

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AMBIENTE E  
DESENVOLVIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS AQUOSOS E  
ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* FRENTE AO  
MICROORGANISMO *Helicobacter pylori*.

Ana Paula Dambros Taschetto

LAJEADO – RS  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AMBIENTE E  
DESENVOLVIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS AQUOSOS E  
ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* FRENTE AO  
MICROORGANISMO *Helicobacter pylori*.

Ana Paula Dambros Taschetto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu – Mestrado  
em Ambiente e Desenvolvimento, como exigência parcial para a obtenção do título  
de Mestre em Ambiente e Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo M. Ethur  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciana Weidlich

LAJEADO – RS

2010

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS AQUOSOS E  
ETANÓLICOS DE *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* FRENTE AO  
MICROORGANISMO *Helicobacter pylori*.

por

ANA PAULA DAMBROS TASCHETTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e  
Desenvolvimento, do Centro Universitário UNIVATES (RS), como requisito para  
obtenção do título de MESTRE EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO, sob  
orientação do Professor Eduardo Miranda Ethur e co-orientação da Professora  
Luciana Weidlich.

Lajeado, RS – BRASIL.

2010

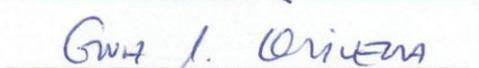
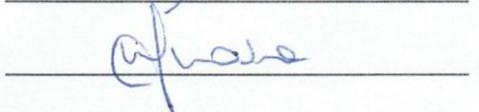


**CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E  
DESENVOLVIMENTO**

ATA 13/2010 – Defesa de Dissertação

A dissertação da mestrandia **Ana Paula Dambros Taschetto**, sob título **“Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos de *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* frente ao microorganismo *Helicobacter pylori*”**, foi defendida em sessão pública no dia 16 de julho de 2010, às 9h30min, na sala 219, prédio 01, da UNIVATES, tendo sido considerada APROVADA (aprovada/reprovada) pela Banca Examinadora, abaixo assinada, conforme pareceres individuais anexos.

Banca examinadora:

Nome	Assinatura
Orientador: Eduardo Miranda Ethur	
2° Membro: Luciana Weidlich	
3° Membro: Eniz Conceição de Oliveira	
4° Membro: Neusa Fernandes de Moura	

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Silvia e Abílio, pelo grande incentivo e apoio aos meus estudos, por acreditarem no meu potencial, pelo exemplo de luta e garra, ao enfrentar as fatalidades da vida, e principalmente pelo enorme amor, que dedicam a mim e aos meus irmãos, obrigado por tudo, amo vocês...

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu noivo, Mauro Heinen, pela sua atenção, compreensão, apoio, incentivo, companheirismo e amor.

Aos meus tios, Ana Maria Dambros Kist e Marcelo Kist, que sempre me incentivaram nessa caminhada, e acreditaram no meu potencial.

Aos meus irmãos Marcelo e Tiago pelo apoio e carinho.

Aos meus pais, Sílvia Dambros Taschetto e Abilio Taschetto, pelo importante apoio financeiro, pelo incentivo, pelo amor e carinho que me dedicam mesmo à distância.

Ao meu avô, Deonísio Dambros (*in memoriam*) pelos seus relatos e conhecimentos sobre a “carqueja”, que acabaram por me despertar o interesse de trabalhar com esta planta.

A minha colega e amiga Caroline Lima Zanatta, que esteve sempre ao meu lado nesses dois anos, me ajudando a superar as dificuldades.

Ao meu orientador Eduardo Miranda Ethur, pelo incentivo, orientação e apoio no projeto realizado.

A minha co-orientadora, Luciana Weidlich, pelas orientações e apoio na realização do projeto.

As bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Química, Isadora Pilger e Ângela Gerhard, pelo importante apoio na rotaevaporação dos extratos.

As bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Controle de Qualidade, Jaqueline Bitsch e Renata Pretto, pela importante ajuda nos experimentos microbiológicos.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento pelo aprendizado.

A todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“A vida está cheia de desafios que, se aproveitados de forma criativa, transformam-se em oportunidades.”

Maxuwell Maltz

## RESUMO

O gênero *Baccharis* é largamente utilizado na medicina popular, na forma de infusões, para controle e/ou tratamento de várias doenças. Estudos já comprovaram a atividade antimicrobiana de *Baccharis* frente a vários microorganismos. Porém, existem poucos relatos da ação de plantas deste gênero, sobre o microorganismo *Helicobacter pylori*. Esta bactéria Gram-negativa, microaerófila, está associada às úlceras pépticas duodenais ou gástricas, e ao desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico. Desta forma, com a realização deste trabalho buscou-se avaliar *in vitro*, a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos de quatro amostras da espécie *Baccharis trimera*, coletadas nas cidades de Marques de Souza (RS), Mata (RS), Santa Clara do Sul (RS) e Westfália (RS), e de duas amostras da espécie *Baccharis articulata*, coletadas nas cidades Mata (RS) e Santa Clara do Sul (RS). As atividades foram determinadas através da obtenção das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), e das Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) dos extratos. Todos os extratos etanólicos, tanto de *B. trimera*, como de *B. articulata* apresentaram atividades antimicrobianas, porém apenas um, dos seis extratos aquosos, apresentou atividade (CIM 2500 µg/mL). Três das quatro amostras de *B. trimera* apresentaram CIM 312,5 µg/mL, mesmo coletadas em locais diferentes. As duas amostras de *B. articulata*, também coletadas em locais diferentes, apresentaram CIM 625 µg/mL. Os valores das CBM foram idênticos aos encontrados para as CIM em cinco das seis amostras. Os resultados demonstram que os extratos etanólicos de *B. trimera* apresentaram atividade antimicrobiana ligeiramente superior a *B. articulata*. Ainda, observou-se que a atividade antimicrobiana foi pouco influenciada pelo local de coleta.

Palavras-chave: *Baccharis*, extratos vegetais, *Helicobacter pylori*, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The genus *Baccharis* is widely used in folk medicine as teas, to control and/or treatment of various diseases. Studies have demonstrated the antimicrobial activity of *Baccharis* front of several microorganisms. However, there are few reports of the action plans of its kind on the microorganism *Helicobacter pylori*. This gram-negative microorganism, microaerophilic is associated with peptic duodenal or gastric ulcers, and the development of gastric adenocarcinoma. Thus, with this work was to evaluate *in vitro*, the antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of four specimens of the species *Baccharis trimera*, collected in the cities of Marques de Souza (RS), Mata (RS), Santa Clara do Sul (RS) and Westfália (RS), and of two specimens of the species *Baccharis articulata*, collected in Mata (RS) and Santa Clara do Sul (RS). These activities were determined by obtaining the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), as well as the Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) of the above mentioned extracts. All the ethanolic extracts, both of *B. trimera* and of *B. articulata* have presented antimicrobial activity; on the other hand, only one among the six aqueous extracts has presented activity (MIC 2500µg/mL). Three among the four specimens of *B. trimera* have presented MIC 312,5 µg/mL, although they had been collected from distinct locations. Both specimens of *B. articulata*, also collected from different places, have presented MIC 625 µ/mL. The MBC values were identical to those found for the MIC in five out of the six specimens. The results show that the ethanolic extracts of *B. trimera* have presented a slightly higher antimicrobial activity in comparison to those of *B. articulata*. Furthermore, it was observed that the antimicrobial activity had little influence from the place of collection.

Keywords: *Baccharis*, plant extracts, *Helicobacter pylori*, antimicrobial activity.

## LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Espécie <i>B. trimera</i> .....	28
FIGURA 2 – Espécie <i>B. articulata</i> .....	29
FIGURA 3 - <i>H. pylori</i> observada ao microscópio eletrônico.....	39
FIGURA 4 - Prevalência do <i>H. pylori</i> no mundo.....	41
FIGURA 5 - Colônias de <i>H. pylori</i> .....	46
FIGURA 6 - Diluições dos extratos etanólicos.....	64
FIGURA 7 - Diluições dos extratos aquosos.....	64
FIGURA 8 - PLACA A - Demonstração da aplicação em triplicata do EE1, EE2, EE3, do antimicrobiano (claritromicina), do controle positivo (meio + inóculo), e do controle negativo (meio sem inóculo).....	67
FIGURA 9 - Jarras de acrílico dentro da estufa.....	68
FIGURA 10 - Rendimento dos extratos aquosos e etanólicos após rotaevaporação.....	71
FIGURA 11 - Altura da coluna de espuma (em cm) formada pelos extratos aquosos.....	76
FIGURA 12 - Altura da coluna de espuma (em cm) formada pelos extratos etanólicos.....	76
FIGURA 13 - A) Cromatografia em Camada Delgada para identificação da presença de Flavonóides nos seis extratos aquosos e o padrão (P). B) Cromatografia em Camada Delgada para identificação da presença de Flavonóides nos seis extratos etanólicos e o padrão (P). .....	78
FIGURA 14 – Gráfico dos valores da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e da CBM ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados para cada extrato etanólico testado.....	83

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Prevalência de infecção por <i>H. pylori</i> em diferentes populações brasileiras assintomáticas, em valores percentuais e absolutos. ....	42
TABELA 2 - Identificação e procedência das amostras. ....	56
TABELA 3: Siglas atribuídas aos extratos aquosos e etanólicos. ....	57
TABELA 4 - Rendimentos dos extratos etanólicos e aquosos das seis espécies de <i>Baccharis</i> .....	70
TABELA 5 - Resultados obtidos no <i>screening</i> dos extratos para Alcalóides.....	72
TABELA 6 - Resultados obtidos no <i>screening</i> dos extratos para Cumarinas.....	73
TABELA 7 - Resultados obtidos no <i>screening</i> dos extratos para Saponinas. ....	75
TABELA 8 - Resultados encontrados no <i>screening</i> dos extratos para Flavonóides..	78
TABELA 9 - Resultado do <i>screening</i> dos e extratos para taninos.....	80
TABELA 10 - Concentrações de CIM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) encontradas para os extratos etanólicos. ....	81
TABELA 11- Valores da CBMs ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtidas a partir dos extratos etanólicos. ....	82
TABELA 12 - Valores das CIM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e CBM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para os extratos aquosos. .	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatórios Não Esteroidais
ATCC	American Type Culture Collection
Cag	Citotoxigênicas cytotoxin associated gene
CBMs	Concentrações Bactericidas Mínimas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIMs	Concentrações Inibitórias Mínimas
COX	Enzima ciclo-oxigenase
DMSO	Dimetilsulfoxido
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto Férrico
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBP	Inibidor da Bomba Protônica
IL8	Interleucina 8
KOH	Hidróxido de Potássio
LDH	Lactato Desidrogenase
mg	Miligramas
MgO	Óxido de Magnésio
mL	Mililitros
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para análise
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Polimorfonucleares

TSA	Ágar Soja Tryptona
TSB	Caldo Soja Tryptona
µm	Micrometros
µg	Microgramas

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO/APRESENTAÇÃO.....	17
1.2 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO TRABALHO .....	19
2. OBJETIVOS .....	21
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1 EMPREGO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	22
3.2 GÊNERO <i>BACCHARIS</i> .....	23
3.2.1 <i>Baccharis trimera</i> .....	25
3.2.2. <i>Baccharis articulata</i> .....	28
3.2.3 SCREENING FITOQUÍMICO .....	29
3.2.3.1 Alcalóides .....	30
3.2.3.2 Flavonóides .....	30
3.2.3.3 Cumarinas .....	31
3.2.3.4 Saponinas .....	31
3.2.3.5 Taninos.....	32
3.2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
3.2.4.1 Agentes Antimicrobianos.....	33
3.2.4.2 Atividade da Sazonalidade sobre a Atividade Antimicrobiana.....	34
3.2.4.3 Resistência Antimicrobiana .....	35
3.3 <i>HELICOBACTER PYLORI</i> .....	36
3.3.1 Morfologia.....	38
3.3.2 Epidemiologia do <i>H. pylori</i> .....	39

3.3.3 Etiopatogenia .....	42
3.3.4 Mecanismo de Ação do <i>H. pylori</i> sobre a Mucosa Gástrica .....	43
3.3.5 Transmissão.....	44
3.3.6 Isolamento.....	45
3.3.7 Cultura.....	46
3.3.8 Fatores genéticos e de virulência do <i>H. pylori</i> .....	46
3.3.9 Aspéctos clínicos.....	48
3.3.10 Diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i> .....	48
3.3.11 Quando tratar infecções por <i>H. pylori</i> .....	49
3.3.12 Esquemas terapêuticos para tratamento das infecções por <i>H. pylori</i> .....	50
3.3.13 Controle da erradicação .....	51
3.4 ÚLCERAS PÉPTICAS NO HOMEM.....	52
3.5 USO DE ANTINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINE) E <i>H. PYLORI</i> .....	53
3.6 ADENOCARCINOMA GÁSTRICO .....	54
4. METODOLOGIA.....	55
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	55
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	57
4.2.1 Extrato etanólico.....	57
4.2.2 Extrato aquoso .....	57
4.2.3 Rendimentos dos Extratos .....	58
4.3 SCREENING DOS EXTRATOS .....	58
4.3.1 Taninos.....	58
4.3.2 Cumarinas .....	59
4.3.3 Saponinas .....	59
4.3.4 Flavonóides .....	60
4.3.5 Alcalóides .....	61
4.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> .....	61
4.4.1 Diluição dos extratos .....	62
4.4.2 Fármaco antimicrobiano padrão.....	63
4.4.3 Determinação da concentração do fármaco padrão em cromatografia líquida de alta eficiência.....	63
4.4.4 Controle do diluente .....	63
4.4.5 Padronização do Inóculo .....	64
4.4.6 Controle do microorganismo .....	65

4.4.7 Concentração Inibitória Mínima - CIM.....	65
4.4.8 Confirmação da Concentração Inibitória Mínima.....	69
4.4.9 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	69
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	69
5. RESULTADOS .....	70
5.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS.....	70
5.2 <i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO .....	71
5.2.1 Presença de Alcalóides .....	71
5.2.2 Presença de Cumarinas .....	73
5.2.3 Presença de Saponinas .....	74
5.2.4 Presença de Flavonóides .....	76
5.2.5 Presença de Taninos.....	79
5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	80
5.3.1 Concentração de Claritromicina solúvel, dosada em CLAE .....	81
5.3.2 Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos etanólicos .....	81
5.3.3 Resultados da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os extratos etanólicos .....	82
5.3.4 Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos aquosos .....	83
5.3.5 Resultados da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os extratos aquosos.....	84
6. DISCUSSÃO .....	85
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	90
REFERÊNCIAS.....	92

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO/APRESENTAÇÃO

Nas últimas décadas, o uso de preparações a base de plantas, tem se intensificado em decorrência de resultados negativos obtidos em tratamentos com a medicina convencional, por prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos de origem sintética, pelo crescimento da consciência ecológica, pela crença popular de que o natural é inofensivo, e pelo fato de amplas camadas da população não ter acesso aos medicamentos (RATES, 2001).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, na maior parte do mundo, a OMS (Organização Mundial da Saúde) reconhece que grande parte da população, dos países em desenvolvimento, depende da medicina tradicional para sua atenção primária, sendo que, 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, e 85% destes fazem uso de plantas medicinais ou preparações à base destas (BRASIL, 2006, p.11).

O Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou no acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006, p.14).

O emprego de plantas como substrato para a fabricação de medicamentos, e a sua utilização em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional, representa um campo

a ser explorado, através do desenvolvimento de estudos baseados nestes conhecimentos populares, buscando o uso sustentável da biodiversidade, através do reconhecimento e aproveitamento do conhecimento popular.

Sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas com plantas, pode proporcionar a obtenção de novas substâncias ativas, que podem servir de modelos moleculares para o desenvolvimento de novos medicamentos para patologias, cujos tratamentos atuais não são considerados satisfatórios, como por exemplo, medicamentos antitumorais, antivirais e antimicrobianos (MENTZ *et al.*, 1997).

A área de produtos naturais é a responsável pela obtenção de aproximadamente 50% de pequenas moléculas que constituem novas entidades químicas aprovadas, considerando-se as categorias: produtos naturais propriamente ditos, derivados de produtos naturais, produtos sintéticos cujo farmacóforo<sup>1</sup> foi desenvolvido a partir de um produto natural e produtos sintéticos. Esta informação retrata a contínua importância do papel exercido pelos produtos de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003).

Dentre os diversos gêneros de plantas utilizados pela população brasileira, destaca-se o gênero *Baccharis*. As espécies pertencentes a este gênero são conhecidas como carquejas, e têm sido estudadas sob o ponto de vista químico e biológico. A grande quantidade de estudos envolvendo este grupo de plantas está relacionada à sua vasta utilização popular.

Este gênero está amplamente distribuído principalmente em regiões tropicais do Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México (ABAD e BERMEJO, 2007). Apesar dos numerosos estudos sobre as espécies pertencentes ao gênero *Baccharis*, ainda se tem dificuldades na sua diferenciação botânica. Fato, que ocasiona confusão entre a população, que acaba utilizando indistintamente a planta.

Por ser uma planta muito utilizada para diversos males, o desenvolvimento de estudos que demonstrem as atividades farmacológicas, os efeitos colaterais, as

---

<sup>1</sup> Conjunto de átomos responsáveis pela atividade biológica.

possíveis interações entre plantas e medicamentos, a posologia correta, e mais informações sobre a diferenciação botânica, evitarão erros na aplicabilidade desta planta.

Diversos trabalhos têm relatado a atividade antimicrobiana de espécies de *Baccharis* sobre uma variada gama de bactérias. Porém, existem poucos trabalhos investigando esta atividade frente ao microorganismo *Helicobacter pylori*. Esta bactéria está presente em grande parcela da população, e está associada às úlceras pépticas e duodenais, e ao câncer gástrico.

Para erradicação deste microorganismo, é recomendado o emprego de terapias tríplexes, geralmente com a associação de dois antimicrobianos e um anti-secretor. Experiências com um único antimicrobiano são, geralmente, ineficazes. Todavia, nos últimos anos, o surgimento de cepas resistentes às terapias empregadas tornou-se mais comum, levando a comunidade científica a se voltar para o desenvolvimento de novos medicamentos que possam atuar como opção terapêutica ao tratamento (NETTO *et al.*, 2008).

Sendo assim, como a carqueja possui uso popular amplamente difundido para o tratamento de problemas gástricos, e sabendo-se da associação do *H. pylori* a estas patologias, a realização deste trabalho buscou avaliar *in vitro*, se extratos aquosos e etanólicos das espécies *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata*, apresentam atividade antimicrobiana sobre este microorganismo.

## 1.2 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO TRABALHO

Sabendo-se que o Brasil possui uma rica biodiversidade, que está diminuindo com o passar dos anos, é de suma importância que a comunidade científica se engaje em pesquisar e descobrir novas moléculas com atividades biológicas importantes.

É esta busca por novas alternativas ao tratamento do *H. pylori* que justifica o trabalho proposto. Tendo em vista, que esta bactéria coloniza mais da metade da

população mundial, que necessita da associação de antimicrobianos para sua erradicação e, principalmente, pelo surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos empregados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos e aquosos, das espécies *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata*, frente ao microorganismo *Helicobacter pylori*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos etanólicos e aquosos de quatro amostras *B. trimera* e duas amostras *B. articulata*, frente ao *H. pylori*.
- ✓ Comparar a presença de constituintes químicos encontrados no *screening* fitoquímico entre as duas espécies de *Baccharis*, e correlacionar com os resultados de suas atividades antimicrobianas.
- ✓ Verificar se ocorrem variações significativas nos valores obtidos para as CIMs e CBMs, entre as duas espécies analisadas.
- ✓ Verificar se os valores de CIM e CBM encontrados para cada espécie, sofrem alterações significativas, quando coletados em locais diferentes.

## 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 EMPREGO DE PLANTAS MEDICINAIS

Nas últimas décadas houve uma gama de trabalhos científicos publicados relatando a descoberta de novos produtos naturais, e boa parte destes tinham como ponto de partida as informações obtidas de comunidades tradicionais (SIMÕES *et al.*, 2003, p.99).

A vasta gama de informações sobre o uso de centenas de plantas como “remédios” em todos os lugares do mundo leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. Como a maior parte da flora é ainda desconhecida do ponto de vista químico, bem como o saber tradicional associado à flora útil, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para o científico (SIMÕES *et al.*, 2003, p.97).

A utilização das plantas com fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga. Certamente, a terapêutica moderna, composta por um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teriam atingindo o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores (YUNES e CALIXTO, 2001, p.298).

Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial, biologia molecular, boa parcela dos fármacos continuam sendo obtidos a

partir de matérias-primas vegetais. Possivelmente, dificuldades na obtenção sintética de moléculas com a mesma estereoquímica, e inviabilidades econômicas, sejam fatores determinantes para este contínuo emprego das matérias-primas vegetais (SIMÕES *et al.*, 2003, p. 305).

Para o desenvolvimento de um medicamento novo são necessários grandes investimentos financeiros (cerca de 350 a 500 milhões de dólares e um período de 10 a 15 anos de pesquisa), valor que muitas vezes é maior que o produto interno bruto de alguns países, e o preço final para o consumidor é geralmente elevado. Desta forma, a população de muitos países pobres e em desenvolvimento não tem acesso à medicina moderna para o tratamento de suas enfermidades (YUNES & CALIXTO, 2001, p.298).

### **3.2 GÊNERO *Baccharis***

O gênero *Baccharis* pertence à tribo Astereae, subtribo Baccharidinae, família Asteraceae. O nome *Baccharis* foi dado por Linnaeus, que descreveu o gênero em 1753. Anos mais tarde, De Candolle (1836, *apud* PIRES, 2004) relacionou 225 espécies para o gênero, sendo desta, 95 para a flora do Brasil. A maior contribuição para o conhecimento do gênero foi o estudo realizado por Malagarriga Heras (1976, *apud* PIRES, 2004), com a elaboração de um catálogo que inclui a maioria dos nomes até então publicados, reconhecendo um total de 431 espécies e 80 entidades infraespecíficas.

Até 2005, o gênero *Baccharis* incluía mais de 500 espécies, distribuídas dos Estados Unidos à Argentina, sendo que 90% estavam distribuídas na América do Sul. Normalmente, são arbustos perenes de 50 cm a 4 m de altura (BUDEL *et al.*, 2005).

Plantas deste gênero possuem como característica marcante a presença de cladódios que fazem o papel de folha, uma vez que estas estão totalmente ausentes ou mostram-se reduzidas, com função fisiológica restrita para a planta (BARROSO, 1976).

Apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país, onde grande número delas é utilizado pela população para controle e/ou tratamento de várias doenças (VEIGA *et al.*, 2005).

Ainda, as espécies deste gênero são importantes economicamente para o homem, pois ajudam no combate à erosão, e podem ser utilizadas como plantas ornamentais. Porém, podem se apresentar como pragas de difícil combate em pastagens, podendo intoxicar o gado. Entretanto, o destaque maior destas, está na medicina, onde várias espécies são utilizadas popularmente (CARNEIRO & FERNANDES, 1996).

Ocorrem naturalmente em solos pedregosos, às margens das estradas, barrancos, ou lugares úmidos nas ribanceiras dos rios e até 2800m de altitude, preferindo condições de pleno sol para seu crescimento (BONA, 2002).

Há muito tempo, plantas deste gênero vêm sendo utilizadas pela população brasileira, principalmente na forma de infusões, para tratar diversos distúrbios, como problemas hepáticos e gastrintestinais, malária, diabetes, úlceras, amidalite, angina, anemia, diarreia, inflamação das vias urinárias, alergias, gases, doenças venéreas, desordens renais, lepra e distúrbios circulatórios (MARTINS *et al.*, 1995; SOUZA & MATOS, 1991; ALMEIDA, 1993).

Verdi *et al.* (2005) afirma que o gênero *Baccharis*, por sua ampla distribuição geográfica e grande variedade de espécies, associado ao notável destaque na medicina popular do Brasil e em outros países da América do Sul, apresenta estudos de atividade biológica um tanto tímidos. Segundo os autores, seu grande potencial em metabólitos secundários e atividades descritas na medicina popular, deixam um vastíssimo campo aberto para a pesquisa de novas moléculas ativas.

As propriedades medicinais atribuídas a este gênero de plantas são alvos de investigações pela comunidade científica na tentativa de caracterizar seus princípios farmacologicamente ativos. Até 2003, apenas aproximadamente 15% das espécies deste gênero haviam sido caracterizadas fitoquimicamente (MOREIRA *et al.*, 2003).

A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde 1900. Atualmente, mais de 150 compostos foram isolados e identificados a partir desse gênero. Os compostos mais comumente encontrados são os diterpenóides, os compostos fenólicos (principalmente flavonóides) e óleos essenciais (ABAD & BERMEJO, 2007).

Como esse grupo de plantas se destaca pela sua utilização na medicina popular Brasileira, muitos trabalhos foram desenvolvidos buscando comprovar as ações farmacológicas de extratos de *Baccharis*, como a atividade antimicrobiana (AVANCINI *et al.*, 2000; FERESIN *et al.*, 2001, BETONI *et al.*, 2006; FURMANN *et al.*, 2007; BORGES, 2007; SCHIMIDT *et al.*, 2008), anti-HIV (SANCHEZ-PALOMINO *et al.*, 2002), espasmolítica (ROJAS *et al.*, 1999; WEIMANN *et al.*, 2002), gastroprotetora e anti-diarréica (BAGGIO *et al.*, 2003; RUIZ *et al.*, 2008; GAMBERINI *et al.*, 1991), anti-inflamatória (LEITE *et al.*, 2007; CIFUENTE *et al.*, 2001; ABAD *et al.*, 2006; GENÉ *et al.*, 1996), anti-diabética (JANUÁRIO *et al.*, 2004), anti-reumáticas (SIMÕES *et al.*, 1998), antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2004) e antiviral (ZANON *et al.*, 1999).

O emprego de espécies de *Baccharis* para melhora das alterações gastrintestinais é bastante disseminado popularmente. Baggio *et al.* (2003) estudaram o efeito do extrato aquoso das folhas de *Baccharis ilinita* sobre o trato gastrintestinal de ratos e concluíram que a planta testada tem efeito protetor sobre lesões gástricas, através da manutenção de fatores fisiológicos protetores como o muco gástrico.

### **3.2.1 *Baccharis trimera***

*Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle, cujo nome vulgar é carqueja ou carqueja amargosa, é nativa dos campos e beiras de matas do sul do Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (ALICE *et al.*, 1995, p.40) (Figura 1).

*B. trimera* é a espécie com maior número de estudos fitoquímicos e farmacológicos do gênero *Baccharis*. Devido à semelhança entre as espécies deste gênero, outras espécies são chamadas popularmente de carqueja e, por isso, são utilizadas indistintamente pela população (SIMÕES *et al.*, 1998).

Segundo Borella *et al.* (2001), *B. trimera* tem grande utilização na produção de medicamentos fitoterápicos industrializados ou magistrais, e é a espécie mais comum do gênero *Baccharis*. Esta espécie pode ser encontrada em todo Brasil, mas concentra-se na região sul.

Muitos estudos de constituição química têm sido relatados para as espécies de carqueja, principalmente em relação à classe de flavonóides. Dentre os constituintes químicos da *B. trimera* descritos estão: lactonas diterpênicas, flavonóides, saponinas, taninos, polifenóis e óleo essencial (acetato de carquejol, nopineno, calameno,  $\alpha$  e  $\beta$  cardineno, eledol, eudesmol, sendo que destes o carquejol é considerado o principal princípio ativo) (SIMÕES *et al.*, 1998).

Pesquisa realizada por Furman *et al.* (2007) demonstrou que, tanto o extrato aquoso, quanto o etanólico de *B. trimera* apresentaram capacidade de exercer uma ação interferente sobre a atividade antimicrobiana com antibióticos ensaiados. Na comparação dos halos de inibição dos antibióticos testados, e os halos dos embebidos com os extratos, ambos mostraram-se maiores quando comparados aos do halo padrão, ou seja, houve uma interação mais acentuada quando empregada a planta concomitantemente com antibióticos. Desta forma, segundo os autores, o uso de produtos derivados desta planta pode, em algumas situações, interferir sobre a efetividade de antibióticos usados no tratamento clínico.

A indicação popular do emprego desta planta como antiácida e anti-dispéptica, foi constatado por Gamberini *et al.* (1991), utilizando o extrato aquoso de *B. trimera* em ratos e camundongos, onde constataram uma redução tanto na secreção ácida do estômago, quanto no aparecimento de lesões gástricas, induzidas por estresse.

Ainda, Dias *et al.* (2009) demonstraram que o extrato bruto liofilizado de *B. trimera* reduziu em aproximadamente 90% a área total de lesão ulcerativa, induzida por solução de ácido clorídrico em etanol. Também, observaram que nas concentrações de 400 mg/kg e 200 mg/kg do extrato, as reduções da área total de lesão apresentaram-se muito próximas, indicando que a relação dose-efeito provavelmente ocorre abaixo de 400 mg/kg, uma vez que não houve diferença aparente acima de 200 mg/kg.

Extratos de *B. trimera*, obtidos pelos solventes hexano e diclorometano, apresentaram atividade antimicrobiana semelhante com 57% das bactérias Gram-positivas e 46% das bactérias Gram-negativas testadas. Porém, o extrato obtido pelo solvente acetonitrila não demonstrou atividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram-positivas, mantendo a taxa de inibição com 46% das bactérias Gram-negativas testadas (BORGES, 2007).

Avancini *et al.* (2000) constataram a atividade antimicrobiana (bacteriostática e bactericida) do decocto de *B. trimera* contra isolados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas *in vitro*, possibilitando sua utilização como anti-séptico e desinfetante, mostrando a correlação entre os dados experimentais e o uso relatado popularmente.

Schmidt *et al.* (2008) demonstraram atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *B. trimera* sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Bacillus subtilis*.

Estudos realizados por Leite *et al.* (2007), com extrato aquoso de *B. trimera*, demonstraram eficiência na diminuição de leucócitos (principalmente dos leucócitos Polimorfonucleares - PMN, que são as células aumentadas caracteristicamente na inflamação aguda) e na atividade da enzima Lactato desidrogenase - LDH (enzima liberada em consequência da lesão ou morte celular), referindo atividade antiinflamatória e citoprotetora do extrato aquoso da *B. trimera*.



FIGURA 1 – Espécie *B. trimera*.  
Fonte: Heiden *et al.* (2006).

### 3.2.2. *Baccharis articulata*

*Baccharis articulata* (Lam.) Pers. cujo nome popular é carqueja-doce, carquejinha ou carqueja-do-morro é nativa do sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte e centro da Argentina (ALICE *et al.*, 1995, p.36) (Figura 2).

As propriedades do decoto ou infusão desta espécie, são conhecidos na medicina tradicional como antidiabética, diurética, digestiva entre outras (ABAD *et al.*, 2007).

É visível na identificação macroscópica, que os ramos de *B. articulata* apresentam alas articuladas com extremidades arredondadas e coloração acinzentada, que a diferencia da *B. trimera* (SIQUEIRA *et al.*, 1988). Ainda, *B. articulata* é bilada, enquanto *B. trimera* é trilada, outra diferença é a cutícula lisa, que em *B. trimera* é estriada (CORTADI *et al.*, 1999 *apud* Budel *et al.*, 2005).

O extrato etanólico desta espécie apresentou atividade antiviral, sendo capaz de inibir a infectabilidade do vírus Vero Celis-pseudorabies RC/79 (vírus herpes suis) (ZANON *et al.*, 1999).



FIGURA 2 – Espécie *B. articulata*.  
Fonte: Heiden *et al.* (2006).

### 3.2.3 SCREENING FITOQUÍMICO

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários ou grandes moléculas (lipídeos, protéidos e glicídeos) e os metabólitos secundários, que atuam primeiramente na defesa do vegetal, e como toxinas (alcalóides, saponinas, cumarinas, etc.). Por outro lado, alguns metabólitos secundários atuam de maneira oposta, atraindo insetos, pássaros, entre outros, responsáveis pela polinização de muitas plantas (como os flavonóides) (SIMÕES *et al.*, 2003, p. 68).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer estes constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença (SIMÕES *et al.*, 2001, p.165). Classicamente, em análises preliminares (sem o objetivo de isolamento de substâncias químicas), a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (SIMÕES *et al.*, 2003, p.171).

### 3.2.3.1 Alcalóides

Os alcalóides possuem grande importância farmacêutica, assim como o conhecimento das suas propriedades químicas. O termo alcalóide tem sido utilizado para denominar substâncias nitrogenadas, de caráter básico, isolados principalmente de vegetais, derivados de aminoácidos e, que apresentam ação biológica, normalmente sobre o Sistema Nervoso Central, apesar da grande variação estrutural do grupo (BIAVATTI & LEITE, 2005, p.61).

Muitas plantas que possuem alcalóides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, principalmente pelo fato de a maioria dos alcalóides terem sabor amargo e desagradável (SIMÕES *et al.*, 2001, p.69).

Simões *et al.* (2003, p.665) descrevem várias atividades biológicas relacionadas aos alcalóides, como: atividade amebicida, anticolinérgica, anti-hipertensiva, antimalárica, diurética, antiviral, entre outras.

### 3.2.3.2 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Uma substância fenólica ou polifenólica é aquela que possui um ou mais núcleos aromáticos, contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais, tais como ésteres, éteres, glicosídeos e outros (SIMÕES *et al.*, 2003, p.501).

Os flavonóides, juntamente com os diterpenos, são compostos de maior ocorrência no gênero *Baccharis*. Apresentam-se normalmente como agliconas livres<sup>2</sup> e muito raramente na forma glicosilada, o que é uma característica da família Asteraceae (VERDI *et al.*, 2005).

---

<sup>2</sup> Ocorrem quando os metabólitos (flavonóides) não estão conjugados com açúcares (SIMÕES *et al.*, 2003, p.501).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, dentre elas, proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBONE & WILLIAMS, 2000).

Como são sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas, presume-se que seja um dos principais responsáveis pela atividade antimicrobiana destas. Esta atividade, possivelmente ocorra pela habilidade de complexação com a parede bacteriana. Os flavonóides mais lipofílicos podem lisar a membrana microbiana (SARTORI, 2005).

#### 3.2.3.3 Cumarinas

As cumarinas estão amplamente distribuídas no reino vegetal. São derivados da benzo- $\alpha$ -pirona, e estão divididas em dois grandes grupos: furanocumarinas (fototóxicas) e piranocumarinas (vasodilatadoras) (BIAVATTI & LEITE, 2005, p.31).

As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico, amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo também ser encontrados em fungos e bactérias. A esses compostos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antioxidante (PAYÁ, 1996).

#### 3.2.3.4 Saponinas

As saponinas são constituídas por uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), fato que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e sua ação detergente e emulsificante. Em solução aquosa formam espuma persistente e abundante. Esta espuma é estável à ação de ácidos minerais diluídos, diferenciando-a daquela dos sabões comuns (SIMÕES *et al.*, 2003, p.607).

Como são substâncias polares, possuem elevada solubilidade em água e pouca em solventes apolares. Desta forma, algumas são capazes de agir sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade, ou causando sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão às atividades hemolíticas, ictiotóxica e molusquicida, freqüentemente observadas (SIMÕES *et al.*, 2003, p.618).

Devido a sua capacidade de complexação com colesterol, existe um número significativo de trabalhos objetivando avaliar o uso de saponinas na dieta, com o objetivo de reduzir os níveis de colesterol sérico (SIMÕES *et al.*, 2003, p.618).

#### 3.2.3.5 Taninos

Os taninos são substâncias polifenólicas quimicamente complexas, que quando sofrem reações de hidrólise ou quebra fornecem polihidroxifenóis relativamente simples, classificados de acordo com a identidade destas substâncias (BIAVATTI & LEITE, 2005, p.41).

Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e plantas em geral, através da complexação entre taninos e proteínas, que é a base de algumas de suas propriedades biológicas, tais como controle de insetos, fungos e bactérias (AERTS *et al.*, 1999).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, renais, do sistema urinário, e processos inflamatórios em geral (MELLO, 1999).

Na indústria alimentícia são empregados como antioxidantes nos sucos de frutas e bebidas e como clarificantes de vinhos; também são empregados no curtimento de couro, através da associação dos polifenóis com a proteína colágeno (MELLO, 1999).

### **3.2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

As pesquisas de produtos naturais, oriundos de plantas, consistem na obtenção de princípios ativos contidos nas espécies vegetais pelo fato de possuírem alto percentual de diversidade molecular, essencial para a descoberta e produção de novos fármacos. Os progressos nos estudos da etnofarmacologia, fitoquímica, atividades biológicas, biologia molecular e da estratégia de modificação molecular racional, têm sido importantes para compreender e elucidar o mecanismo de ação de princípios ativos obtidos de plantas, como também o entendimento e identificação dos sítios receptores existentes nas células do hospedeiro (YUNES & CALIXTO, 2001, p.493).

Segundo Duarte (2006), no Brasil a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, até 2006, somente estavam disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. Para o autor, esse baixo número de registros pode ser consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais. Além disso, a maioria dos estudos constituiu-se de testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseados em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas.

#### 3.2.4.1 Agentes Antimicrobianos

Agentes antimicrobianos são drogas usadas no tratamento de infecções causadas por bactérias, agem interferindo em alguma via metabólica do microorganismo-alvo. Podem ser obtidos sinteticamente, ou ser produzidos por microorganismos, em geral bactérias e cogumelos (SILVA, 2006, p.934).

Antimicrobianos que inibem a multiplicação da bactéria, mas não a destroem, são denominados de “bacteriostáticos”. Com a suspensão desse tipo de droga, a

bactéria volta a crescer. Trata-se, portanto, do efeito reversível (SILVA, 2006, p. 934).

Quando o antimicrobiano exerce um efeito letal e irreversível sobre bactérias sensíveis, é denominado de “bactericida” (SILVA, 2006, p. 934).

Para se evidenciem as ações bacteriostáticas e bactericidas, é necessário que o antibiótico se apresente, respectivamente, em Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CBM) (SILVA, 2006, p. 934).

Como a atividade terapêutica dos antibióticos depende, entre outros fatores, das suas concentrações nos fluídos orgânicos, a CIM e a CBM constituem determinações essenciais, pois delas depende o estabelecimento do regime posológico do antibiótico. A CIM e CBM são estimadas *in vitro*, mas orientam também para determinar as concentrações bacteriostática e bactericida dos antibióticos nos fluídos orgânicos (SILVA, 2006, p. 934).

Estas drogas podem agir através de vários mecanismos de ação, como inibição da síntese da parede celular bacteriana, alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucléicos, entre outras. O mecanismo pelo qual o antimicrobiano interage com a bactéria, irá determinar se o efeito produzido será bacteriostático ou bactericida (SILVA, 2006, p.935).

#### 3.2.4.2 Atividade da Sazonalidade sobre a Atividade Antimicrobiana

Schmidt *et al.* (2008) demonstraram que a variação sazonal afetou muito pouco o potencial antimicrobiano dos extratos de *B. trimera*. Exceto contra os microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, onde o extrato de verão apresentou atividade bactericida maior em concentração aos extratos de outono, inverno e primavera. Segundo os autores, esta variação deve estar relacionada a um maior acúmulo de compostos com ação antimicrobiana nos meses de verão, mas ressaltam que outros compostos com potencial antimicrobiano, como

por exemplo, saponinas, mono e diterpenóides, presentes nos extratos, possam também ter contribuído para os resultados obtidos.

Um estudo realizado por Borella *et al.* (2001), já havia demonstrado teores maiores de flavonóides em indivíduos de *B. trimera* coletados no verão.

#### 3.2.4.3 Resistência Antimicrobiana

Para Duarte (2006) a resistência a drogas, desenvolvida por patógenos humanos e animais, é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica, e um sério problema, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Segundo o autor, o consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa, tem resultado em altos índices de resistência apresentado por populações bacterianas. Este cenário tem impulsionado as companhias farmacêuticas a buscarem novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais.

A resistência a antimicrobianos tornou-se um dos maiores problemas de Saúde Pública, pois o surgimento de cepas de microorganismos multirresistentes, devido ao uso desenfreado de antibióticos, dificulta o sucesso do tratamento, levando o prescritor a realizar trocas sucessivas de antimicrobianos em busca de um tratamento eficaz. Diante disto, a comunidade científica está se engajando em buscar novas fontes de substâncias, que possuam esse tipo de atividade (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Para Carvalho (2003), na busca de novos antimicrobianos devem ser enfatizados aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e, que muitas plantas são vastamente usadas e testadas há centenas de anos, com as mais diversas finalidades, por populações do mundo inteiro. Para isso, o autor sugere que antes da determinação das frações ativas por métodos bioquímicos satisfatórios, agora disponíveis, seja necessário e útil, o uso preliminar de métodos de triagem de domínio popular, como macerados, infusões, extratos aquosos, etanólicos, entre outros. Ainda, o autor ressalta que os princípios

ativos podem estar presentes em diferentes frações de um composto ou mesmo, que um princípio ativo seja liberado só após a ação metabólica do animal.

### **3.3 *Helicobacter pylori***

O *H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa, microaerófila e espiralada. Foi isolado pela primeira vez, em 1983, por Warren e Marshall, na Austrália (Prêmio Nobel de Medicina – 2005), a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica. Entretanto, data do século passado o encontro de bactérias espiraladas no estômago de animais, pois em 1906 Krienitz havia observado “espiroquetas” no estômago humano (TONELLI & FREIRE, 2000).

Segundo Oplustil *et al.* (2001, p. 164) este microorganismo foi reconhecido, como o principal responsável pela gastrite crônica, e têm implicado na patogênese da doença ulcerosa duodenal e gástrica, dispepsia e adenocarcinoma gástrico. Para os autores, a bactéria pode contribuir diretamente para a destruição da célula gástrica, pela produção de uma toxina vacuolizante, bem como enzimas tóxicas, especialmente lipase, urease e proteases, que acabam por desregular os fatores defensivos do epitélio.

O *H. pylori* tem distribuição cosmopolita, e estima-se que cerca de metade da população mundial esteja infectada. A prevalência da infecção varia com a idade e o nível socioeconômico, sendo que em países em desenvolvimento, podem apresentar taxas de soropositividade maiores entre faixas etárias mais jovens (SHERMAN *et al.*, 2002).

O ser humano é o principal reservatório de *H. pylori*, não tendo ainda sido encontrados animais que sirvam de reservatórios significantes. A infecção não é autolimitada e pode persistir por muitos anos. Reservatórios ambientais também podem existir, as águas contaminadas são fontes importantes em determinadas áreas (GLYNN *et al.*, 2002).

O *H. pylori* apresenta especial tropismo pelo epitélio gástrico, tanto do estômago quanto áreas de metaplasia gástrica fora do estômago, e provoca reações inflamatórias e imunológicas que perduram por toda a vida, a menos que a infecção seja erradicada (HUNT, 1996).

A infecção por *H. pylori* tem curso clínico altamente variável, manifestando-se por gastrite, úlcera gástrica ou duodenal, atrofia da mucosa, carcinoma gástrico ou linfoma gástrico (*mucosa-associated lymphoreticular tissue* - MALT) (MAEDA *et al.*, 2007; MBULAITEYE *et al.*, 2009; MAGIDAN *et al.*, 2004, p.482).

Embora a OMS estime altos índices de infecção, entre a população mundial, a maioria destes pacientes infectados não desenvolve sintomas clínicos ou ulceração péptica, e continuam vivendo com gastrite superficial crônica (MOSS & MALFERTHEINER, 2007). Estes diferentes resultados clínicos, relatados para a infecção pelo *H. pylori*, devem-se ao fato da infecção ser determinada por uma complexa interação entre fatores do hospedeiro e da bactéria, e não somente pela presença desta (LADEIRA *et al.*, 2003).

A fase aguda da infecção não é comumente detectada na prática clínica. Nessa fase, após a contaminação pela bactéria, há um período de poucos dias, associados a um quadro histopatológico de denso infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares (característicos da inflamação aguda), e um exsudato<sup>3</sup> aderente à superfície epitelial gástrica, de curta duração. É comum haver destruição do epitélio, podendo ocorrer atrofia glandular (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Assim, por determinar a ocorrência de inflamação crônica da mucosa gástrica, que pode persistir por décadas, a infecção por *H. pylori* pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer gástrico. Sabe-se que este tipo de câncer é a segunda causa mais comum de morte por câncer no mundo, e quase dois terços dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (MULLER *et al.*, 2007).

---

<sup>3</sup> Na presença de inflamação as células endoteliais sintetizam uma série de proteínas especiais, que tornam os capilares mais permeáveis aos fluidos e a moléculas grandes, como os anticorpos. Este fluido é denominado exsudato (SCHAECHTER *et al.*, 2002, p. 56).

Em 1994, a OMS (Organização Mundial da Saúde) admitiu o papel da infecção deste microorganismo na patogênese do carcinoma gástrico, com base em evidências epidemiológicas e plausibilidade biológica.

A erradicação com drogas antimicrobianas geralmente leva ao desaparecimento das úlceras. Porém, algumas cepas de *H. pylori* têm se mostrado resistentes aos tratamentos tradicionais, o que é de relevante importância em pacientes imunossuprimidos, pacientes HIV positivo e câncer gástrico em estágio patológico avançado (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Apesar do reconhecimento de que *H. pylori* esteja associado à maioria das úlceras pépticas, e subjacentes ao câncer gástrico, pouca atenção tem merecido das políticas de saúde pública, em termos de detecção e tratamento, apesar de estudos populacionais terem mostrado que a erradicação da infecção pode ser obtida a custo razoável (AXON, 2007).

### **3.3.1 Morfologia**

*H. pylori* é uma bactéria Gram-negativa, microaerófila e espiralada, em forma de S ou em bastonete curvo, que mede cerca de 3 a 5 µm de comprimento por 0,5 µm de largura. Tem parede celular externa lisa, e possui de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e com bulbo terminal. É uma bactéria de crescimento lento, sendo assim é muito difícil cultivá-la *in vitro* (TONELLI & FREIRE, 2000) (Figura 3).

Para seu cultivo é necessária uma atmosfera microaerofílica (5-6 % de O<sub>2</sub>, 8-10% CO<sub>2</sub>, 80-85% N<sub>2</sub>), umidade, temperatura entre 35° e 37°C e 3 a 5 dias de incubação, em meios ágar sangue não seletivos, como *Brucella*, BHI (infusão de cérebro-coração), Mueller-Hinton, e TSA (agar soja tripton), todos acrescido de 5% de sangue de carneiro ou de cavalo. As colônias são pequenas, acinzentadas e translúcidas. Na coloração de Gram, apresentam-se como bacilos pequenos, curvos, ligeiramente roliços, e as reações positivas para catalase, oxidase e urease permitem a identificação deste microorganismo (KONEMAN *et al.*, 2001, p.343-347).

O *H. pylori* possui como característica bioquímica fundamental, a produção de grandes quantidades de urease (CHAN et al., 1992). Esta enzima hidrolisa a uréia com conseqüente formação de amônia e gás carbônico. A amônia reage para formar carbonato de amônio, através da captação de íons  $H^+$  do meio, resultando na alcalinização e aumento do pH do meio, propiciando sua sobrevivência na mucosa gástrica, que por sua vez é o seu habitat natural, particularmente o antro (KONEMANN et al., 2001, p.1405).

Este microorganismo pode apresentar-se em duas formas morfológicas: na forma replicativa é um organismo Gram-negativo, de crescimento lento, microaerófilo, móvel, espiralado, com quatro a seis flagelos, com a característica de abundante produção de urease, e na forma cocóide pode ou não ser flagelada, e parece conter os componentes necessários para se replicar. Embora a forma cocóide seja um “esporo” em potencial, não existem evidências que essa seja a forma transmissível da bactéria (HUNT, 1996).



FIGURA 3 - *H. pylori* observada ao microscópio eletrônico.  
Fonte: Foto de Yutaka Tsutsumi *apud* LEAL (2008).

### **3.3.2 Epidemiologia do *H. pylori***

A prevalência do *H. pylori* na população em geral, é muito comum. Segundo Oplustil et al. (2004, p.164) estudos sorológicos remetem a taxas de aproximadamente 70% a 90% em países em desenvolvimento e de 25% a 50% em países desenvolvidos.

A prevalência da infecção parece depender basicamente dos seguintes fatores: a) sócio-econômicos: a prevalência é inversamente proporcional às condições econômicas e ao nível social de uma determinada população ou comunidade, b) idade: há um aumento de prevalência com o aumento da faixa etária, sendo que nas regiões pobres as crianças tendem a contagiarem-se precocemente, c) étnico/genético: há evidências de que indivíduos não-caucasianos sejam mais predispostos à colonização (mesmo controlando-se o fator sócio-econômico) e, gêmeos monozigóticos sejam mais predispostos à colonização quando comparados a gêmeos dizigóticos (BLECKER *et al.*, 1994; MALATY, 1994; PARSONNET *et al.*, 1992).

Segundo Schaechter *et al.* (2002, p.200), indivíduos em maior contato com fezes e secreções humanas, assim como os adultos que residem em instituições e crianças de orfanatos, apresentam taxa de infecção elevada.

Estudo realizado por Bedoya *et al.* (2003), no Brasil, com crianças e jovens até 18 anos, de famílias de baixa renda, evidenciou um percentual de 34% de soropositivos, que aumenta significativamente com a idade. Em países desenvolvidos, a infecção em crianças é menos freqüente. Os autores ainda constataram que a prevalência da infecção é influenciada por fatores como renda, nível de instrução e condições de moradia.

Estudos recentes demonstraram que na Índia a taxa de infectados, por *H. pylori*, era de aproximadamente 80% (PODDAR & YACHHA, 2007). Já na China, foram encontradas taxas que variaram de 60 a 70% (Zhang *et al.* (2008).

Na Figura 4 estão relatadas as taxas de infecção para vários países do mundo, onde ficam evidentes as diferenças nas taxas de infectados principalmente entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento (HELICOBACTER FOUNDATION, 2006).

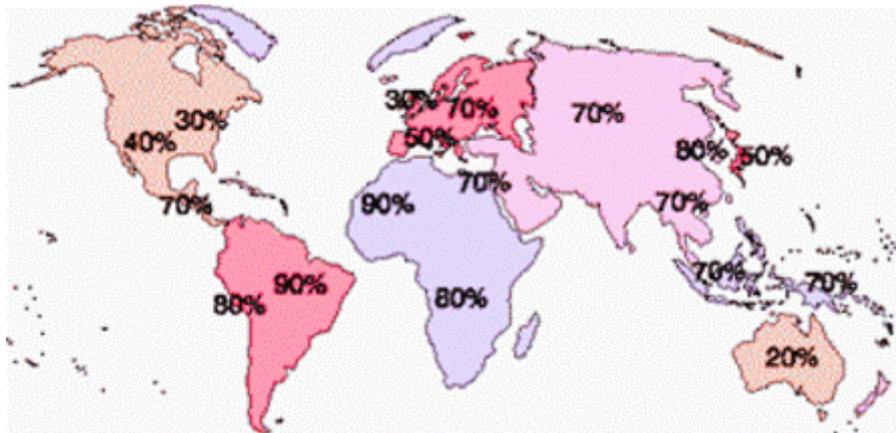


FIGURA 4 - Prevalência do *H. pylori* no mundo.

Fonte: Helicobacter Foundation (2006).

Em pesquisa realizada por Zaterka *et al.* (2007), no Brasil, os autores relataram, em geral, taxas de prevalência de 65% dos indivíduos saudáveis.

Vergueiro *et al.* (2008) demonstraram que a prevalência da infecção por *H. pylori*, na região urbana de São Paulo, em doadores de medula óssea, era de 48,8%. Ainda, os autores avaliaram os fatores associados a esta infecção, constatando que a ausência de água encanada, a escolaridade da mãe e do indivíduo contaminado, estavam significativamente associados.

Em 2009, a Agência Nacional de Saúde Suplementar divulgou as “Primeiras Diretrizes Clínicas na Saúde Complementar”, onde foi realizada uma revisão dos trabalhos publicados a respeito da prevalência da infecção por *H. pylori* em diferentes grupos populacionais brasileiros, em dispepsia funcional e em dispépticos com doença orgânica, e mais algumas considerações à infecção causada por este microorganismo (BRASIL, 2009, p.29). Na Tabela 1 estão demonstrados os valores de prevalência de infecção divulgados pela Agência Nacional de Saúde Suplementar.

TABELA 1 - Prevalência de infecção por *H. pylori* em diferentes populações brasileiras assintomáticas, em valores percentuais e absolutos.

LOCAL	PREVALÊNCIA		POPULAÇÃO
	%	N	
Recife	31,4	127/405	Estudantes de medicina e residentes.
São Paulo	39,2	406/1037	Japoneses voluntários saudáveis.
São Paulo, Curitiba, Mogi das Cruzes e Mirandópolis.	48,1	463/963	Japoneses voluntários saudáveis.
Belo Horizonte	62,1	191/308	Doadores de sangue assintomáticos
Fortaleza	63,0	384/610	População geral.
Pelotas*	63,4	230/363	Indivíduos voluntários.
São Paulo	65,6	652/993	Doadores de sangue.
Amazonas	78,8	175/222	Indígenas.
Belo Horizonte	81,7	142/174	Voluntários
Mato Grosso	83,3	170/204	Moradores da zona rural
Valor Médio	55,7	2940/5279	

\*Teste respiratório, os demais estudos usaram métodos sorológicos.

Fonte: BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR (2009, p.31).

Diante dos dados analisados, os participantes estabeleceram as seguintes conclusões: a) a prevalência da infecção é semelhante em homens e mulheres; b) a prevalência da infecção aumenta com a idade; c) a prevalência é maior na classe socioeconômica mais baixa; d) quanto maior a promiscuidade (número de indivíduos compartilhando a mesma casa ou cômodo), maior a prevalência da infecção (BRASIL, 2009, p.31).

### 3.3.3 Etiopatogenia

No estômago, a principal barreira de proteção é constituída pela confluência entre as células epiteliais e a secreção contínua de muco-íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Esta secreção na camada de muco, cuja espessura é de aproximadamente 200 – 300  $\mu\text{m}$ , cria um gradiente de pH próximo à neutralidade, na superfície epitelial do

estômago e duodeno, promovendo a primeira forma de proteger a mucosa da acidez (ALLEN & FLENSTROM, 2005).

Além disso, o muco que reveste as células da superfície do epitélio contém fosfolipídios bipolares que, devido à elevada polaridade, previnem a retrodifusão de ácidos minerais, como ácido clorídrico (HCl), da luz do estômago para o interior da mucosa (KONTUREK *et al.*, 2005).

### **3.3.4 Mecanismo de Ação do *H. pylori* sobre a Mucosa Gástrica**

O mecanismo pelo qual a bactéria predispõe à doença péptica não está completamente esclarecido. Como o *H. pylori* também é comum em indivíduos saudáveis, não é considerado elemento isolado na gênese desta doença. Sabe-se que a bactéria induz inflamação crônica da mucosa gástrica com produção de superóxidos, citocinas e fatores de crescimento que contribuem para promoção da carcinogênese (SUERBAUM & MICHETTI, 2002).

Brzozowski (2003) acredita que, inicialmente, o *H. pylori* provoque uma lesão na mucosa com subsequente liberação, em cascata, de substâncias semelhantes à histamina, acarretando um sangramento da mucosa e instalação de um quadro de gastrite aguda. Segundo o autor, esses achados podem ser observados em seres humanos após a ingestão de aspirina ou etanol concentrado, bem como em animais experimentalmente expostos a vários irritantes da mucosa.

Após o indivíduo contagiar-se pelo microorganismo, inicia um período de proliferação bacteriana intensa e inflamação gástrica concomitante com hipocloridria, que podem durar semanas. Decorrido este período, a resposta inflamatória é reduzida a um nível baixo e estável, e o hospedeiro organiza uma resposta imune que é ineficaz para eliminar o *H. pylori*. Nesta fase, o pH gástrico normal também é restaurado, e a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática por anos ou por toda vida (SCHAECHTER *et al.*, 2002, p. 200).

Segundo Yuan *et al.* (2006) o *H. pylori* pode danificar o sistema de defesa da mucosa através da redução da camada de muco, diminuindo a circulação sanguínea na mucosa, e interagindo com o epitélio gástrico em todos os estágios de infecção.

### **3.3.5 Transmissão**

Muitos modos de transmissão do *H. pylori* têm sido descritos na literatura, estes incluem contato direto entre os indivíduos, que é considerado o mais comum modo de transmissão, fontes de água e comida contaminadas, e menos comumente a transmissão durante endoscopias, e por animais (BROWN, 2000).

Estudos sugerem que mães infectadas podem desempenhar um papel importante na transmissão intrafamiliar do *H. pylori*. Segundo eles, a forte associação entre a infecção de mães e suas crianças pode ser explicada pelo grande contato pessoal, o qual é mais freqüente quando as crianças são menores, e é justamente neste período que são descritas as maiores taxas de aquisição (SALIH, 2009; ESCOBAR & KAWAKAMI, 2004).

Para Salih (2009), nos países em desenvolvimento as condições de superlotação criam um contato próximo entre mães e filhos e entre filhos que compartilham a mesma cama, representando, desta forma, uma das possíveis causas para as altas taxas de infecção relatadas nestes países. Adicionalmente, nestes países os pais trabalham e tem pouco contato com seus filhos e por isso a transmissão do *H. pylori* é, em geral, vinculada a mãe.

Pesquisa realizada por Malaty *et al.* (2000) já havia demonstrado o papel das mães infectadas na transmissão intrafamiliar, pois haviam encontrado uma prevalência de infecção de 23% em crianças com mães infectadas, e de 5% em crianças com mães não infectadas.

O modo de transmissão pessoa para pessoa é sustentado pelos altos índices de infecção entre crianças institucionalizadas, e adultos que vivem em aglomerações

familiares. Também é fundamentado pela detecção do DNA do *H. pylori* em vômito, saliva, placa dentária, suco gástrico e fezes (BROWN, 2000).

Para população em geral, parece que o modo de transmissão mais comum é o contato direto, pelas rotas oral-oral (através de vômito e saliva), ou talvez, pela rota fecal-oral. Transmissão por água contaminada, provavelmente por contaminação fecal, pode também ser uma importante fonte de infecção, especialmente em partes do mundo onde o consumo de água não tratada é comum (BROWN, 2000).

Segundo Agostinho (2003) não existe relatos sobre infecção por via sexual, pois esta bactéria é não invasiva e, portanto, não pode chegar à mucosa gástrica por outra via.

Artherton (1997) relatou que existem indícios de que o *H. pylori* possa permanecer ou transitar pela área bucal, na placa dentária ou saliva, indicando provável transmissão por talheres, beijos, utensílios dentários mal esterilizados entre outros. Ainda, Brown (2000) alerta que a infecção pode ocorrer por endoscópios contaminados, que não foram devidamente desinfetados.

A melhora dos hábitos de higiene domiciliar, o consumo de água tratada ou fervida, e adequada higienização dos vegetais, podem prevenir ou minimizar o risco de aquisição e transmissão de *H. pylori* (SALIH, 2009).

### **3.3.6 Isolamento**

O isolamento do *H. pylori*, a partir de fragmentos da mucosa gástrica, é o método mais específico para o diagnóstico da infecção. Permite o estudo da amostra quanto aos fatores de virulência e a suscetibilidade a antimicrobianos, visando uma terapêutica melhor orientada (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

### 3.3.7 Cultura

A cultura é o método mais específico para identificação da bactéria e o único que determina a suscetibilidade aos antimicrobianos (MALFERTHEINER *et al.*, 2002).

Meios de cultura como Ágar Mueller Hinton (CLSI M100-S19, p.91), *Brucella*, BHI (infusão de cérebro-coração) e TSA (agar soja triptona) (KONEMAN *et al.*, 2001, p. 343-347), Belo Horizonte Medium (OPLUSTIL *et al.*, 2004, p.164), podem ser empregados para cultura do *H. pylori*, mas todos devem ser acrescidos de 5% de sangue desfibrinado de carneiro estéril, e mantidos em uma atmosfera microaerofílica (5-6 % de O<sub>2</sub>, 8-10% CO<sub>2</sub>, 80-85% N<sub>2</sub>).

Na Figura 5 estão demonstradas colônias de *H. pylori*, obtidas após 72 horas de incubação, sob microaerofilia, a 35,9 ° C, em ágar soja triptona acrescido de 5 % de sangue estéril de carneiro.



FIGURA 5 - Colônias de *H. pylori*.

### 3.3.8 Fatores genéticos e de virulência do *H. pylori*

A motilidade do *H. pylori*, a produção de urease, a produção de hipocloridria na fase aguda da infecção e a aderência ao epitélio gástrico, são fatores próprios do *H. pylori* que possibilitam a colonização gástrica e, posteriormente, a agressão da mucosa, favorecendo, desta forma, a criação de um “habitat” adequado no ambiente gástrico (MOBLEY, 1996).

Um marcador potencial da inflamação, causada pelo *H. pylori*, é a citotoxina Cag A, uma proteína encontrada em 60 a 70% das amostras. Os anticorpos do soro e da mucosa para Cag A estão presentes em cerca de 90% de todos os pacientes com úlcera duodenal. Ainda, a expressão de Cag A *in vivo* está altamente correlacionada com a úlcera péptica e a duodenite (SCHAECMTER *et al.*, 2002, p. 201).

Indivíduos Cag A positivos, apresentam níveis de interleucina – 8 (IL-8) na mucosa, bem mais elevados, do que aqueles Cag A negativos. Esta interleucina é um quimioatraente potente, e um peptídeo ativador de neutrófilos. Assim, esses níveis elevados de IL – 8 podem explicar a ligação entre amostras Cag A positivas e a úlcera péptica (SCHAECMTER *et al.*, 2002, p. 201).

QUEIROZ *et al.* (2000) também relata a associação entre a infecção por amostras cag-A positivas e o carcinoma gástrico. Segundo o autor 95 e 62,3% das amostras isoladas de crianças com e sem úlcera duodenal, respectivamente, são cag-A positivas.

O gene *vacuolating cytotoxin A (vacA)*, codifica a proteína Vac A, que é uma exotoxina capaz de induzir diretamente a formação de vacúolos intracitoplasmáticos e apoptose das células epiteliais. A toxina aumenta também a permeabilidade epitelial, o que pode facilitar tanto a passagem de substâncias tóxicas para dentro do epitélio como a difusão de nutrientes para a camada mucosa, favorecendo a sobrevivência do *H. pylori* (MONTECUCCO & BERNARD, 2003).

A adesina *blood-group antigen-binding adhesin A (Bab A)* é responsável pela aderência da bactéria a mucosa gástrica, desempenhando um papel crítico na transferência de fatores de virulência bacterianos, que lesam a mucosa gástrica, seja diretamente ou em decorrência da resposta inflamatória e/ou auto-imunidade. Além disso, bactérias que se mantêm firmemente aderidas ficam menos expostas à acidez gástrica e não são eliminadas pelos movimentos peristálticos (RAD *et al.*, 2002).

### **3.3.9 Aspéctos clínicos**

Segundo Dominguez-Munoz (2001), os pacientes infectados por *H. pylori* podem permanecer infectados sem apresentar sintomas, isto irá depender dos demais fatores envolvidos no desenvolvimento de doença gástrica.

Em pacientes com úlcera péptica os sintomas mais relatados são dores abdominais, vômitos, anorexia, perda de peso, distensão abdominal, eructação, e mais raramente meteorismo e anemia ferropriva (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

### **3.3.10 Diagnóstico da infecção por *H. pylori***

Apesar da descoberta do *H. pylori* a mais de duas décadas, do fato deste patógeno estar sendo alvo de pesquisas básicas na área bioquímica e da clínica, e das inúmeras descobertas, na última década acerca das infecções causadas pelo *H. pylori*, muitos paradigmas sobre o diagnóstico, e o ideal protocolo de tratamento continuam obscuros (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Os critérios histopatológicos são extremamente importantes para definir e dar suporte ao diagnóstico e prognóstico. Nesse sentido, os avanços na área molecular abrem a possibilidade de utilização de marcadores genéticos que, somados aos dados histopatológicos e imunohistoquímicos, podem levar a diagnósticos e prognósticos mais seguros (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

A pesquisa de anticorpos anti-*H. pylori* (que utiliza amostras do soro, urina, saliva do paciente), de antígenos de *H. pylori* nas fezes, e o teste respiratório com uréia marcada com carbono-13, constituem-se em métodos não invasivos disponíveis (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

Porém, a sensibilidade de todos os métodos, para detecção do *H. pylori* em amostras de biópsias (teste rápido da urease, cultura, PCR<sup>4</sup>, e métodos histológicos) poderão ser afetados pela distribuição irregular deste microorganismo no estômago (HOLTON, 1997).

Segundo Bittencourt *et al.* (2006) a endoscopia digestiva alta (EDA) é o método de investigação de escolha para o diagnóstico da doença ulcerosa péptica, mesmo em crianças muito pequenas. Na maioria das vezes as lesões encontradas nas endoscopias são únicas, entretanto, podem aparecer lesões múltiplas. Mas, mesmo sendo um exame invasivo, e de custo elevado, o método é seguro e confiável.

### **3.3.11 Quando tratar infecções por *H. pylori***

Segundo o Consenso Brasileiro sobre o *H. pylori*, o tratamento medicamentoso deve ser realizado nos seguintes casos: - pacientes de risco para úlcera/complicações que utilizarão antiinflamatórios não esteroidais (AINE); - pacientes com história prévia de úlcera ou hemorragia digestiva alta, que deverão usar AINE inibidores específicos ou não da COX - 2<sup>5</sup>; - úlcera gastroduodenal (ativa ou cicatrizada); - gastrite histológica intensa; - indivíduos de risco para câncer gástrico; - pacientes de risco para úlcera ou complicações que deverão usar cronicamente derivados do ácido salicílico (AAS), mesmo em doses baixas; - pós-ressecção de câncer gástrico precoce; - pós-cirurgia para câncer gástrico avançado e - Linfoma MALT de baixo grau (COELHO *et al.*, 2005).

---

<sup>4</sup> Proteína-C Reativa é um marcador de resposta de fase aguda. Níveis séricos de PCR aumentam rapidamente após dano tecidual, infecção, ou outros processos inflamatórios. É produzida pelo fígado, e está normalmente presente em níveis muito baixos. Porém, após um trauma agudo ou infecção, é rapidamente sintetizada pelos hepatócitos em resposta a liberação de citocinas na circulação, pela ativação de leucócitos (<http://www.gendiag.com.br/conhecimento/informativos/active-proteina-c-reativa-elisa>).

<sup>5</sup>A COX-2 é uma enzima presente em processos inflamatórios, responsável por sintetizar prostanoídes a partir do ácido aracdônico, importante na conversão do ácido aracdônico em prostaglandina (FELIN *et al.*, 2008).

### 3.3.12 Esquemas terapêuticos para tratamento das infecções por *H. pylori*

O esquema medicamentoso sugerido como primeiro escolha é o emprego de um Inibidor da bomba protônica (IBP)<sup>6</sup> em dose padrão (omeprazol 20 mg, pantoprazol 40 mg, lansoprazol 30 mg) + amoxicilina 1,0g<sup>7</sup> + claritromicina<sup>8</sup> 500mg, duas vezes ao dia, por sete dias. Como segundo escolha a utilização de IBP em dose padrão, uma vez ao dia + claritromicina 500mg, duas vezes ao dia + furazolidona 200mg duas vezes ao dia, por sete dias (COELHO *et al.*, 2005).

A furazolidona<sup>9</sup> é um antimicrobiano com um custo bem acessível, representando assim uma alternativa mais barata para erradicação do *H. pylori*. Além disso, representa uma alternativa aos pacientes que apresentem algum tipo de intolerância a amoxicilina. Porém, tem provocado um número maior de reações adversas nos pacientes que realizaram este tratamento (COELHO *et al.*, 2005).

A associação de tetraciclina, furazolidona e IBP, foi incluída como forma de oferecer opção terapêutica envolvendo antimicrobianos que hoje estão disponíveis para a população no Sistema Único de Saúde (SUS) (COELHO *et al.*, 2005).

Ford *et al.* (2007) realizaram um estudo em pacientes adultos com úlcera péptica e *H. pylori* positivos. Eles compararam a terapia de erradicação por uma semana, à terapia com outros medicamentos, com placebos e com não tratamento sobre a cicatrização da úlcera, a recorrência, o alívio dos sintomas e efeitos adversos. Para cicatrização de úlcera duodenal, a terapia de erradicação foi superior as demais medidas. Na cicatrização de úlcera gástrica, não houve diferenças significantes entre terapia de erradicação e outros fármacos. Na prevenção de recidivas de úlcera duodenal, não houve diferenças significantes entre erradicação e

---

<sup>6</sup> Inibidores da bomba protônica são drogas que inibem o último passo da secreção ácida gástrica. São inibidores reversíveis da enzima H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase existente na membrana das células parietais e responsável pelo conteúdo ácido da secreção gástrica (SILVA, 2006, p.564).

<sup>7</sup> É um antibiótico beta-lactâmico, inibidor da síntese de componentes da parede celular da bactéria e sua potência depende da capacidade de atingir receptores de parede e de resistir à ação de enzimas conhecidas como beta-lactamases, produzidas por germes resistentes (SILVA, 2006, p.965).

<sup>8</sup> Derivado macrolídico, inibidor da síntese proteica bacteriana pela ligação à subunidade 50s dos ribossomos de microorganismos sensíveis (SILVA, 2006, p.1000).

<sup>9</sup> Quimioterápico utilizado principalmente em infecções intestinais. Tem uso limitado por provocar muitos efeitos colaterais em elevada proporção de pacientes tratados (SILVA, 2006, p.1020).

terapia de manutenção com anti-secretores, mas a erradicação foi superior a não tratamento. Na prevenção de recorrência de úlcera gástrica, a terapia de erradicação foi superior a não tratamento.

A terapia com uma única droga antimicrobiana é habitualmente um insucesso, os esquemas antimicrobianos duplos, inicialmente testados em pediatria, tinham a duração mínima de quatro semanas e incluíam a associação de bismuto com amoxicilina (ou ampicilina) ou amoxicilina com tinidazol<sup>10</sup>. No meio hospitalar, onde há considerável percentual de cepas resistentes a imidazólicos, é provável que um esquema duplo que incluísse essas drogas, não proporcionasse boa eficácia (KIM *et al.*, 2003).

Kim *et al.* (2003) sugerem que a taxa de erradicação deste microrganismo é menor em pacientes com gastrite, comparando-se à pacientes com úlcera. Desse modo, os fatores de virulência poderiam influenciar na falência terapêutica.

### **3.3.13 Controle da erradicação**

O Consenso Brasileiro sobre *H. pylori* definiu que o controle da erradicação deverá ser verificado nos casos de úlcera duodenal, úlcera gástrica, linfoma MALT de baixo grau; sendo realizado por, no mínimo, oito semanas após o final da medicação anti-*H. pylori* (COELHO *et al.*, 2005).

### **3.3.14 Vacinação contra *H. pylori***

Há cerca de 10 anos, o desenvolvimento de vacina tem sido experimentado sem completo sucesso. Contemporaneamente, face à preocupação com a

---

<sup>10</sup> Derivado imidazólico de baixa toxicidade (Silva, 2006, p.1094).

resistência disseminada a macrolídeos<sup>11</sup>, comprometendo o tratamento, a vacina seria uma estratégia a considerar (MARSHALL & SCHOEP, 2007).

Trabalhos recentes têm se preocupado em traçar um mapa do genoma dessa bactéria, visando à produção de vacinas seletivas e de grande espectro em sua eficácia. Por outro lado, algumas cepas do *H. pylori* têm se mostrado resistentes aos tratamentos tradicionais tanto nos esquemas tríplexes quanto quádruplos, o que é de relevante importância para que se desenvolvam novas drogas eficazes contra essas cepas multiresistentes (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

### **3.4 Úlceras pépticas no homem**

Historicamente, a úlcera péptica estava focalizada em anormalidades na secreção ácida gástrica e de pepsina, e na supressão ácida como estratégia de tratamento (YUAN *et al.*, 2006).

Devido aos hábitos da sociedade moderna como o tabagismo, ingestão de álcool, utilização indiscriminada de drogas antiinflamatórias não-esteroidais sem orientação médica e, ainda, o estresse, ocorreu um aumento do número de casos desta doença (YUAN *et al.*, 2006).

As úlceras pépticas podem ser consideradas como uma doença multifatorial, pois fatores hereditários e ambientais produzem mesma lesão morfológica. A etiologia das úlceras gastroduodenais é influenciada por vários fatores agressivos e defensivos, como secreção ácido-péptica pelas células parietais, barreira mucosa, secreção de muco e íon bicarbonato, circulação sanguínea, regeneração celular e agentes protetores endógenos (prostaglandinas e fatores de crescimento epidérmico) (SALAS, 1990).

---

<sup>11</sup> Macrolídeos são antibióticos que agem inibindo a síntese proteica bacteriana, impedindo o crescimento da cadeia peptídica, ocasionando morte dos microorganismos sensíveis (SILVA, 2006, p. 996).

Mesmo sendo um fator necessário, a acidez gástrica raramente é suficiente para causar úlceras. A maioria das úlceras pépticas tem sido associada com a infecção gástrica pelo *H. pylori*, ou com a ingestão de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINE) (PETERSON, 1995).

A prevalência de úlceras não relacionadas com AINE, e não relacionadas com *H. pylori*, não é clara. Segundo Yuan *et al.* (2006) é difícil saber se a prevalência não teve um aumento, ou se não foi detectado o uso de AINE e/ou se diagnóstico de infecção por *H. pylori* não foi preciso.

O mecanismo de lesão difere entre úlceras gástricas e duodenais. A úlcera duodenal é essencialmente uma doença relacionada com *H. pylori* e é causada principalmente por um aumento na quantidade de ácido e pepsina. Já a úlcera gástrica, é mais comumente associada com a ingestão de AINE, embora a infecção por *H. pylori* possa estar presente (YUAN *et al.*, 2006).

Para Yuan *et al.* (2006) em todas as condições, as úlceras estão associadas com um desequilíbrio entre vários fatores protetores e agressores, sendo a inflamação a principal causa deste desequilíbrio.

### **3.5 Uso de Antiniflamatórios não esteroidais (AINE) e *H. pylori***

A presença de *H. pylori* e o uso de AINE (principalmente ácido acetilsalisílico – AAS) são considerados fatores de risco independentes para o desenvolvimento de lesões gastroduodenais que, quando associados, exibem sinergismo, ampliando significativamente, a probabilidade de ocorrência das mesmas, principalmente naqueles pacientes considerados de risco para o desenvolvimento de lesões do trato digestivo superior (COELHO *et al.*, 2005).

### 3.6 Adenocarcinoma gástrico

A progressão sucessiva de gastrite superficial crônica em gastrite atrófica, através de metaplasia e displasia intensiva, e finalmente a adenocarcinoma invasivo é longa. A progressão para o adenocarcinoma pode levar de 15 a 20 anos após o surgimento da gastrite superficial (SCHAECMTER *et al.*, 2002, pág. 201).

O risco de câncer gástrico também pode estar relacionado com as características de determinadas amostras de *H. pylori*. A infecção por uma amostra Cag A positiva tem sido associada à duplicação do risco de adenocarcinoma gástrico, possivelmente em consequência da resposta inflamatória elevada desencadeada após a infecção com uma amostra Cag A positiva (SCHAECMTER *et al.*, 2002, pág. 201).

Considerando que apenas 1% dos pacientes infectados por *H. pylori* no mundo, desenvolverão câncer gástrico, deduzir-se-ia, em uma primeira análise, se tratar de um percentual pequeno, mas se esta porcentagem for considerada em termos de números, é possível estimar que dezenas de milhões (aproximadamente 30 milhões) progredirão para câncer gástrico, e a maioria destes pacientes pertencem a população de países em desenvolvimento (SALIH, 2009).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Para a realização do presente trabalho, foram coletadas seis amostras aleatórias, sendo quatro amostras de *B. trimera* e duas de *B. articulata*. As amostras de *B. trimera* foram coletas nas cidades de Marques de Souza (região centro oriental do Rio Grande do Sul, 29°19'30.60"S 52°05'57.85"O, elevação 60 m), Mata (região centro ocidental do Rio Grande do Sul, 29°33'34.86"S 54°27'28.38"O, elevação 126 m), Santa Clara do Sul (região centro oriental do Rio Grande do Sul, 29°27'41.49"S 52°03'50.60"O, elevação 88 m) e Westfália (região centro oriental do Rio Grande do Sul, 29°23'31.65"S 51°42'28.30"O, elevação 562 m). As amostras de *B. articulata* foram coletadas nos municípios de Mata (RS) e Santa Clara do Sul (RS).

As amostras foram identificadas pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisete Maria de Freitas, e o material *voucher* foi encaminhados ao herbário do Centro Universitário UNIVATES.

Para preparação dos extratos foram utilizados caules, folhas e flores secas à sombra, em temperatura média de 30° C, no período de cinco dias. Esta secagem teve por finalidade retirar a água e, com isso, impedir reações de hidrólise e de crescimento bacteriano. O material foi seco a sombra, pois se exposto à radiação solar, poderiam ocorrer alterações na constituição química do material (SIMÕES *et al.*, 2001, p.166-167).

O material vegetal foi reduzido a fragmentos de pequenas dimensões com a utilização de tesouras.

A coleta do material vegetal foi direcionada pela indicação de pessoas que faziam uso desta planta, orientando a pesquisadora onde coletar as amostras. Segundo Panis (2008) a medicina popular serve como um referencial para a identificação de possíveis novos fármacos.

A coleta em diferentes locais foi realizada com o intuito de observar possíveis alterações na atividade antimicrobiana em função do ambiente, pois o ambiente pode influenciar na produção de substâncias antimicrobianas, como resposta às “agressões” por agentes patógenos e estresse ambiental.

O estudo pretendia coletar, em todos os municípios, uma amostra de cada espécie, porém na prática não foi possível, pois nos municípios de Marques de Souza e Westfália, só foram encontradas a espécie *B. trimera*. Na Tabela 2 estão relacionados os números das amostras, as espécies e o local de coleta.

As amostras de *B. trimera* e de *B. articulata*, foram todas coletadas em encostas de morros, no interior dos referidos municípios, longe de rodovias, no período da manhã, com a presença de sol, nos meses de junho a dezembro de 2008.

TABELA 2 - Identificação e procedência das amostras.

Nº da amostra	Espécies de <i>Baccharis</i>	Local de Coleta	Período da Coleta
1	<i>Baccharis trimera</i>	Mata/RS	Junho/2008
2	<i>Baccharis articulata</i>	Mata/RS	Junho/2008
3	<i>Baccharis trimera</i>	Marques de Souza/RS	Junho/2008
4	<i>Baccharis trimera</i>	Westfália/RS	Novembro/ 2008
5	<i>Baccharis trimera</i>	Santa Clara do Sul/RS	Dezembro/ 2008
6	<i>Baccharis articulata</i>	Santa Clara do Sul/RS	Dezembro/ 2008

## 4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para cada amostra coletada, foram obtidos extratos aquosos e etanólicos. Visando simplificar a identificação deste, foram atribuídas siglas para cada um destes extratos, os quais estão indicados na Tabela 3.

TABELA 3: Siglas atribuídas aos extratos aquosos e etanólicos.

Nº amostra	Espécies de <i>Baccharis</i>	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico
1	<i>Baccharis trimera</i>	EA1	EE1
2	<i>Baccharis articulata</i>	EA2	EE2
3	<i>Baccharis trimera</i>	EA3	EE3
4	<i>Baccharis trimera</i>	EA4	EE4
5	<i>Baccharis trimera</i>	EA5	EE5
6	<i>Baccharis articulata</i>	EA6	EE6

### 4.2.1 Extrato etanólico

Os extratos etanólicos foram obtidos por maceração estática (à frio) durante sete dias, utilizando álcool etílico (90%) como solvente. Após o período de extração, o solvente foi totalmente removido à vácuo em rotaevaporador, marca Fisaton, modelo 802 .

### 4.2.2 Extrato aquoso

Os extratos aquosos foram obtidos por infusão, utilizando diluição 1:10, com água destilada aquecida a 90 °C, repousando por 30 minutos. Após o material foi filtrado, e o líquido foi removido à vácuo em rotaevaporador.

### 4.2.3 Rendimentos dos Extratos

Após o término da rotaevaporação de todos os extratos, foram calculados os seus rendimentos, e armazenados no congelador em frasco âmbar, hermeticamente fechado.

## 4.3 SCREENING DOS EXTRATOS

Primeiramente foram definidas quais as substâncias que seriam investigadas no *screening*, a escolha foi baseada, naquelas mais comumente encontradas nas espécies analisadas.

### 4.3.1 Taninos

(Técnica adaptada de ALICE *et al.*, 1985, p.16; SIMÕES *et al.*, 2003, p.173).

Método: Em um béquer foram diluídos 0,1 g dos extratos etanólicos ou aquosos, em 20 mL de água deionizada. Após diluição, o conteúdo foi dividido em três tubos de ensaio (tubos A, B e C).

TUBO A:

Técnica de detecção: técnica baseada na propriedade dos taninos de precipitar gelatina. Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de gelatina a 1%. Aos tubos denominados A, já contendo os extratos, foram adicionados um mL da solução aquosa de gelatina. Na presença de taninos houve a formação de turvação ou precipitado.

TUBO B:

Técnica de caracterização: Esta é uma reação geral para substâncias fenólicas, onde a complexação de hidroxilas com o íon  $Fe^{++}$  levando ao desenvolvimento de substâncias de coloração azulada ou esverdeada, conforme a estrutura da molécula. Primeiramente, foi preparada uma solução aquosa de  $FeCl_3$  a 1%, após foram adicionadas três gotas desta solução de cloreto de ferro (III), aos tubos denominados B, contendo os extratos. Na presença de taninos hidrolisáveis ou

gálicos, ocorreu o desenvolvimento de coloração azulada, e na presença de taninos condensados a coloração verde.

TUBO C: Branco, ou seja, tubos contendo apenas as soluções dos extratos.

#### 4.3.2 Cumarinas

(Técnica adaptada de ALICE *et al.*, 1985, p.16; SIMÕES *et al.*, 2003, p.173).

Como muitas cumarinas são voláteis (arrastadas por vapor de água), foi empregada a técnica de sublimação.

Método: Em um béquer foram diluídos 0,1 g dos extratos etanólicos ou aquosos em 20 mL de água deionizada. Após, foi transferido 10 mL deste conteúdo para tubos de ensaio, identificados para cada extrato. Na sequência, foi preparada uma solução de KOH 5% (m/v) em metanol. Esta solução foi usada para impregnar doze pedaços de papéis filtros, correspondente ao número de extratos. Depois de secos, estes papéis foram colocados sobre os tubos, contendo os extratos, e foram presos com o auxílio de liguetas, e levados ao banho-maria (100°C) por 10 minutos. Decorrido esse tempo, foram retiradas as liguetas, e os papéis foram expostos à radiação UV (365nm). Na presença de cumarinas voláteis houve o desenvolvimento de fluorescência amarela e azul, conforme a estrutura da cumarina detectada.

#### 4.3.3 Saponinas

(Técnica adaptada de BIAVATTI & LEITE, 2005, p.51; ALICE *et al.*, 1985, p.17).

Esta análise foi baseada na propriedade das saponinas de formar espuma após agitação energética.

Método: Inicialmente foram selecionados tubos de ensaio de mesmo comprimento e diâmetros, com tampa. Em um béquer foram diluídos 0,1 g dos extratos etanólicos ou aquosos em 20mL de água deionizada. Seguindo, 10 mL desta solução dos extratos, foram transferidas para os tubos de ensaio. Estes foram submetidos à agitação energética durante 15 segundos com movimentos succionais. Foi medida a altura da coluna de espuma formada, com auxílio de uma régua. Decorridos 15

minutos, as alturas das colunas foram medidas novamente. O desenvolvimento de espuma com altura maior ou igual a um cm é considerado positivo para saponinas.

#### 4.3.4 Flavonóides

Método: Foram diluídos 0,2 g dos extratos etanólicos ou aquosos em 50 mL de água deionizada. Após, em funil de separação, foi realizada a extração com n-butanol (10 mL – duas vezes). A fração butanólica foi evaporada à secura, em cápsula de porcelana, no banho-maria. Foi retomada em metanol (10mL) e foram reservados cerca de 2 mL de cada extrato, para a análise por cromatografia em camada delgada (CCD). O restante foi transferido para dois tubos ensaios.

TUBO A: Reação da Cianidina

TUBO B: Branco

Reação da Cianidina: (Técnica adaptada ALICE *et al.*,1985, p.16; SIMÕES *et al.*, 2003, p.519).

Nesta técnica, os derivados flavônicos, de cor amarela, foram reduzidos a antocianidinas, de coloração vermelha (flavonóis), laranja (flavonas) e/ou violeta (flavanonas). Porém, está técnica possui uma limitação: as chalconas, auronas e isoflavonas não desenvolvem coloração. Mas, algumas chalconas em meio ácido podem produzir flavanonas.

Técnica: Foi adicionado aos tubos de ensaio, contendo os extratos etanólicos e aquosos, cuidadosamente, 0,5 mL de HCl concentrado e 0,1 g de MgO, e então foi observada a coloração formada.

Análise Cromatográfica: (Técnica adaptada SIMÕES *et al.*,2003, p.520).

Foram aplicados os extratos etanólicos e aquosos em placas de gel de sílica GF254 (Fase fixa). Como fase móvel: acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água (100:11:11:27), e como revelador: cloreto de alumínio a 5% em metanol seguido de aquecimento. A rutina foi empregada como substância de referência. Por fim, as placas de CCD, foram observadas em UV- 365 nm.

#### 4.3.5 Alcalóides

(Técnica adaptada de BIAVATTI & LEITE, 2005, p.51; ALICE *et al.*, 1985, p.14; SIMÕES *et al.*, 2003, p.174).

Método: Foram diluídos 0,1 g dos extratos etanólicos ou aquosos em 20 mL de metanol. Após, esta solução de cada extrato, foi dividida igualmente em três tubos de ensaios. Na seqüência, foram adicionados 5 mL de HCl 10 % a todos os tubos de ensaio. Estes foram aquecidos por 10 minutos em banho-maria, e finalmente foram adicionados os reativos de Dragendorff, Mayer e Wagner.

Tubo 1: Foram adicionadas algumas gotas do Reativo de Dragendorff (iodo – bismuto de potássio). A formação de uma leve turbidez ou precipitado roxo a laranja evidenciou a possível presença de alcalóides.

Tubo 2: Foram adicionadas algumas gotas do Reativo de Mayer (iodo – mercurato de potássio). A formação de uma leve turbidez ou precipitado branco a creme evidenciou a possível presença de alcalóides.

Tubo 3: Foram adicionadas algumas gotas do Reativo de Wagner (iodo-iodeto de potássio). A formação de uma leve turbidez ou precipitado marron evidenciou a possível presença de alcalóides.

Todos os experimentos realizados durante o *screening* fitoquímico foram realizados em triplicata.

#### **4.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro***

Os bioensaios foram realizados com cepa padrão de *H. pylori* - ATCC 43504 (“American Type Culture Collection”), cedida pela Fundação Oswaldo Cruz. Inicialmente foi realizada a ressuspensão do microorganismo em Caldo Soja

Tryptona (TSB)<sup>12</sup>, e após sua semeadura em Agar Soja Tryptona (TSA)<sup>13</sup>, acrescido de 5 % de sangue de carneiro desfibrinado estéril. Como o *H. pylori* necessita um ambiente de microaerofilia, foram utilizadas jarras de acrílico e geradores de microaerofilia (Microaerobac). As placas foram incubadas por 72 horas, à 35,9° C (CLSI M100-S19).

Foram realizadas duas subculturas, e então, foram iniciadas as determinações das atividades antimicrobianas dos extratos através do Método de Microdiluição em Caldo<sup>14</sup>. Foi utilizado caldo Mueller-Hinton para a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de todos os extratos. Já para a determinação das Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM), foi utilizado ágar Mueller-Hinton acrescido de 5 % de sangue de carneiro estéril.

Antes de iniciar a diluição dos extratos, foi realizado um teste controle, buscando verificar se o Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração 0,8 % não apresentaria atividade antimicrobiana sobre o *H. pylori*. Para isto, foram impregnados três discos estéreis, de 6 mm de diâmetro, com esta solução 0,8% de DMSO. Estes discos foram aplicados em placas contendo meio Mueller-Hinton, acrescido de 5 % de sangue de carneiro desfibrinado estéril, já previamente inoculado com o microorganismo. Foi verificado, após 72 horas de incubação, que nesta concentração o DMSO não inibia o crescimento bacteriano.

#### **4.4.1 Diluição dos extratos**

Foram pesados 0,1 g de cada extrato, e foram adicionados 8 mL de água deionizada estéril, e 0,8 mL de DMSO. Esta solução foi deixada trinta minutos em banho de ultrassom, com o objetivo de melhorar a solubilidade dos extratos. Após, estas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, e com auxílio

---

<sup>12</sup> É um meio de cultura utilizado para o crescimento de bactérias em geral (OPLUSTIL *et al.*, 2004, p.285).

<sup>13</sup> É um meio de cultura utilizado para manutenção de cepas bacterianas, e para as mais exigentes acrescenta-se ao meio 5 % de sangue desfibrinado estéril de carneiro (OPLUSTIL *et al.*, 2004, p.284).

<sup>14</sup> Este método é denominado “microdiluição”, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo, colocados em placas de plástico estéreis, que possuem poços de fundo redondo ou cônico (CLSI, M7-A6, p.16).

de pipeta de Pasteur, foram completados seus volumes com água deionizada estéril. Desta forma, foi obtida uma solução estoque dos extratos contendo 10.000 µg/mL, com DMSO (dimetilsufóxido) a 0,8%.

#### **4.4.2 Fármaco antimicrobiano padrão**

Foi empregado como fármaco padrão, o antimicrobiano Claritromicina (Lote: 06091855B, Pharma Nostra). Este é o antimicrobiano adotado como referência no tratamento deste microorganismo (Coelho, 2005; CLSI M100-S19). Todavia, como a Claritromicina é insolúvel em água, sendo solúvel apenas em acetona, foram realizadas várias tentativas de solubilização da mesma sem sucesso.

Então, diante das dificuldades, optou-se por fazer uma suspensão com o mesmo diluente dos extratos, tendo em vista, que este já havia sido testado e não apresentou interferência no crescimento bacteriano.

#### **4.4.3 Determinação da concentração do fármaco padrão em cromatografia líquida de alta eficiência**

A suspensão de claritromicina obtida foi encaminhada a Central Analítica do UNIANÁLISES, do Centro Universitário UNIVATES, onde foi realizada a dosagem apenas da parte solúvel desta suspensão, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), seguindo técnica descrita na Farmacopéia Brasileira (2004).

#### **4.4.4 Controle do diluente**

Foi preparada uma solução para controle do diluente. Em um balão volumétrico de 10 mL, foi adicionado 0,8 mL de DMSO e completado o volume com água deionizada estéril.

Nas Figuras 6 e 7 estão os balões contendo os extratos etanólicos e aquosos, respectivamente. Notem-se as diferenças de coloração apresentados pelos extratos.



FIGURA 6 - Diluições dos extratos etanólicos.<sup>15</sup>



FIGURA 7 - Diluições dos extratos aquosos.<sup>15</sup>

#### **4.4.5 Padronização do Inóculo**

Para a padronização do inóculo, foram tocadas de 4 a 5 colônias, e inoculadas em solução salina estéril 0,8%. Após, o inóculo foi padronizado segundo a Escala 2 de Mac Farland (CLSI M100-S19, p.91).

---

<sup>15</sup> Algumas diferenças na altura dos extratos nos balões se devem a diferenças no formato dos balões. Todos tiveram seus volumes ajustados, corretamente, com auxílio de pipeta de Pasteur.

#### **4.4.6 Controle do microorganismo**

O controle do microorganismo foi realizado através do teste rápido da urease, onde eram emulsionadas algumas colônias da cultura de *H. pylori*, em tubo de ensaio contendo caldo de uréia. A mudança de cor da solução para rosa indicava presença de microorganismo produtor de urease, no caso *H. pylori* (OPLUSTIL *et al.*, 2004, p.166). Ainda, a cada repique, era observada a morfologia e coloração das colônias.

#### **4.4.7 Concentração Inibitória Mínima - CIM**

Inicialmente, todo o material utilizado no experimento, foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Foram utilizadas cinco placas de acrílico com 96 poços. Na placa denominada A, foram aplicados os extratos etanólicos EE1, EE2, EE3, e o antimicrobiano (claritromicina), todos em triplicata. Na placa denominada B, foram aplicados os extratos etanólicos EE4, EE5, EE6 e o antimicrobiano, também em triplicata. Na placa denominada C, foram aplicados o controle do diluente (DMSO 0,8%) e o antimicrobiano, também em triplicata.

Placas idênticas as dos extratos etanólicos foram confeccionadas para os extratos aquosos. Na placa denominada D foram aplicados os extratos aquosos EA1, EA2, EA3 e o antimicrobiano (claritromicina), todos em triplicata. Na placa denominada E, foram aplicados os extratos etanólicos EA4, EA5, EA6 e o antimicrobiano, também em triplicata.

Em todas as placas foram feitos controles negativos (meio sem adição de inóculo) e controles positivos (meio com adição de inóculo). As aplicações dos extratos nas placas seguiram a seguinte ordem:

- PLACA A: foram aplicados o EE1 (*Baccharis trimera* – extrato etanólico), EE2 (*Baccharis articulata* - extrato etanólico), EE3 (*Baccharis trimera* – extrato etanólico), o antimicrobiano padrão (claritromicina), o controle positivo (meio adicionado de inóculo), e o controle negativo (meio sem inóculo).

- PLACA B: foram aplicados o EE4 (*Baccharis trimera* – extrato etanólico), EE5 (*Baccharis trimera* - extrato etanólico), EE6 (*Baccharis articulata* – extrato etanólico), o antimicrobiano padrão (claritromicina), o controle positivo (meio adicionado de inóculo), e o controle negativo (meio sem inóculo).

- PLACA C: foram aplicados o DMSO 0,8 %, o antimicrobiano padrão (claritromicina), o controle positivo (meio adicionado de inóculo), e o controle negativo (meio sem inóculo).

- PLACA D: foram aplicados o EA1 (*Baccharis trimera* – extrato aquoso), EA2 (*Baccharis articulata* - extrato aquoso), EA3 (*Baccharis trimera* – extrato aquoso), o antimicrobiano padrão (claritromicina), o controle positivo (meio adicionado de inóculo), e o controle negativo (meio sem inóculo).

- PLACA E: foram aplicados o EA4 (*Baccharis trimera* – extrato aquoso), EA5 (*Baccharis trimera* - extrato aquoso), EA6 (*Baccharis articulata* – extrato aquoso), o antimicrobiano padrão (claritromicina), o controle positivo (meio adicionado de inóculo), e o controle negativo (meio sem inóculo).

Na Figura 8 estão demonstradas a aplicação em triplicata do EE1, EE2, EE3, do antimicrobiano padrão, do controle positivo (meio adicionado de inóculo) e do controle negativo (meio sem adição de inóculo).

	EE1			EE2			EE3			Claritromicina			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Meio + inóculo
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Meio sem inóculo

FIGURA 8 - PLACA A - Demonstração da aplicação em triplicata do EE1, EE2, EE3, do antimicrobiano (claritromicina), do controle positivo (meio + inóculo), e do controle negativo (meio sem inóculo).

A microdiluição em caldo foi realizada em capela de fluxo laminar. Inicialmente foram transferidas alíquotas de 200  $\mu$ L de inóculo padronizado a tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Mueller-Hinton (200  $\mu$ L em cada), deixando alguns tubos sem inóculo (controle negativo).

Para cada um dos doze poços da linha A até a linha F, foram adicionados 100  $\mu$ L de meio acrescido de inóculo. Na linha G, foram inoculados a cada poço 100  $\mu$ L de meio acrescido de inóculo. Na linha H, o meio sem o inóculo (controle do meio).

Inicialmente, foi realizada uma diluição das soluções estoque dos extratos, em tubos de ensaio, onde foram adicionados 100  $\mu$ L de cada solução estoque dos extratos a 100  $\mu$ L de meio, resultando desta forma uma solução com concentração de 5000  $\mu$ g/mL. Desta solução de cada extrato, foram retirados 100  $\mu$ L e acrescentados aos três primeiros poços das placas – 1ª linha (triplicata), repetindo o mesmo procedimento com todos os extratos. Da mesma forma forão aplicados 100  $\mu$ L do antimicrobiano claritromicina e do DMSO (controle do solvente).

Após, foram realizadas as diluições. Cada amostra foi homogeneizada, e desta foi transferido 100  $\mu$ L para o seu próximo poço, Este procedimento foi repetido para todos os extratos, para claritromicina e para o DMSO, todos em triplicata.

Terminadas as diluições, as placas foram colocadas dentro das jarras, e foi introduzido um gerador de microaerofilia (um gerador para cada jarra). Estas foram incubadas a 35,9 °C por 72h.

Na Figura 9 à direita, está a jarra de acrílico sobre suporte de isopor. Este suporte foi adaptado para possibilitar a incubação das placas com 96 poços, pois estas possuíam diâmetro maior que o da jarra. À esquerda, jarra contendo placas de àgar sangue semeadas com *H. pylori*; detalhe para o gerador de microaerofilia sobre as placas.

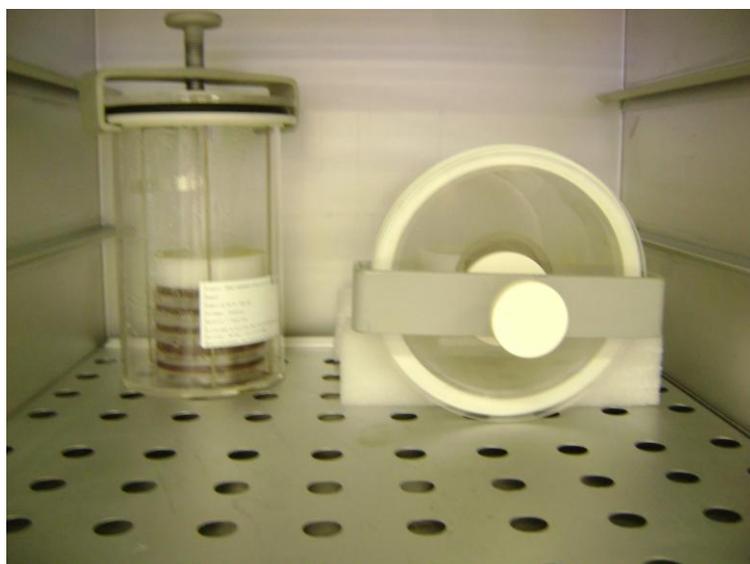


FIGURA 9 - Jarras de acrílico dentro da estufa.

As concentrações finais, após as diluições para cada extrato foram: 1º poço: 2500 µg/mL, 2º poço: 1250 µg/mL, 3º poço: 625 µg/mL, 4º poço: 312,5 µg/mL, 5º poço: 156,25 µg/mL.

Decorrido o tempo de incubação, foram realizadas as leituras das placas. A ausência de crescimento bacteriano foi representada pela presença de poços límpidos e o crescimento foi representado por poços turvos. O primeiro poço onde não se observou crescimento (de menor valor) corresponde ao valor da Concentração Inibitória Mínima.

#### **4.4.8 Confirmação da Concentração Inibitória Mínima**

Como os extratos possuem coloração, a confirmação de crescimento nos poços foi realizada por meio da aplicação de 10 µL de solução de Cloreto de Trifeniltetrazólio 0,5% (TTC). Esta solução revela o crescimento bacteriano por meio do desenvolvimento da coloração vermelha, pois forma um complexo vermelho com a enzima da respiração celular dos organismos vivos, assim nos poços onde havia crescimento bacteriano, houve o desenvolvimento desta coloração.

#### **4.4.9 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima dos extratos foram realizadas sementeiras em placas impregnadas com ágar Mueller-Hinton acrescidas de 5% de sangue de carneiro estéril, de todos os poços onde o extrato estava límpido, para que se pudesse afirmar a exata ação do extrato. Essas placas foram incubadas a 35,9 °C por 72 horas em microaerofilia.

### **4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As comparações de dados paramétricos foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Turkey.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS

Os rendimentos dos extratos aquosos e etanólicos foram calculados após o término da rotaevaporação e estão relacionados na Tabela 4.

TABELA 4 - Rendimentos dos extratos etanólicos e aquosos das seis espécies de *Baccharis*.

Nº da amostra	Rendimento dos Extratos aquosos (%)	Rendimento dos extratos etanólicos (%)
1	6,2	7,11
2	9,94	11,28
3	10,28	15,64
4	9,95	6,29
5	3,15	6,81
6	8,10	11,81

Analisando a Figura 10, é possível observar que os rendimentos dos extratos etanólicos apresentam valores superiores aos aquosos, com exceção do extrato número 4 (EE4) que apresentou um rendimento inferior ao seu extrato aquoso correspondente.

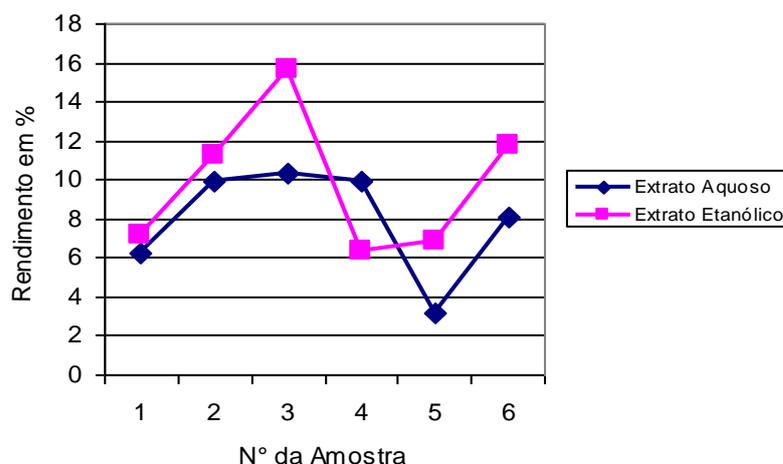


FIGURA 10 - Rendimento dos extratos aquosos e etanólicos após rotaevaporação.

## 5.2 SCREENING FITOQUÍMICO

Com a realização do *screening* fitoquímico foi possível observar, qualitativamente, a presença de várias substâncias nos extratos analisados.

### 5.2.1 Presença de Alcalóides

Analisando os resultados, percebe-se que na presença do Reagente de Dragendorff a maioria dos extratos apresentou reação positiva, ou seja, a formação de um precipitado laranja, indicando assim a possível presença de alcalóides. Apenas nas amostras 1 e 2, tanto os extratos etanólicos como aquosos (EE1, EE2, EA1 e EA2) não apresentaram precipitação, logo se supõem, que não apresentem alcalóides.

Com o Reativo de Mayer, houve a formação de precipitado creme (reação positiva) apenas com os extratos aquosos EA5 e EA6, supondo-se assim, que somente estes apresentavam presença de alcalóides. Porém, apenas o extrato etanólico EE1 não apresentou formação de um precipitado creme, todos os demais formaram precipitados, indicando presença de alcalóides nestes.

Por fim, com o Reativo de Wagner, a maioria dos extratos etanólicos e aquosos apresentaram formação de um precipitado violáceo (reação positiva). Apenas os extratos EA1, EA2 e EE1 não formaram precipitados, indicando ausência de alcalóides nestes extratos.

Diante disto, foi possível constatar a presença de alcalóides na maioria dos extratos testados exceto os extratos EA1, EE1 e EA2, que apresentaram reação negativa com todos os reagentes.

Na Tabela 5, estão os resultados obtidos tanto para os extratos etanólicos e aquosos em relação à presença de alcalóides.

TABELA 5 - Resultados obtidos no *screening* dos extratos para Alcalóides.

Extrato nº	Alcalóides		
	Dragendorff	Mayer	Wagner
EA1	-	-	-
EA2	-	-	-
EA3	+	-	+
EA4	+	-	+
EA5	+	+	+
EA6	+	+	+
EE1	-	-	-
EE2	-	+	+
EE3	+	+	+
EE4	+	+	+
EE5	+	+	+
EE6	+	+	+

### 5.2.2 Presença de Cumarinas

Segundo a técnica utilizada para detecção de cumarinas, o aparecimento de fluorescência amarela, após exposição à radiação UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ), indica a presença destes compostos. Na Tabela 6, estão os resultados obtidos tanto para os extratos etanólicos e aquosos em relação a estes compostos.

Analisando os resultados encontrados (Tabela 6), ficou evidente que a maioria dos extratos apresentou fluorescência amarela, após exposição à radiação UV (365 nm), indicando, desta forma, a presença de cumarinas. Apenas os extratos EA1, EA3, EA4 e EE4 não apresentaram fluorescência.

Ainda, há nítida predominância de fluorescência nos extratos etanólicos, concluindo-se assim, que a presença de cumarinas foi superior nos extratos etanólicos em relação aos aquosos.

TABELA 6 - Resultados obtidos no *screening* dos extratos para Cumarinas.

Extrato	Cumarinas (fluorescência amarela/ UV)
EA1	-
EA2	+
EA3	-
EA4	-
EA5	+
EA6	+
EE1	+
EE2	+
EE3	+
EE4	-
EE5	+
EE6	+

### **5.2.3 Presença de Saponinas**

Para identificar a presença de saponinas nos extratos, foi empregada a técnica do índice de espuma, baseada na capacidade destes compostos, de formar espuma, após agitação rigorosa, e a persistência desta, decorridos quinze minutos. Colunas com altura superior a um cm indicaram a presença de saponinas.

Analisando as alturas das colunas de espuma formadas inicialmente, e após 15 minutos, foi possível notar a presença de saponinas na maioria dos extratos, tanto etanólicos quanto aquosos. Ainda, apenas o EA3 não apresentou formação de espuma satisfatória, supondo-se, desta forma, a ausência de saponinas neste extrato.

O EA1, após quinze minutos, não apresentou uma coluna de espuma compatível com a presença de saponinas, concluindo-se assim, ausência destas neste extrato.

Na Tabela 7 estão descritos os tamanhos das colunas de espuma formadas, e a persistência desta coluna após quinze minutos para os extratos aquosos e etanólicos.

TABELA 7 - Resultados obtidos no *screening* dos extratos para Saponinas.

Extrato nº	Saponinas	
	(cm de altura da coluna de espuma)	
	0 min	Após 15 min
EA1	+ (1,5)	- (0,6)
EA2	+ (1,8)	+ (1,2)
EA3	- (0,5)	- (0,0)
EA4	+ (2,4)	+ (1,8)
EA5	+ (5,0)	+ (2,7)
EA6	+ (4,1)	+ (1,3)
EE1	+ (7,2)	+ (7,0)
EE2	+ (6,5)	+ (5,7)
EE3	+ (4,5)	+ (3,2)
EE4	+ (4,3)	+ (3,0)
EE5	+ (5,8)	+ (4,7)
EE6	+ (5,3)	+ (5,0)

Ao compararmos as Figuras 12 e 13, é nítida a diferença do tamanho das colunas de espuma formadas pelos extratos etanólicos, em relação as colunas formadas pelos extratos aquosos, tanto em 0, como em 15 minutos, em todas as amostras analisadas.

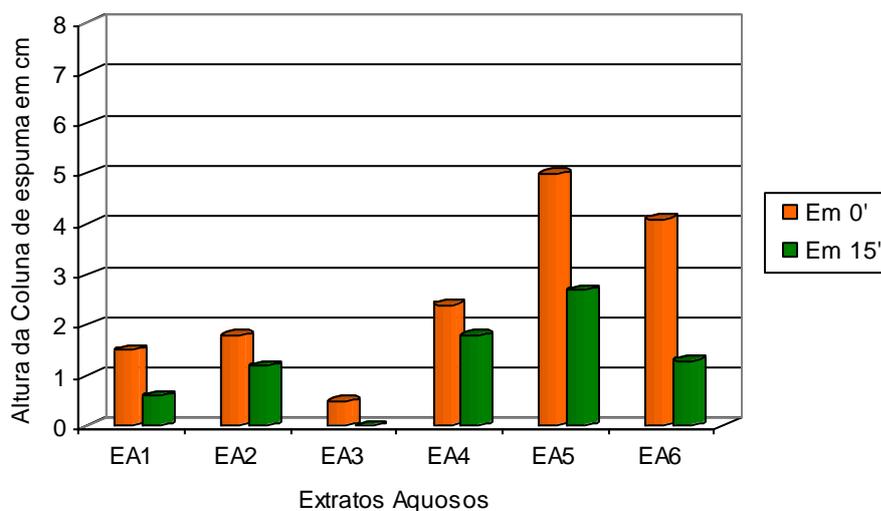


FIGURA 11 - Altura da coluna de espuma (em cm) formada pelos extratos aquosos.

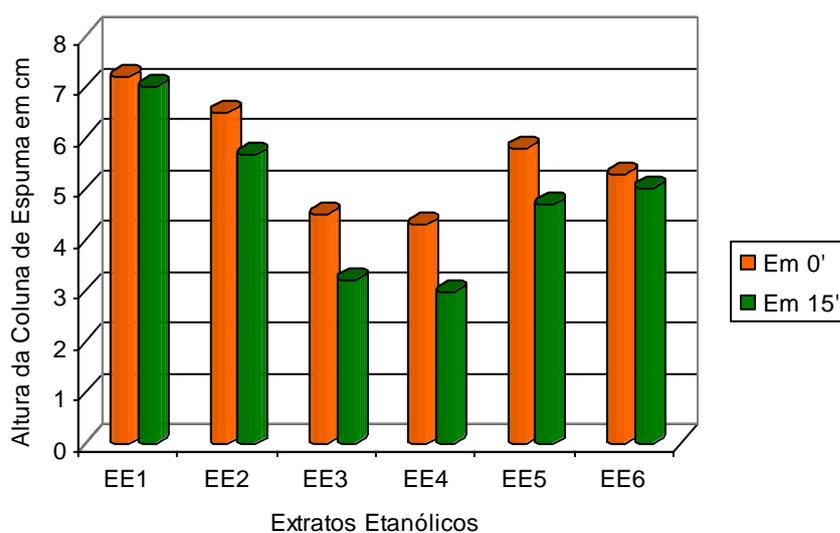


FIGURA 12 - Altura da coluna de espuma (em cm) formada pelos extratos etanólicos.

#### 5.2.4 Presença de Flavonóides

Para detecção de flavonóides nos extratos etanólicos e aquosos, foi empregada a reação de cianidina, que consistiu na adição de HCl concentrado e o óxido de magnésio aos extratos, desenvolvendo coloração violácea na presença de

flavanonas. Para confirmação dos resultados foi ainda realizada cromatografia em camada delgada, onde a presença de derivados flavônicos foi representada pelo desenvolvimento de coloração amarela fluorescente.

Avaliando os resultados da reação de cianidina, foi possível perceber que a maioria dos extratos apresentou o desenvolvimento de coloração violácea, indicando a presença de flavanonas. Porém, os extratos EA1 e EA3 não desenvolveram coloração após a adição de HCl concentrado e MgO.

Com a realização da CCD foi possível verificar a presença de manchas de coloração amarela em todos os extratos, quando expostos a radiação UV, sugerindo a presença de flavonóides em todos os extratos (Figura 13).

Como os extratos EA1 e EA3 não haviam apresentado coloração na reação da cianidina, mas apresentaram fluorescência na CCD, pressupõem-se a presença nestes extratos de chalconas, auronas ou isoflavonas, que possuem como característica não desenvolver coloração nesta reação.

Na Tabela 8 estão os resultados obtidos com a realização das duas técnicas para a detecção da presença de flavonóides nos extratos etanólicos e aquosos.

TABELA 8 - Resultados encontrados no *screening* dos extratos para Flavonóides.

Extrato nº	Flavonóides	
	Reação da Cianidina	CCD
EA1	-	+
EA2	Violeta	+
EA3	-	+
EA4	Violeta	+
EA5	Violeta	+
EA6	Violeta	+
EE1	Violeta	+
EE2	Violeta	+
EE3	Violeta	+
EE4	Violeta	+
EE5	Violeta	+
EE6	Violeta	+

Analisando a Figura 14, é possível visualizar a fluorescência apresentada pela maioria dos extratos. Todavia chama a atenção a amostra 1 na placa A, que corresponde ao EA1, onde ficou difícil visualizar a fluorescência, já que se apresentou de forma discreta quando exposta a radiação UV.

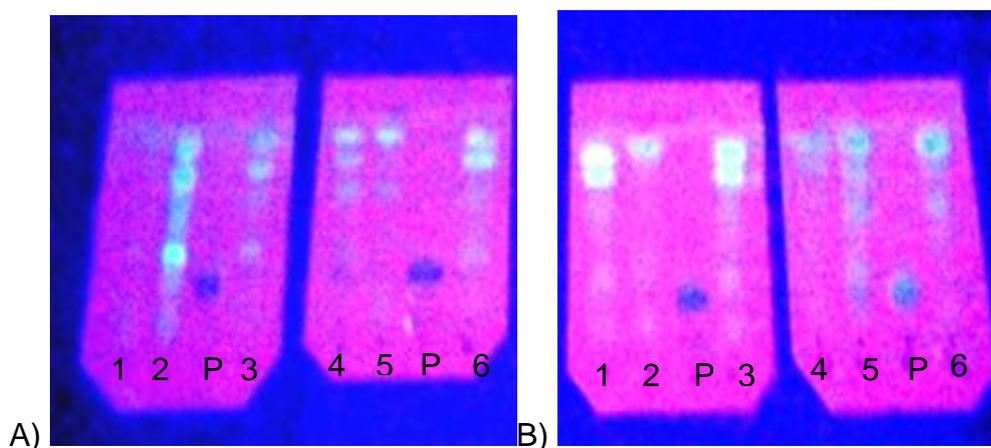


FIGURA 13 - A) Cromatografia em Camada Delgada para identificação da presença de Flavonóides nos seis extratos aquosos e o padrão (P). B) Cromatografia em Camada Delgada para identificação da presença de Flavonóides nos seis extratos etanólicos e o padrão (P).

Diante disto, e do fato desta amostra (EA1) não ter desenvolvido coloração na reação da cianidina, foi possível concluir que esta amostra possuía pequena quantidade de flavonóides, ao contrário das demais. Porém, como não foram realizados testes quantitativos, não é possível estimar esta diferença.

### **5.2.5 Presença de Taninos**

Para detectar a presença de taninos nos extratos, foi empregada a técnica de precipitação após adição de solução aquosa de gelatina, técnica baseada na capacidade destes compostos de precipitar proteínas. Ainda, para confirmação dos resultados foi realizada reação de caracterização com sais de ferro, que é uma reação geral para substâncias fenólicas, onde o desenvolvimento de cor azulada indica a presença de taninos hidrolisáveis ou gálicos, e a cor verde indica a presença de taninos condensados.

As amostras EA1, EA2, EA4, EA6, EE1, EE2, EE5 e EE6 apresentaram a formação de precipitado (grânulos) quando em contato com a solução aquosa de gelatina 1%. Isto sugere que estas amostras contêm taninos, pois como citado anteriormente, eles possuem a propriedade de precipitar proteínas, no caso as proteínas (ou os aminoácidos) da gelatina.

As demais amostras apresentaram apenas a formação de leve turvação, sugerindo a possível presença de taninos, porém menos visível que os demais.

Já, com a realização da técnica de caracterização com sais de ferro, foi verificada a presença de taninos em todos os extratos. Apenas os extratos EA2 e EE1 apresentaram o desenvolvimento de coloração azul, indicando assim, a presença de taninos hidrolisáveis. Os demais desenvolveram coloração verde, indicando presença de taninos condensados.

Na Tabela 9 estão os resultados encontrados, com a realização duas técnicas realizadas para a detecção de taninos.

TABELA 9 - Resultado do *screening* dos e extratos para taninos.

Extrato nº	Taninos	
	Formação de Precipitado com gelatina	Caracterização com sais de ferro
EA1	Precipitado	Verde
EA2	Precipitado	Azul
EA3	Leve turvação	Verde
EA4	Precipitado	Verde
EA5	Leve turvação	Verde
EA6	Precipitado	Verde
EE1	Precipitado	Azul
EE2	Precipitado	Verde
EE3	Leve turvação	Verde
EE4	Leve turvação	Verde
EE5	Precipitado	Verde
EE6	Precipitado	Verde

### 5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e aquosos foram determinadas através de microdiluição em caldo, possibilitando a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), promovida por extratos etanólicos e aquosos de *B. trimera* e *B. articulata*.

Diante disto, mesmo que *in vitro* se obtenha ótimos níveis de inibição antimicrobiana com estes compostos testados, é necessária a realização de estudos *in vivo* para que se possam estimar exatamente os níveis eficazes em organismos vivos.

### 5.3.1 Concentração de Claritromicina solúvel, dosada em CLAE

A determinação da concentração de claritromicina solúvel, na amostra empregada como padrão, foi obtida calculando-se a área do gráfico, obtido após a injeção desta amostra no equipamento.

Segundo dados obtidos pela Central Analítica do UNIANÁLISES, a concentração de claritromicina solúvel na suspensão empregada como padrão nas análises microbiológicas foi de 46,91 µg/mL.

### 5.3.2 Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos etanólicos

Com a determinação das CIMs, para os extratos etanólicos, pode-se obter a concentração exata destes extratos, capazes de inibir o crescimento bacteriano, representado pela presença de poços límpidos nas placas.

Todos os extratos etanólicos, tanto de *B. trimera* como de *B. articulata*, apresentaram capacidade de inibir o crescimento do microorganismo *H. pylori*. Na Tabela 10 estão demonstrados os valores das CIMs em µg/mL, obtidos para cada um dos extratos etanólicos.

TABELA 10 - Concentrações de CIM (µg/mL) encontradas para os extratos etanólicos.

Nº amostra	Espécie	Local	CIM (µg/mL)
EE1	<i>B. trimera</i>	Mata/RS	312,5
EE2	<i>B. articulata</i>	Mata/RS	625
EE3	<i>B. trimera</i>	Marques de Souza/RS	312,5
EE4	<i>B. trimera</i>	Westfália/RS	156,25
EE5	<i>B. trimera</i>	Santa Clara do Sul/RS	312,5
EE6	<i>B. articulata</i>	Santa Clara do Sul/RS	625

### 5.3.3 Resultados da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os extratos etanólicos

Para a obtenção da concentração exata do extrato que ocasiona morte do microorganismo (CBM), foi necessário semear alíquotas das diluições dos extratos, que produziram poços límpidos (sem crescimento) após o período de incubação em placas contendo agar Mueller-Hinton, acrescido de 5% de sangue de carneiro defibrinado estéril. Foi verificada a ausência de crescimento bacteriano, nestas placas, logo nestas concentrações os extratos foram capazes de ocasionar morte do microorganismo *H. pylori*. Na Tabela 11, estão relacionados os valores da CBMs em µg/mL para os seis extratos etanólicos.

TABELA 11- Valores da CBMs (µg/mL) obtidas a partir dos extratos etanólicos.

Nº amostra	Espécie	Local	CBM (µg/mL)
EE1	<i>B. trimera</i>	Mata/RS	312,5
EE2	<i>B. articulata</i>	Mata/RS	625
EE3	<i>B. trimera</i>	Marques de Souza/RS	312,5
EE4	<i>B. trimera</i>	Westfália/RS	312,5
EE5	<i>B. trimera</i>	Santa Clara do Sul/RS	312,5
EE6	<i>B. articulata</i>	Santa Clara do Sul/RS	625

Diante dos resultados encontrados, conclui-se que todos os extratos etanólicos apresentaram a capacidade de causar a morte do *H. pylori*. Fato demonstrado através dos valores obtidos na determinação da CBM. Apenas o extrato EE4 apresentou diferença no valor da CBM em comparação com a CIM (Figura 14).

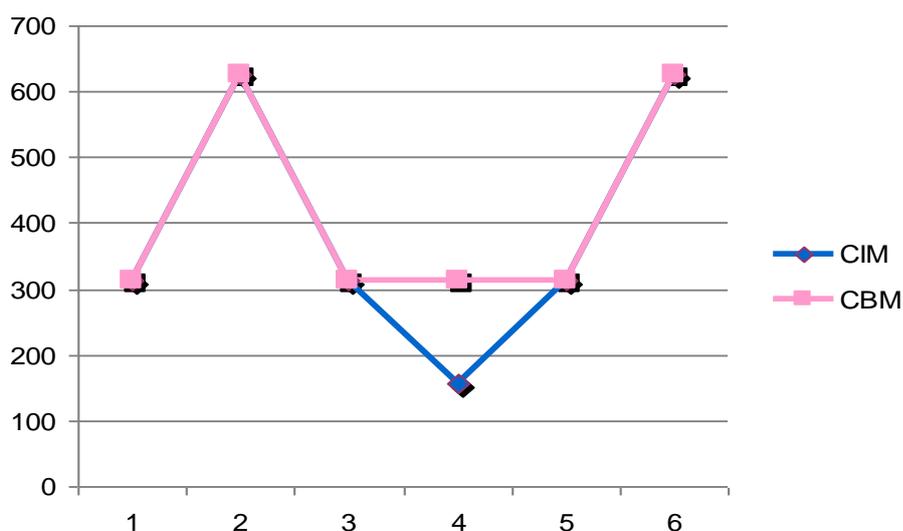


FIGURA 14 – Gráfico dos valores da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e da CBM ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados para cada extrato etanólico testado.

Somente o extrato EE4, apresentou CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) menor que os demais extratos de *B. trimera*, porém sua CBM ( $\mu\text{g/mL}$ ) foi idêntica aos demais extratos desta espécie.

#### **5.3.4 Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os extratos aquosos**

Com a realização da CIM para os extratos aquosos, pode-se verificar que a maior parte dos extratos aquosos não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, pois houve predominância de poços turvos.

Apenas o extrato EA1 apresentou inibição do crescimento bacteriano CIM = 2500  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.3.5 Resultados da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os extratos aquosos

Como apenas o extrato EA1 apresentou inibição do crescimento bacteriano na concentração 2500 µg/mL, foi realizada a determinação da CBM apenas para esta concentração. Após 72 horas de incubação, as placas apresentaram crescimento bacteriano, quando semeado no Agar Mueller-Hinton acrescido de sangue de carneiro estéril desfibrinado a 5%.

Diante destes resultados, pode-se concluir que o extrato EA1 apenas inibiu o crescimento bacteriano na concentração 2500 µg/mL, mas não apresentou a capacidade de ocasionar “morte” do *H. pylori* nesta concentração.

Os demais extratos aquosos apresentaram crescimento bacteriano em todas as diluições testadas. Desta forma, supõe-se que não possuam a capacidade de inibir o crescimento do microorganismo *H. pylori*.

Na Tabela 12, estão relacionados os valores obtidos da CIM (µg/mL) e CBM (µg/mL) para os seis extratos aquosos.

TABELA 12 - Valores das CIM (µg/mL) e CBM (µg/mL) para os extratos aquosos.

Nº amostra	Espécie	Local	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
EA1	<i>B. trimera</i>	Mata/RS	2500	-
EA2	<i>B. articulata</i>	Mata/RS	-	-
EA3	<i>B. trimera</i>	Marques de Souza/RS	-	-
EA4	<i>B. trimera</i>	Westfália/RS	-	-
EA5	<i>B. trimera</i>	Santa Clara do Sul/RS	-	-
EA6	<i>B. articulata</i>	Santa Clara do Sul/RS	-	-

## 6. DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos, percebeu-se que tanto o extrato aquoso 1 (EA1), como o extrato etanólico 1 (EE1), pertencentes à espécie *B. trimera*, coletados na cidade de Mata (RS), no inverno, apresentaram rendimentos superiores aos apresentados pelo extrato aquoso 5 (EA5) e o etanólico 5 (EE5), também da espécie *B. trimera*, coletados na cidade de Santa Clara do Sul (RS), no verão. Já, o extrato etanólico 2 (EE2), coletado no inverno na cidade de Mata (RS), apresentou rendimento ligeiramente inferior ao extrato etanólico 6 (EE6), coletado no verão na cidade de Santa Clara do Sul, ambos pertencentes a espécie *B. articulata*.

Estas diferenças nos rendimentos dos extratos, provavelmente sejam resultado de variações ambientais como índices pluviométricos, temperaturas, secagem, entre outros.

Apenas os extratos aquosos 1 e 2 (EA1 e EA2), e o extrato etanólico 1 (EE1), da espécie *B. trimera*, coletados na cidade de Mata (RS), no inverno, não apresentaram a presença de alcalóides. Todavia, o EA1 e o EE1, apresentaram atividade antimicrobiana (o extrato aquoso, apenas atividade bacteriostática na concentração 2500 µg/mL, e o etanólico atividade bacteriostática e bactericida, na concentração 312,5 µg/mL), pressupondo-se, desta forma, que a presença de alcalóides não esteja, ou esteja muito pouco, relacionada com a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos.

Assim como os alcalóides, provavelmente as cumarinas contribuem muito pouco para o desenvolvimento de atividade antimicrobiana contra o microorganismo

*H. pylori*. Pois, o extrato etanólico 4 (EE4) e o extrato aquoso 1 (EA1) não apresentaram a presença de cumarinas. Todavia, o EA1, foi o único extrato aquoso que apresentou atividade bacteriostática, e o EE4 apresentou ação bactericida idêntica aos demais extratos etanólicos pertencentes à espécie *B. trimera*, que apresentaram a presença de cumarinas.

Ainda, sabendo-se que os taninos possuem a propriedade de precipitar proteínas, e da sua possível atividade sobre as membranas celulares dos microorganismos, o fato de todos os extratos testados no presente experimento, terem apresentado a presença de taninos, nos indica que outros metabólitos devem estar presentes para o desenvolvimento de atividade antimicrobiana. Pois, os extratos aquosos, em sua maioria, não apresentaram atividade antimicrobiana, mas todos haviam apresentado a presença de taninos.

Devido ao fato de as saponinas apresentarem uma estrutura constituída de parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide), e parte hidrofílica (açúcares), elas apresentam ação sobre as membranas celulares, onde agem alterando a permeabilidade, ou causando destruição (SIMÕES *et al.*, 2003, p.618). Esta propriedade, provavelmente seja fundamental para o desenvolvimento da atividade antimicrobiana apresentada por algumas espécies de plantas ricas em saponinas.

Tendo em vista, que os extratos etanólicos apresentaram uma predominância de saponinas, em relação aos extratos aquosos, e ainda, como as colunas de espuma formadas pelos extratos etanólicos foram superiores as formadas pelos respectivos extratos aquosos, concluiu-se que a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos etanólicos de *B. trimera* e de *B. articulata* frente ao microorganismo *H. pylori*, esteja diretamente relacionada com a presença de saponinas.

Diante do fato de todos os extratos, tanto aquosos como etanólicos, apresentarem reação positiva para a presença de flavonóides, e como apenas os extratos etanólicos demonstraram atividade antimicrobiana considerável, entendeu-se que a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos de *B. trimera* e *B.*

*articulata* seja resultado da presença deste e de outros grupos de metabólitos, como as saponinas e os taninos.

Em 2008, um estudo realizado por Schmidt *et al.*, demonstrou que as CBMs dos extratos etanólicos de *B. trimera* sobre uma gama de bactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* e *Bacillus subtilis*) variou de 512 µg/mL a 2048 µg/mL. Ao compararmos estes valores com os obtidos no presente estudo, onde as CBMs variaram de 312,5 µg/mL a 625 µg/mL, percebeu-se que as concentrações dos extratos etanólicos necessárias para ocasionar a morte do microorganismo *H. pylori* foram inferiores as encontradas para as referidas bactérias.

Os valores das CIMs e das CBMs, apresentados pelos extratos etanólicos de *B. trimera* e *B. articulata*, não apresentaram variação significativa em relação ao período do ano em que foram coletadas, quando comparados o EE1 (*B. trimera* – Mata/RS) coletada no inverno, com o EE5 (*B. trimera* – Santa Clara do Sul/RS) coletado no verão, assim como EE2 (*B. articulata* – Mata/RS) coletado no inverno, com EE6 (*B. articulata* – Santa Clara do Sul/RS) coletado no verão. Resultados semelhantes foram obtidos por Schmidt *et al.* (2008), onde demonstraram que a variação sazonal afetou muito pouco o potencial antimicrobiano dos extratos etanólicos de *B. trimera*.

Borella *et al.* (2001) observaram maiores teores de flavonóides em indivíduos de *B. trimera* coletados no verão. Tendo em vista que estes metabólitos possuem reconhecida atividade antimicrobiana e, como todos os extratos aquosos e etanólicos, tanto de *B. trimera* como de *B. articulata*, apresentaram a presença de flavonóides, mas somente o EE4, coletado no período de verão em Westfália, apresentou CIM inferior aos demais, é possível que nesta amostra tenha ocorrido um incremento no teor destes metabólitos, o que poderia justificar esta variação.

Todavia, o EE5 também pertencente a *B. trimera* e coletado no verão, não apresentou variação em relação ao EE1, também pertencente à espécie *B. trimera*, mas coletado no inverno. Assim, fica evidente que mesmo que ocorra um aumento

no teor destes metabólitos, a atividade antimicrobiana é resultado da presença de mais de um grupo de metabólitos. Desta forma, é provável que a CIM do EE4 tenha também sido influenciada pelo ambiente onde foi coletada (chuva, luminosidade, componentes do solo, entre outros), fatores que provavelmente tenham contribuído para esta variação.

Ainda, diante das análises estatísticas, foi possível verificar que ocorreram variações significativas ( $p < 0,001$ ), entre os valores de CIMs, apresentados pelos extratos de *B. trimera* e *B. articulata*. Analisando os valores de CIMs obtidos para cada espécie, foi possível verificar que não ocorreram variações significativas ( $p > 0,05$ ) dos valores de CIM, apresentados pelos extratos de *B. articulata*. Todavia, em relação aos valores de CIMs, apresentados pelos extratos de *B. trimera*, foram observadas variações extremamente significativas ( $p < 0,001$ ), quando comparados os valores dos extratos EE1, EE3 e EE5 com EE4.

Também, não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ) dos valores de CBM para extratos de mesma espécie, independente do local onde foram coletados. Mas, diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ), foi observada, para extratos de espécies diferentes.

*B.trimera* apresentou valores de CIMs e CBMs inferiores aos de *B. articulata*, quando se comparando os extratos EE1 (*B. trimera*) e EE2 (*B. articulata*), que foram coletados no mesmo local e no mesmo período, assim como EE5 (*B. trimera*) e EE6 (*B. articulata*) também coletadas no mesmo local e período, sugerindo possível maior atividade antimicrobiana desta espécie.

Como a maioria dos extratos aquosos não apresentou atividade antimicrobiana, provavelmente o emprego destas duas espécies na forma de infusão (forma mais empregada popularmente), não apresente atividade sobre pacientes infectados por este microorganismo. Desta forma, o emprego popular da carqueja, na forma de infusão, para a melhora dos problemas gástricos, como úlceras e gastrites, decorra das suas propriedades antiinflamatórias.

Em 2007, Leite *et al.* demonstraram a existência de atividade antiinflamatória e citoprotetora de extratos aquosos de *B. trimera*. Em 2009, Dias *et al.* referiram uma redução de 90 % da área de lesão ulcerativa com o emprego de extratos de carqueja. Sendo assim, provavelmente os pacientes que utilizam esta planta obterão melhora dos sintomas clínicos das patologias gastrointestinais, principalmente pela atividade antiinflamatória exercida por esta.

Diante disto, pacientes infectados por *H. pylori*, que utilizarem infusão para eliminação deste microorganismo, provavelmente não eliminarão a bactéria, apenas serão beneficiados pela melhora dos sintomas clínicos resultantes das lesões causadas por este microorganismo (gastrite, úlceras duodenais e/ou pépticas e até mesmo o câncer gástrico).

Portanto, podemos pensar em duas hipóteses: os pacientes que não são colonizados por *H. pylori* e apresentam lesões gástricas decorrentes de stress, ou outro fator orgânico, serão privilegiados com a diminuição da inflamação; os pacientes infectados por *H. pylori*, que apresentam sintomatologia, ou seja, que já desenvolveram algum tipo de lesão decorrente desta infecção, ao utilizarem a infusão, estarão apenas suprimindo estes sintomas, mas não erradicando a bactéria. Isto pode representar um problema, pois é sabido que a infecção por *H. pylori* é um dos fatores predisponentes para o desenvolvimento de câncer gástrico. Assim, com a melhora dos sintomas, a maioria dos pacientes não irá investigar a real causa dos sintomas, e permanecerão colonizados por *H. pylori*, aumentando o risco de desenvolverem câncer gástrico.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, com a realização deste trabalho, foi possível concluir que os extratos etanólicos, tanto de *B. articulata*, como de *B. trimera* possuem atividade antimicrobiana sobre o microorganismo *Helicobacter pylori*.

Constatou-se que a atividade antimicrobiana demonstrada pelos extratos, apresentou variação significativa entre as duas espécies. Foi verificado que os valores, tanto das Concentrações Inibitórias Mínimas, como das Concentrações Bactericidas Mínimas, apresentados pela espécie de *B. trimera*, eram inferiores aos da espécie *B. articulata*. Estes resultados sugerem que a atividade antimicrobiana de *B. trimera* sobre o *H. pylori*, seja mais intensa, do que a de *B. articulata*.

Como os extratos etanólicos tanto de *B. trimera* como de *B. articulata* apresentaram valores de Concentração Bactericida Mínima (CBM) idênticos para amostras de mesmas espécies, independente do local de sua coleta, concluiu-se, que sua atividade antimicrobiana sofra pouca, ou nenhuma, interferência do local de coleta.

Ao correlacionar os resultados obtidos no *screening* fitoquímico, com a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos, percebeu-se que os resultados obtidos para os extratos etanólicos foram ligeiramente superiores aos aquosos, em todas as classes de substâncias testadas, assim como os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana destes extratos. Como não foram realizadas análises quantitativas destas substâncias, apenas pode-se supor que estas estejam

presentes em concentrações maiores nos extratos etanólicos, e que estejam diretamente relacionadas com a atividade antimicrobiana.

Ainda, é possível, que em concentrações maiores que as empregadas no experimento, os extratos aquosos possam apresentar atividade antimicrobiana. Todavia, seria necessário o emprego de uma quantidade muito grande de planta, o que tornaria o experimento pouco viável.

É sabido, que os testes realizados *in vitro* não podem ser extrapolados para tecidos humanos, pois existe a interferência dos mecanismos de absorção, biodisponibilidade, eliminação, entre outros, que, *in vivo*, podem divergir dos resultados obtidos *in vitro*.

Desta forma, por se tratar de um microorganismo que requer a associação de mais de um antimicrobiano para sua erradicação, por estar presente em grande parcela da população mundial, e principalmente, por estar associado ao desenvolvimento de câncer gástrico, descobertas científicas que possam contribuir para diminuição das taxas de infecção, ou a descoberta de novas substâncias que possam servir de protótipo para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas são muito importantes.

Portanto, é fundamental que novos estudos químicos e biológicos com estas espécies sejam realizados, buscando identificar novos compostos químicos com atividades antimicrobianas, que possam servir de alternativa ao tratamento do microorganismo *H. pylori*, principalmente diante do crescente número de cepas resistentes aos tratamentos hoje disponíveis.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, M.J.; BESSA, A.L.; BALLARIN, B.; ARAGÓN, O.; GONZALES, E.; BERMEJO, P. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *J. Ethnopharmacol.*, v.103, p.338-344, 2006.
- ABAD, M.J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 2, p.76-96, 2007.
- AERSTS, T.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.75, p.1-12, 1999.
- AGOSTINHO, F.J. Soroprevalência e fatores de risco para infecção pelo *Helicobacter pylori*. *Jornal de Pediatria*, v.79, n.1, p.3-4, 2003.
- ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A de A.B.; JOSÉ, K.F.D. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. 1. ed. Canoas: ULBRA, 1995, p.36-40
- ALLEN, A. & FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v.288, p.1-19, 2005.
- ALMEIDA, E.R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, p.341, 1993.
- ARTHERTON, J.C. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*, n.40, p.701-703, 1997.
- AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.230-234, 2000.
- AXON, A. How to influence health providers. *Helicobacter*, v.12 (Suppl 2), p.80-84, 2007.

BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. Res. Pharmacol., v.47, p.93-98, 2003.

BARROSO, G.M. Compositae – Subtributo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. Rodriguésia v.28, p. 26-32, 1976.

BEDOYA, A.; GARAY, J.; SANZON, F.; BRAVO, L.E.; BRAVO, J.C.; CORREA, H.; CRAVER, R.; FONTHAM, E.; DU, J.X.; CORREA, P. Histopathology of gastritis in *Helicobacter pylori* infected children from populations at high and low gastric cancer risk. Hum Pathol., v.34, n.3, p.206-13, 2003.

BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.101, p.387-390, 2006.

BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N. Práticas de Farmacognosia 1º reimpressão: UNIVALI, Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

BITTENCOURT, P.F.S.; ROCHA, G.A.; PENNA, F.J.; QUEIROZ, D.M.M. Úlcera péptica gastroduodenal e infecção pelo *Helicobacter pylori* na criança e adolescente. Jornal de Pediatria, v.82, n.5, p.325-334, 2006.

BLEECKER, U.; LANCIERS, S.; KEPPENS, E.; VANDENPLAS, Y. Evolution of *Helicobacter pylori* positivity in infants born from positive mothers. J Pediatric Gastroenterol Nutr., v.19, n.1, p.87-90, 1994.

BONA, C.M. Estaquia, calagem e sombreamento de carqueja. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Produção vegetal - Setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

BONA, C.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. Ciência Rural, v.35, n.1, p. 223-226, 2005.

BORELLA, J.C.; FONTOURA, A.; MENEZES JUNIOR, A.; FRANÇA, S.C. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) - Carqueja. Rev. Bras. de Plantas Mediciniais, v.4, n.1, p.101-104, 2001.

BORGES, L.R.; ASTOLFI, V.; MOSSI, A.L.; CANSIAN, R.L. Determinação de Atividades Biológicas em Extratos de Carqueja (*Baccharis Trimeria* (Less) D.C.). In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG, 2007.

BRASIL. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Saúde Suplementar - Primeiras diretrizes clínicas na saúde suplementar – versão preliminar, 1ª ed., Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <[www.ans.gov.br/portal/upload/biblioteca/Primeiras\\_Diretrizes\\_Clinicas.pdf](http://www.ans.gov.br/portal/upload/biblioteca/Primeiras_Diretrizes_Clinicas.pdf)> Acesso em: 02 jan. 2010.

BROOKS, D.R.; TETLEY, L.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. *Journal of Cell Science*, 113, p. 4035-4041, 2000.

BROWN, L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.*, v.22, n.2, p. 283-97, 2000.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damager and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements. *J. Physiol. Pharmacol.*, n.54, suppl.3, p.99-126, 2003.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M.; FARAGO, P.V.; MATZENBACHER, N.I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I -Estudos botânicos. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.15, n.3, p.268-271, 2005.

CAMARGO, M.L.T.A. *Medicina popular*, 1. ed. São Paulo: Almed, 1985, p.130.

CARNEIRO, M.A.A.; FERNANDES, G.W. Herbivoria. *Ciência Hoje*, v.20, n.118, p.35-9, 1996.

CARVALHO, I. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de Química Farmacêutica. *Quim. Nova*, n.26, p.428-438, 2003.

CASTRO, L.P.; COELHO, L.G.V. *Gastroenterologia*. 2. ed. São Paulo: Medsi, 2004.

CHAN, W.Y.; HUI, P.K.; LEUNG, K.M.; THOMAS, T.M. Modes of *Helicobacter* colonization and gastroepithelial damage. *Histopathology.*, 21, p.521-528, 1992.

CIFUENTE, D.A.; SIMIRGIOTIS, M.J.; FAVIER, S.; ROTELLI, A.E.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sopherifolia* in mice. *Phytother. Res.*, v.15, p.529-531, 2001.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. - Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo. M100-S15, v.25, n.1, 2005, p.152.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. – Metodologia dos Ttestes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para a Bactéria de Crescimento Aeróbico: Substitui M7-A5. 6. ed. M7-A6,v.23, n.2, 2003, p.53

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 19º Suplemento Informativo. M100-S19, v.19, n.3, 2009, p.91.

COELHO, L.G.V.; ZATERKA, S. II Consenso Brasileiro sobre *Helicobacter pylori*. *Arq. Gastroenterol.*, v.42, n.2, p.128-132, 2005.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF, v.2, 1984, p.6.

DIAS, L.F. de T; MELO, E.S. de; HERNANDES, L.S.; BACCHI, E.M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). Rev. Bras. Farmacog., n.19, v.1B, p.309-314, 2009.

DOMINGUEZ-MUNOZ, J.E. Targeting the abnormalities of gastroduodenal functions in functional dyspepsia. Dig. Dis., v.19, n.3, p.195-200, 2001.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Multiciência, 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf)> Acesso em: 25 out. 2009.

ESCOBAR, M.L.; KAWAKAMI, E. Evidence of mother-child transmission of *Helicobacter pylori* infection. Arq. Gastroenterol., v.41, n.4, p.239-244, 2004.

ESLICK, G. Sexual transmission of *Helicobacter pylori* via oral-anal Intercourse. Int. J. Std. Aids, v.13, n.1, p. 7-11, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Parte II, Quinto Fascículo/ Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira, 4. ed. São Paulo, Atheneu, 2004, p.255.

FELIN, I.P.D.; GRIVICICH, I.; FELIN, C.R.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Expressão de P53, P16 e COX-2 em carcinoma escamoso de esôfago e associação histopatológica. Arq. Gastroenterol., v.45, n.4, 2008.

FERESIN, G.E; TAPIA, A.; LÓPEZ, S.N.; ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in tradicional medicine of San Juan province, Argentine. J. Ethnopharmacol., v.78, p.103-107, 2001.

FORD, A.C.; DELANEY, B.C.; FORMAN, D.; MOAYYEDI, P. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients Cochrane Database of Systematic Reviews, 2006.

FURMAN, M.D.S.; REOLON, C.; PAVAN, A.; ONOFRE, S.B. Interferência do Extrato Etanólico de *Baccharis Trimeria* (Less) D. C. sobre a Atividade Antimicrobiana dos Principais Antibióticos Utilizados na Terapêutica Clínica. Rev. De Biologia E Saúde Da UNISEP, v.1, n.1, p.1-8, 2007.

GAMBERINI, M. T.; SKORUPA, L. A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis trimera* Mart. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 86, p.137-139, 1991.

GENÉ, R.M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARÍN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera*: Identification of its Active Constituents. Planta Med., v.62, p.232-5, 1996.

GIULIANO, D.A. Clasificación infragenérica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) Darwiniana, v.39, n.1, 2001, p.131-154.

GLYNN, M.K.; FRIEDMAN, C.R.; GOLD, B.D. et al. Seroincidence of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. Clin. Infect. Dis., v.35, p.1059-1065, 2002.

GO, M.F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Aliment. Pharmacol. Ther., v.16, suppl.1, p.3-15, 2006.

GRAHAM, D.Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implication for therapy. Gastroenterol., v.115, v.5, p.1272-1277, 1998.

HAN, S.R.; BHAKDI, S.; MAEURER, M.J., SCHNEIDER, T., GEHRING, S. Stable and unstable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: should antibiotic resistance testing be performed prior to eradication therapy? J. Clin. Microbiol., v.37, n.8, p.2740-2741, 1999.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry., v.55, p.481-504, 2000.

HEIDEN, G.; MACIAS, L.; BOBROWSKI, V.L.; IGANCI, J.R.V. Comercialização de carqueja por ervateiros da zona central de Pelotas, Rio Grande do Sul. Rev. Biol. e Cienc. da Terra, n.2, v.6, p.50-57, 2006.

HELICOBACTER FOUNDATION, 2006. Disponível em: <[http://www.helico.com/h\\_epidemiology.html](http://www.helico.com/h_epidemiology.html)> Acesso em: 02 mar. 2009.

HOLTON, J. Clinical Relevance of Culture: Why, How, and When. Helicobacter, v.2, suppl.1, p.25-33, 1997.

HUNT, R.H. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. Am. J. Med., v.100, p.42-50, 1996.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH CANCER Global Cancer Statistics. Disponível em: <<http://www.globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=76#BOTH>> Acesso em: 02 abr. 2010.

JANUÁRIO, A.H.; SANTOS, S.L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M.V.; PIETRO, R.C.L.R.; SATO, D.N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA, S.C.; SOARES, S.M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. Chem. Biol. Interac., v.150, p.243-251, 2004.

KIM, J.J.; KIM, J.G.; KWON, D.H. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolated in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. Helicobacter, v.8, n.3, p.202-206, 2003.

KODAIRA, M.S.; ESCOBAR, A.M.de U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. Rev. Saúde Pública, n.36, v.3, p.365-369, 2002.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed., Medsi, 2001.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWISKI, T.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, W.W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. J. Physiol. Pharmacol., v.56, n.4, p.507-530, 2005.

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J.H. Química Farmacêutica. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, p.541, 1988.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. Journal Bras. de Pat. e Med. Lab., Rio de Janeiro, v.39, n.4, p.335-342, 2003.

LEAL, T. Nova Bactéria do mau hálito. Ciência Hoje On-line, 2008. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/microbiologia/nova-bacteria-do-mau-halito/>> Acesso em: 19 abr. 2009.

LEITE, E. C.; LUNARDELLI, A.; CASTAMAN, T. A.; PAUL, E. L.; OLIVEIRA J. R. Extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Asteraceae) diminui a inflamação e o dano celular em pleurisia induzida por veneno de *Dirphia* sp. (Saturniidae). Rev. Bras. Anál. Clín., n.1, v.39, p.29-32, 2007.

LOFFELD, R.J.; WERDMULLER, B.F.; KUSTERS, J.G.; KUIPERS, E.J. Functional dyspepsia is associated if cagA-positive *Helicobacter pylori* strains. Scand. J. Gastroenterol., v.36, n.4, p.351-355, 2001.

MAEDA, S. & MENTIS, A.F. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter, v.12, suppl.1, p.10-14, 2007.

MBULAITEYE, S.M.; HISADA, M. EL-OMAR, E.M. *Helicobacter pylori* associated global gastric câncer burden. Front. Biosci., v.14, p.1490-1504, 2009.

MADIGAN, M.T. ; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. Tradução e revisão Cynthia M. Kyaw, 10. ed., São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MALATY, H.M.; ENGSTRAND, L.; PEDERSEN, N.L.; GRAHAM, D.Y. *Helicobacter pylori* infection: genetic and envirolnmental influences A study of twins. Ann. Intern. Med., v.120, n.12, p.982-986, 1994.

MALATY, H.M.; GRAHAM, D.Y.; ISAKSSON, I.; ENGSTRAND, L.; PEDERSEN, N.L. Are Genetic Influences on Peptic Ulcer Dependent or Independent of Genetic Influences for *Helicobacter pylori* Infection? Arch. Intern. Med., v.160, p.105-109, 2010.

MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; O'MORAIN, C.; HUNGIN, A.P.S.; JONES, R.; AXON, A.; GRAHAM, D.Y.; TYTGAT, G., et al. and the European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG). Current concepts in the man-agement of *Helicobacter pylori*

infection – the Maastricht 2–2000 consensus report. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 16, p.167-80, 2002.

MARSHALL, B.; SCHOEP, T. *Helicobacter pylori* as a vaccine delivery system. *Helicobacter*, v.12 (Suppl 2), p.75-79, 2007.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas medicinais. 1. ed. Viçosa: UFV, 1995, p.220.

MCCALLION, W.A.; ARDILL, J.E.S.; BAMFORD, K.B.; POTTS, S.R.; BOSTON, V.E. Age dependent hypergastrinaemia in children with *Helicobacter pylori* gastritis – evidence of early acquisition of infection. *Gut.*, v.37, p.35-38, 1995.

MELLO, J.C.P. Utilização de plantas da biodiversidade brasileira contendo Taninos. Disponível em: <<http://cni.inta.gov.ar/helminto/Congreso%20Brasil%202008/UTILIZA%C3%87%C3%83O%20DE%20PLANTAS%20DA%20BIODIVERSIDADE%20BRASILEIRA%20CONTENDO%20TANINOS.pdf>> Acesso em: 04 fev. 2009.

MENTZ, L.A.; LUTZEMBERGER, L.C.; SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). *Caderno de Farmácia*, v.13, n.1, p.25-48, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil em 2010. INCA – Instituto Nacional de Câncer. 2010. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?/link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?/link=conteudo_view.asp&ID=5)>. Acesso em: 03 maio 2010.

MOBLEY, H.L. Definig *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. *Am. J. Med.*, v.100, p.2-9, 1996.

MONTECCUCO, C.; BERNARD, M. Immunosuppressive and Proinflammatory Activities of the Vac A Toxin of *Helicobacter pylori*. *J. Exp. Med.*, v.198, n.12, 2003. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20031839>> Acesso em: 11 dez. 2009.

MOSS, S.F.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter* and gastric malignancies. *Helicobacter*, v.12, suppl.1, p.23-30, 2007.

MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATI, M.G.; MONACHE, F.D. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*: bioatividade sobre *Artemia salina*. *Quím. Nova*, v.26, p.309-311, 2003.

MULLER, L.B.; FAGUNDES, R.B.; MORAES, C.C.; RAMPAZZO, A. Prevalência da Infecção por *Helicobacter Pylori* e das Lesões Precursoras do Câncer Gástrico em Pacientes Dispépticos. *Arq. Gastroenterol.*, v.44, n.2, p.93-98, 2007.

NETTO, B.F.; GEMA, S.; OLIVEIRA, F.V. DE; OLIVEIRA, L.F.S. de; MENDONÇA, S. de. Avaliação *in vitro* da Atividade Anti-*Helicobacter* de Produtos Sintéticos Bioativos.

In: I Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica UNIBAN, p. 1-3, 2008. Disponível em: <[http://www.uniban.br/hotslides/iniciacao\\_cientifica/ciencias\\_vida/farmacia/avalia\\_invitro\\_sinteticos.pdf](http://www.uniban.br/hotslides/iniciacao_cientifica/ciencias_vida/farmacia/avalia_invitro_sinteticos.pdf)>. Acesso em: 30 ago. 2009.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the Period 1981-2002 J. Nat. Prod., n.66, p.1022-1037, 2003.

NOMURA, A.; STEMMERMANN, G. N.; CHYOU, P. H.; KATO, I.; PEREZ-PEREZ, I.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among japanese americans in Hawaii. New England Journal of Medicine, v.325, n.16, p.1132-1136, 1991.

OLIVEIRA, S.Q.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usteriu*. Acta Farm. Bonaerense v. 23, n.3, p.365-368, 2004.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.R.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev. Bras. Farmacogn., v.16, n.1, p.77-82, 2006.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S.I. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2. ed., São Paulo: Sarvier, 2004.

PANIS, C. Plantas do Gênero *Baccharis*. Uso Popular X Comprovação Científica INFARMA, Brasília, v.20, p.5-6, 2008.

PARSONNET J, BLASER MJ, PEREZ-PEREZ GI, HARGRETT-BEAN N, TAUXE RV Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. Gastroenterol., v.2, p.41-46, 1992.

PAYÁ, M.; HOULT, J.R.S. General Pharmacology v.27, n.4, p.713-722, 1996.

PODDAR, U.; YACHHA, S.K. *Helicobacter pylori* in children: an Indian perspective. Indian Pediatr., v.44, p.761-770, 2007.

PETERSON, W.L. The role of acid in upper gastrointestinal haemorrhage due to ulcer and stress-related mucosal damage. Aliment. Pharmacol. Ther., v.9, n.1, p.43-46, 1995.

PIRES, C.A.S. Avaliação química e biológica de extratos de *Baccharis* pertencentes à seção Caulopterae (carquejas). 2004. 174p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

QUEIROZ, D.M.M.; MENDES, E.M.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, C.A.; MAGALHÃES, P.P.; MOURA, S.B.; CABRAL, M.M.D.A.; NOGUEIRA, A.M.M.F. CagA-positive *Helicobacter pylori* and risk for developing gastric carcinoma in Brazil. Int. J. Câncer, n.78, p.135-139, 1998.

QUEIROZ, D.M.; MENDES, E.M.; CARVALHO, A.S.; ROCHA, G.A.; OLIVEIRA, A.M.R.; SOARES, A.S.T. Factors associated with *Helicobacter pylori* by a cagA-positive strain in children. J. Infect. Dis., n.181, p.626-639, 2000. .

RAD, R.; GERHARD, M.; LANG, R.; SCHONIGER, M.; ROSCH, T.; SCHEPP, W., et al. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. J. Immunol., n.168, p.3033-3041, 2002.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. Rev. Bras. de Farm., v. 11, n.2, p.57-69, 2001.

ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS, J.I.; SERRANO, V.; PACHECO, S. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. Phytomedicine, v.6, n.5, p. 367-371, 1999.

RUIZ, A.L.G.; TAFFARELLO, D. ; SOUZA, V.H.S.; CARVALHO, J.E. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. Ver. Bras. Farmacogn., v.18, n.2, p.295-300, 2008.

SALAS, C. Fundamentos fisiopatológicos para el tratamiento de la ulcera péptica. Gen. Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología., v.44, n.2, p.180-190, 1990.

SALIH, B.A. *Helicobacter pylori* infection in Developing Countries: The Burden for How Long? The Saudi Journal of Gastroenterology, v.15, n.3, p.201-207, 2009.

SANCHEZ-PALOMINO S, ABAD MJ, BEDOVA LM, GARCIA J, GONZALES E, CHIRIBOGA X, BERMEJO P, ALCAMI J. Screening of South American plants against human immunodeficiency virus: preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis*. Biol. Pharm. Bull., v.25, n.9, p.1147-1150, 2002.

SARTORI, M.R.K Atividade Antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). 2005. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. Microbiologia: mecanismo das doenças infecciosas. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2002, 642p.

SCHMIDT, F.B.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Efeito da sazonalidade sobre o potencial antibacteriano de extratos etanólicos de *B. trimera* (Less) DC. (Asteraceae). Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.10, n.2, p.1-5, 2008.

SHERMAN, P.; CZINN, S.; DRUMM, B.; GOTTRAND, F.; KAWAKAMI, E.; MADRAZO, A.; ODERDA, G.; SEO, J.K.; SULLIVAN, P.; TOYODA, S.; WEAVER, L.; WU, T.C. *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., v.35, suppl.2, p.128-33, 2002.

SILVA, F.G.; JANUÁRIO, A.H.; PINTO, J.E.B.P.; NASCIMENTO, V.E.; BARIZAN, W.S.; SALES, J.F.; FRANÇA, S.C. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D. C.] coletadas nas estações seca e úmida. Ver. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.2, p.19-25, 2006.

SILVA, P. Farmacologia. 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 5. ed, Porto Alegre: UFRGS, 1998, p.42-45.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed., Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/URGS, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed., Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/URGS, 2003.

SIQUEIRA, N.C.S. DE; ALICE, C.B.; THIESEN, F.V. Aspectos farmacognósticos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* LAM. (PERS.), Compositae. Caderno de Farmácia da UFRGS, v. 4, n.1/2, p.63-76, 1988.

SIQUEIRA, J.S.; LIMA, P.S.S; BARRETO, A.S.; QUINTANS L.J.J. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* - Revisão. Rev. Bras. Anal. Clín., v.39, n.1, p.9-13, 2007.

SOUZA, M.P.; MATOS M.E. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. 1 ed., Fortaleza: E.U.F.C., 1991, p.416.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* Infection. Review Article. N. Engl. J. Med., v.347, n.15, p.1175-1186, 2002.

TONELLI, E.; FREIRE, L.M.S. Doenças Infeciosas na Infância e Adolescência. São Paulo: Medsi, p.656-657, 2000.

TORTORA G.J., FUNKE B.R., CASE C.L. Microbiologia. 8. ed., trad. Atual. Por Roberta Marchiori Martins. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura? Quím. Nova, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspéctos químicos, econômicos e biológicos. Quím. Nova, v.28, n.1, p.85-94, 2005.

VERGUEIRO, C.S.V; CORDIOLLI, R.; MARTUCCI, D.; PERES, V.; KIYAMU, A.R.; RIBEIRO, K. de C.B.; CHIATTONE, C.S. Soroprevalência e fatores associados à infecção pelo *Helicobacter pylori* em doadores de medulla óssea de São Paulo. Rev. Bras. Epidemiol., n.11, v.2, p.196-203, 2008.

WEIMANN, C.; GÖRANSSON, U.; PONGPRAYOON-CLAESON, U.; CLAESON, P.; BOHLIN, L.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. J. Pharm. Pharmacol., v.54, n.1, p. 99-104, 2002.

ZANON, S.M.; CERIATTI, F.S.; ROVERA, M.; SABINI, L.J.; RAMOS, B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. Rev. Latinoam. de Microbiol., v.41, p.59-62, 1999.

ZATERKA, S.; EISIG, J.N.; CHINZON, D.; ROTHSTEIN, W. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. N.12, v.1, p. 82-88, 2007.

ZHANG, A.; ZHENG, Q.; CHEN, X.; XIAO, S.; LIU, W.; LU, H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. BMC Gastroenterol., v.8, n.49, p.1-6, 2008.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology. v.3, n.2, p.80-89, 2006.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Moderna. Chapecó: Argos, 2001.

# 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](#)