anti-Helicobacter pylori Flavones in a Brazilian Plant, Hyptis fasciculate, and the Activity of Methoxyflavones. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2006; 29 (5): 1039 – 1041.

130 Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., et al. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 175 – 179, 2003.

131 Wang, Yuan-Chuen, Huang, Tung-Liang. Screening of anti-Helicobacter pylori herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. FEMS *Immunology and Medicinal Microbiology*. 2005; 43: 295 – 300.

132 McNulty, C. and the PHLS Helicobacter Working Group. Helicobacter pylori susceptibility testing by disc diffusion. *Jounal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 49: 601-609.

133 Hachem, C. Y.; Clarridge, J. E.; Reddy, R. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing of Helicobacter pylori. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*1996; 24: 37-41.

134 Malone MH. The pharmacological evaluation of natural products general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *Journal Ethnopharmacology* 1983; 8: 127-147.

135 Takagi K, Okabe S, Saziki R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1969; 19: 418-426.

136 Okabe s, Amagase K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models – The History and State of Art of Peptic Ulcer Research. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2005; 28 (8): 1321-1341.

137 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72: 248-254.

138 Liu C, M.Crawford, Patologia – Bases Patológicas das doenças. Cap. O trato Gastrointestinal, *Elsevier,* Rio de Janeiro 2005: p 855-856.

139 Matos FJA. Introdução à Fitoquímica Experimental. UFC, Fortaleza, 1998: 126p.

140 Jesus NZT. Levantamento etnobotânico e triagem antiúlcera e antiedematogênica de plantas medicinais do distrito de Pirizal-MT: Avaliação da atividade antiúlcera do

extrato metanólico de Vaitarea macrocarpa (Benth.) Ducke. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT 2007; 105p.

141 Guarim Neto G, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica* 2003; 17 (4): 561-584.

142 Reflorestar http://www.reflorestar.com.br . Acesso em 16/07/2008.

143 Beserra AMSS. Avaliação da atividade gastroprotetora do ácido elágico em modelos animais. Mestrado em Ciências da Saúde, Cuiabá-MT UFMT 2008; p 4.

144 Shi R, Xu S, Zhang H, Ding Y, Sun G, Huang X, et al. Prevalence and risk factors for Helicobacter pylori infection in Chenese Populations. *Helicobacter* 2008; 13: 157-165.

145 Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T. In vitro and in vivo activities of tea catechins against Helicobacter pylori. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 1999; 43 (7): 1788-1791.

146 Ustün O, Ozçelik B, Akyön Y, Abbasoglu U, Yesilada E. Flavanoids with anti-Helicobacter pylori activity from Cistus laurifolius leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 108: 457-461.

147 Alves EG, Vinholis HC, Casemiro LA, Jacometti NA, Furtado C, Silva MLA, et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova* 2007; Nota técnica.

148 Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 100: 80-84.

149 Cottiglia F, Dhanapal B, Sticher O, Heilmann J. New chromanone acids with antibacterial activity from Calophyllum brasiliense. *Journal of Natural Products* 2004; 67 (4): 537-41.

150 Okabe S, Pfeiffer CJ. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. *The American journal of digestive diseases* 1972; 14: 619-629.

151 Bui HX, Rosario AD, Sonbati H, Lee CY, George M, Ross JS. Helicobacter pylori affects the quality of experimental gastric ulcer healing in a new animal model. *Experimental and molecular pathology* 1991; 55: 261-268.

152 Hirayama F, Takagi S, Yokayama Y, Iwal E Ikeda Y. Establishment of gastric Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils. *Journal of Gastroenterology* 1996; 31 (Suppl IX): 24-28.

153 Ikeno T, Ota H, Sugiyama A, Ishida K, Katsuyama T, Genta RM, et al. Helicobacter pylori-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *American Journal of pathology* 1999; 154 (3): 951-960.

154 Keto Y, Takahashi S, Okabe S. Healing of Helicobacter pylori-induced gastric ulcers in Mongolian gerbils: Combined treatment with omeprazole and clarithromycin. *Digestive Disease and Sciences*; 1999; 44 (2): 257-265.

155 Keto Y, Ebata M, Tomita K, Okabe s. Influence of Helicobacter pylori infection os healing and relapse of acetic acid ulcers in Mongolian gerbils. *Digestive Diseases and Sciences* 2002; 47 (4): 837-849

156 Li GQ, Xia HHX, Chen MH, Tsukamoto T, Tatematsu M, Gu Q, et. al. Effects os aspirin on the development of Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and heterotopic proliferative glands in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2008; 13: 20-29.

157 Konturek PCH, Brzozowski T, Konturek SJ, Satchura J, Karczewska E, Pajdo R, et al. Mouse model f Helicobacter pylori infection: studies of gastric function and ulcer healing. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1999; 13: 333-346.

158 Konturek PC, Brzozowski T, Kwiecien S, Drozdowicz D, Harsch IA, Meixner H, et al. Effect of Helicobacter pylori on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. *European Journal of Pharmacology* 2002; 154: 191-202.

159 Ibrahim M, Khan AA, Tiwari SK, Habeeb MA, Khaja MN, Habibullah CM. Antimicrobial activity of Sapindus mukorossi and Rheum emodi extracts against H. pylori: In vitro and in vivo studies. *World Joural of Gastroenterology* 2006; 12 (44): 7136-7142.

160 Kumagal T, Yan J, Graham DY, Tozuka M, Okimura Y, Ikeno T, et al. Serum Immunoglobulin G Immune Response to Helicobacter pylori Antigens in Mongolian Gerbils. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39 (4): 1283-1288.

161 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Mollecular Immunology 6th edition, *Saunders Elsevier* 2007; 12:267-301.

162 Saperas E, Cominelli F, Taché Y. Potent inhibition of gastric acid secretion by intravenous interleukin-1 beta and -1 alpha in rats. *Peptides* 1992; 13 (2): 221-6.

163 Saperas ES, Yang H, Rivier C, Tache Y. Central action of recombinant interleukin-1 to inhibit acid secretion in rats. *Gastroenterology* 1990; 99 (6): 1599-606.

164 Kondo K, Shinomura Y, Kanayama S, Kawabata S, Miyazaki Y, Imamura I, et al. Interleukin-I beta inhibits gastric histamine secretion and synthesis in the rat. *American journal of physiology* 1994; 267 (6): G966-71.

165 Bodger K, Wyatt JI, Heatley RV. Gastric mucosal secretion of interleukin-10: relations to histopathology, Helicobacter pylori status, and tumour necrosis fator-α secretion. *Gut* 1997; 40: 739-744.

166 Karttunen, R. A., T. J. Karttunen, M. M. Yousfi, H. Elzimaity, D. Y. Graham, and F. Elzaatari. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with Helicobacter pylori. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*1997; 32:22-27.

167 Chao JC-J, Hung H-C, Chen S-H, Fang C-L. Effects of Ginkgo biloba extract on cytoprotective factors in rats with duodenal ulcer. *World Journal of Gastroenterology* 2004; 10 (4): 560-566.

168 'Hiruma-Lima CA, Calvo TR, Rodrigues CM, Andrade FDP, Vilegas W, Brito ARMS. Antiulcerogenic activity of Alchornea castaneaefolia: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 104: 215-224.

169 Ogata SK, Kawakami E, Reis FPS. Evaluation of invasive methods to diagnosis Helicobacter pylori infection in children and adolescents with dyspepsia invasive methods to diagnose Hp infection. *Medicina Ribeirão Preto* 2002; 35: 24-29.

170 Osaki T, Mabe K, Hanawa T, Kamiya S. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Journal* of Medical *Microbiology*. 2008 ; 57(Pt 7): 814-9.

171 Lin SY, Jeng YS, Wang CK, Ko FT, Lin KY, Wang CS, et al. Polymerase chain reaction diagnosis of Helicobacter pylori in gastroduodenal diseases: comparison with culture and histopathological examinations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1996; 11(3): 286-9.

172 Alkofahi A, Atta Ah. Pharmacological screening of the anti-ulcer effects of some Jordanian medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 67: 341-345.

173 Gonzales E, Iglesias I, Carretero E, Villar A. Gastric Cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 70: 329-333.

174 Carvalho PEC. Espécies Arbóreas Brasileiras. Brasília: *EMBRAPA* 2003; Vol 1: 487-494.

175 Li GQ, Xia HH, Chen MH, Gu Q, Wang JD, Peng JZ, et al. Effects of ciclooxygenase-1 and -2 gene disruption on Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; 193: 1037-46.

ANEXOS

Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico, expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA.

Certificado de conformidade com princípios éticos na experimentação animal, conforme Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA – expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo