



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CINTHYA SOARES CÂNDIDO

ESTUDO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE COMPONENTES DA
DIETA E DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE
BRASILEIRO SOBRE *Helicobacter pylori*

FORTALEZA
2008

CINTHYA SOARES CÂNDIDO

ESTUDO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE COMPONENTES
DA DIETA E DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE
BRASILEIRO SOBRE *Helicobacter pylori*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso
de Pós-graduação em Microbiologia Médica, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano
de Carvalho.

FORTALEZA
2008

CINTHYA SOARES CÂNDIDO

ESTUDO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE COMPONENTES DA DIETA E DE PLANTAS
MEDICINAIS DO NORDESTE BRASILEIRO SOBRE *Helicobacter pylori*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho (Orientadora)
(Universidade Federal do Ceará)

Profª. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campêlo Braga
(Universidade Federal do Ceará)

Profª. Dra. Cristiane Cunha Frota
(Universidade Federal do Ceará)

Profª. Dra. Márcia Maria de Negreiros Pinto Rocha
(Universidade de Fortaleza)

**Aos meus pais pela dedicação, amor, apoio
e por acreditar na realização de um sonho
e uma nova conquista.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, força, saúde e sabedoria, guiando-me sempre na busca de meus objetivos.

De modo bastante especial à Profª. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho pela orientação, incentivo e exemplo para o meu aprimoramento profissional.

À Profª. Dra. Márcia Maria Negreiros Pinto Rocha por doar seus conhecimentos valiosos e essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos pela seleção e obtenção das plantas estudadas neste trabalho.

À Profª. Dra. Selene Maia de Moraes pelo fornecimento de extratos e óleos essenciais e por disponibilizar seus conhecimentos químicos.

Aos amigos Alexandre Rocha, Joyce Fonteles, Luciano Augusto, Paulo Marcelo Oliveira e Valeska Portela pela solidariedade, incentivo e amizade dispensados durante todo o curso.

Aos amigos Bruno Jaegger, Denise Lins, Jakeline Marques, Theodora Thaís Prado e Waleska Belchior, companheiros do Laboratório de Anaeróbios, pela troca de conhecimentos científicos, incentivo, companheirismo e amizade.

Aos técnicos e amigos José Olavo de Moraes e Teresinha de Jesus dos Santos Rodrigues que não mediram esforços no auxílio à execução deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos, da Universidade de Fortaleza, Nívea e Moisés pelo auxílio prestado.

Aos funcionários do Mestrado em Microbiologia Médica pela disponibilidade e auxílio sempre que precisei.

À Marta Maria de Vasconcelos pela disponibilidade e atenção.

A todos os professores do Mestrado em Microbiologia Médica pelo aprendizado e troca de experiências.

Ao Dr. Gifone Aguiar Rocha e a Dra. Dulciene Maria de Magalhães Queiroz da Universidade Federal de Minas Gerais pela doação das cepas microbianas utilizadas no estudo.

À mestrande Milena Barreto e a doutoranda Renata Mendonça Araújo pelo fornecimento dos óleos essenciais das plantas estudadas.

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que contribuíram direta e indiretamente nas diversas etapas de execução deste trabalho.

**“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo
para a vitória é o desejo de vencer”.**

Gandhi

RESUMO

Helicobacter pylori é uma bactéria que infecta cerca de 50% da população mundial constituindo um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico. O aparecimento deste tipo de câncer está associado à presença da bactéria e a uma soma de elementos de risco, tais como os hábitos alimentares, a predisposição genética e fatores ambientais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de componentes da dieta nordestina (sal, vinagre, pimenta e sumo de batata), extratos e óleos essenciais no crescimento de *H. pylori*. No estudo foram utilizadas uma cepa padrão e uma clínica. O método escolhido para a realização da triagem foi o teste da zona de inibição e para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi o de diluição em ágar descrito pelo CLSI. As cepas foram inoculadas em meio de cultura apropriado contendo diferentes concentrações das substâncias testadas. A leitura foi determinada macroscopicamente e o crescimento confirmado através da realização da microscopia pelo método de Gram e provas bioquímicas. Foi verificado que o sal não inibiu o crescimento de *H. pylori* e nem alterou a sua morfologia, contudo, foi capaz de influenciar na ação de um antimicrobiano, *in vitro*. O vinagre e a pimenta não apresentaram ação antimicrobiana. O sumo de batata foi capaz de promover o crescimento bacteriano mesmo que em pequena proporção. Os extratos etanólicos de erva-cidreira (*Lippia alba* Mill. N.E.B quimiotipos I, II, III) e macela (*Egletes viscosa* L.) foram ativos contra a bactéria. Os óleos essenciais de alfavaca verde (*Ocimum gratissimum* L.) e roxa (*Ocimum* sp), aroeira (*Myracrodruom urundeuva* All.), erva-cidreira (*L. alba* Mill. N.E.B quimiotipos I, II, III) e macela (*E. viscosa* L.) também foram ativos contra *H. pylori*. A caracterização química confirmou os constituintes majoritários das plantas. *H. pylori* constitui, hoje, uma vasta fonte de pesquisa em diversos campos investigativos. Estudos de transmissão, prevalência, resistência a drogas antimicrobianas, novas alternativas terapêuticas e desenvolvimento de vacinas são necessários e bastantes promissores.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, dieta, extratos vegetais, óleos voláteis.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacteria that infects about 50% of the world population constituting one of the principal risk factors for the development of gastric cancer. The emergence of this cancer type is associated to the presence of the bacteria and risk elements, such as the alimentary habits, the genetic predisposition and environmental factors. The present work had as objective evaluates the effect of components of the Northeastern diet (salt, vinegar, pepper and potato juice), extracts and essential oils on *H. pylori* growth. In the study a reference and a clinic strain were used. The chosen method for the accomplishment of the screening test was the inhibitory-zone testing and for determination of the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) it was used the agar dilution method as described by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The strains were inoculated in appropriate culture medium containing different concentrations of the tested substances. The reading was determined macroscopically and the growth confirmed through the accomplishment of the microscopy by the Gram method and biochemical tests. It was verified that the salt did not inhibit the growth and morphology of *H. pylori*, however, it was able to influence the antimicrobial effect, *in vitro*. The vinegar and the pepper did not show antimicrobial activity. The potato juice was shown to promote the bacterial growth. The ethanolic extracts of *Lippia alba* Mill. N.E.B chemotypes I, II, III) and *Egletes viscosa* L. were active against the bacteria. The essential oils of *Ocimum gratissimum* L., *Ocimum* sp, *Myracrodruom urundeuva* All., *L. alba* Mill. N.E.B chemotypes I, II, III and *E. viscosa* L. were also active against *H. pylori*. The chemical characterization confirmed the majority constituents of the plants. *H. pylori* constitute, today, a vast research source in several areas. Related studies the transmission prevalence, resistance antimicrobial, new therapeutic alternatives and development of vaccines they are necessary and plenty promising.

Keywords: *Helicobacter pylori*, diet, plant extracts, volatile oils.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Ocimum gratissimum</i> L	30
FIGURA 2 - <i>Myracrodruom urundeuva</i> (Allemão) Engl	32
FIGURA 3 - <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Br. quimiotipos I, II e III	34
FIGURA 4 - <i>Egletes viscosa</i> Less.....	36
FIGURA 5 - Capítulos florais de <i>Egletes viscosa</i> Less.....	36
FIGURA 6 - Aparelho de destilação com arraste de vapor d'água.....	43
FIGURA 7 - Crescimento de <i>H. pylori</i> na maior concentração de sal (65,5mg/ml)	47
FIGURA 8 - Gram – concentração de sal (65,5 mg/ml)	48
FIGURA 9 - Gram – concentração de sal (0,02 mg/ml)	48
FIGURA 10 - Halos de inibição dos óleos essenciais dos três quimiotipos de Erva-cidreira (<i>L. alba</i> (Mill) E. B.)	50
FIGURA 11 - Halos de inibição dos óleos essenciais de alfavaca verde (<i>O.</i> <i>gratissimum</i> L.) e alfavaca roxa (<i>Ocimum</i> sp).....	51
FIGURA 12 - Halo de inibição do óleo essencial de aroeira (<i>M. urundeuva</i> All.) quimiotipo α -pineno	51
FIGURA 13 - Halos de inibição dos óleos essenciais de aroeira (<i>M.</i> <i>urundeuva</i> All.) quimiotipo β -ocimeno e macela (<i>E. viscosa</i> L.) quimiotipos A e B	52
FIGURA 14 - Halo de inibição do extrato etanólico de macela (<i>E. viscosa</i> L. quimiotipo A)	53
FIGURA 15 - Halos de inibição – extratos etanólicos de erva-cidreira (<i>L. alba</i> (Mill) N. E. B.)	54
FIGURA 16 - Crescimento de <i>H. pylori</i> em BHM	56
FIGURA 17 - Crescimento de <i>H. pylori</i> em agar batata suplementado com sangue desfibrinado de carneiro e antimicrobianos	56
FIGURA 18 - Crescimento de <i>H. pylori</i> em agar batata sem sangue desfibrinado de carneiro	57
FIGURA 19 - Estrutura química dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de <i>Ocimum</i> sp e <i>Ocimum gratissimu</i> L.....	58
FIGURA 20 – Estrutura química dos constituintes majoritários dos 5 quimiotipos de aroeira (<i>M. urundeuva</i> All.)	59
FIGURA 21 - Constituintes majoritários dos quimiotipos de <i>L. alba</i>	62
FIGURA 22 - Estrutura química do acetato de <i>trans</i> -pinocarveíla e acetato de <i>trans</i> -isopinocarveíla.....	64

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Plantas medicinais utilizadas nos testes antimicrobianos deste trabalho.....	41
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Medidas dos halos de inibição formados pelos óleos essenciais avaliados pelo teste da zona de inibição	50
TABELA 2 - Medidas das zonas de inibição dos extratos vegetais avaliados pelo teste da zona de inibição	53
TABELA 3 - CIM dos extratos etanólicos de erva-cidreira e macela	54
TABELA 4 - CIM dos óleos essenciais de alfavaca verde e roxa, aroeira, erva-cidreira e macela	55
TABELA 5 - Constituintes químicos (%) dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de <i>Ocimum</i> sp	57
TABELA 6 - Constituintes químicos (%) dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de <i>O. gratissimum</i> L.	58
TABELA 7 - Composição química dos óleos essenciais dos quimiotipos de <i>L. alba</i>	61
TABELA 8 - Constituintes químicos (%) dos óleos essenciais de <i>E. viscosa</i> L. quimiotipos A e B	63

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

a.C.: antes de Cristo

BHI: Brain Heart Infusion

BHM : Belo Horizonte Meio

CG/EM: Cromatografia gasosa/Espectroscopia de massa

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimetilsulfóxido

Egletes viscosa L.: *Egletes viscosa* Less.

E-test: Epsilometer test

IK: Índice de Kovacs

Myracrodruom urundeuva All.: *Myracrodruom urundeuva* Allemão

NaCl: Cloreto de sódio

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear ¹H

TFT: 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio

UECE: Universidade Estadual do Ceará

UFC: Unidades formadoras de colônias

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

USA: United States of America

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Histórico e taxonomia	16
1.2. Características morfológicas, culturais e tintoriais	18
1.3. Patogênese e mecanismo de virulência	19
1.4. Epidemiologia	21
1.5. Fatores de risco para a infecção pelo <i>H. pylori</i>	23
1.5.1. A dieta como fator de risco para o câncer gástrico	23
1.6. Tratamento	24
1.7. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos	25
1.8. Caracterização das plantas	29
1.8.1. Alfavaca	29
1.8.2. Aroeira	31
1.8.3. Erva-cidreira	33
1.8.4. Macela	35
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Cepas bacterianas	40
3.2. Componentes da dieta e material botânico	40
3.3. Cultura	42
3.4. Identificação e Conservação bacteriana	42
3.5. Preparação e análise dos extratos vegetais	42
3.6. Extração e análise dos óleos essenciais	43
3.7. Teste da zona de inibição	44
3.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	44
3.8.1. Método de diluição em agar	44
3.8.2. Epsilometer Test (E-test)	45
3.9. Teste de crescimento em agar batata	45
4. RESULTADOS	47
4.1. NaCl	47
4.1.1. Efeito do sal (NaCl) no crescimento de <i>H. pylori</i>	47
4.1.2 Influência do sal (NaCl) na atividade antimicrobiana da amoxicilina	48
4.1.3 Influência do sal (NaCl) na atividade antimicrobiana da levofloxacina	48
4.2. Vinagre	49
4.2.1. Efeito do vinagre (ácido acético) no crescimento do <i>H. pylori</i>	49
4.2.2. CIM do vinagre	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e taxonomia

As primeiras observações de bactérias colonizando o estômago foram feitas por Rappin em 1881 e Bizzozero em 1893. Desde que essas primeiras observações foram apresentadas, uma grande variedade de bactérias móveis espiraladas vem sendo descritas (MURRAY et al., 2005).

Em 1896, Salomon notou bactérias espiraladas no estômago de cachorros, cães e ratos Noruegueses. Em 1906, Balfour demonstrou a existência de espiroquetas localizadas em úlceras gástricas de cães e macacos (MURRAY et al., 2005).

Em 1938, Doengues realizou o primeiro estudo sistemático sobre a presença de bactérias helicoidais no estômago. Além de detectar espiroquetas em macacos, este autor descreveu posteriormente microrganismos similares associados à gastrite em estômagos humanos obtidos mediante necropsia (BARBOSA, 2006).

Em 1951, um médico espanhol, Solano, recomendou a administração de soro e penicilina aos pacientes convalescentes de úlcera duodenal ou gástrica, e insistia com a necessidade de se ter uma boa higiene dental, por considerar os focos sépticos dentais os responsáveis pelas úlceras recidivantes. Alguns autores sugeriram que as bactérias vistas por alguns investigadores em biópsias gástricas eram secundárias a contaminação bacteriana proveniente da cavidade oral, levada ao estômago através da comida. Durante as décadas de 1960 e 1970, a presença de bactérias espiraladas no estômago foram atribuídas a contaminantes procedentes da cavidade oral (BARBOSA, 2006).

Em 1979, Warren observou pela primeira vez, através de estudos histológicos em biópsias gástricas, a existência de uma bactéria em pacientes com gastrite crônica ativa e úlcera péptica. Para descartar a possibilidade de que as bactérias observadas fossem comensais e não

patógenos, o pesquisador examinou 20 casos de pacientes com histologia gástrica normal, onde não foram vistas células inflamatórias e bactérias (PAJARES; GISBERT, 2006).

Em 1981, Marshall iniciou sua colaboração ao estudo de Warren realizando técnicas de cultivos que permitissem o isolamento da bactéria. A bactéria encontrada era bastante parecida com *Campylobacter*, por conta disso, elegeram o meio e o tempo de incubação utilizados para o isolamento desta bactéria, contudo, sem sucesso. Fortuitamente, os pesquisadores conseguiram isolar a bactéria após a incubação acidental de 4 dias, reconhecendo que era necessário um longo período de incubação para o isolamento (PAJARES; GISBERT, 2006).

Em 1983, por não entrarem em acordo quanto à redação das informações obtidas com o estudo, duas cartas foram enviadas separadamente por Warren e Marshall a revista *Lancet*. Warren descreveu a presença de bactérias curvas e espiraladas, em 135 biópsias gástricas aderidas às células do epitélio e as áreas de inflamação da mucosa gástrica, com distribuição contínua, focal e abundante no antro gástrico. Por suas características morfológicas recordarem mais *Campylobacter jejuni* que espiroquetas, Warren denominou estes microrganismos presentes na mucosa gástrica de *Campylobacter like* (WARREN, 1983). Marshall, em sua carta, descreveu o cultivo da bactéria procedente de biópsias gástricas, depois de 3-4 dias de incubação utilizando técnicas de isolamento para *Campylobacter*, bem como suas características microbiológicas e bioquímicas. Contudo, sempre considerando que as bactérias não se adaptavam claramente ao gênero *Campylobacter* e que poderiam corresponder ao gênero *Spirillum*. Este autor preconizou que o microrganismo deveria desempenhar um importante papel na patogenia da gastrite, úlcera gástrica e câncer gástrico (MARSHALL, 1983).

Em 1983, Skirrow sugeriu que estas bactérias deveriam receber a denominação de *Campylobacter pyloridis* por sua colonização preferencial próxima ao piloro. Esta nomenclatura foi depois revisada para se adaptar as regras gramaticais sendo substituída pela palavra *pylori* (PAJARES; GISBERT, 2006).

Em 1984, Marshall ingeriu estes microrganismos no sentido de demonstrar os postulados de Koch. O pesquisador pretendia mostrar o quadro de gastrite com sintomatologia clássica, achados anatomopatológicos, microbiológicos e terapêuticos que eram necessários para demonstrar o efeito patogênico destas bactérias (EGAN; O'MORAIN, 2007).

Em 1989, estudos liderados por Goodwin, identificaram através da ultraestrutura evidências de que o *Campylobacter pylori* pertencia a um gênero diferente. Exaustivas análises de atividades enzimáticas, características de crescimento e hibridização de ácido nucléico e sequenciamento de 16S RNAr demonstraram que *C. pylori* era realmente um membro diferente

que não pertencia ao gênero *Campylobacter* por apresentar características morfológicas, estruturais e bioquímicas semelhantes ao gênero *Helicobacter*. Por conta disso, o organismo foi reclassificado para este novo gênero, *Helicobacter*, sendo excluído do gênero anterior (PAJARES; GISBERT, 2006).

Taxonomicamente *Helicobacter pylori* foi classificado como uma bactéria pertencente ao filo Proteobacteria, ordem dos Campylobacterales e família Helicobacteraceae (GOODWIN et al., 1989).

Diferentes espécies do gênero *Helicobacter* foram isoladas do estômago de humanos e outros mamíferos (macacos, cães, gatos, chitas, furões, camundongos e ratos). O trato intestinal também é colonizado por *Helicobacter*, incluindo *Helicobacter cinaedi* e *Helicobacter fennelliae*, que foram isolados em homens homossexuais com proctite, proctocolite ou enterite (MURRAY et al., 2006).

Em 2005, Warren e Marshall foram merecidamente reconhecidos e agraciados com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela extraordinária e inesperada descoberta de que a gastrite bem como as úlceras duodenais e gástricas eram resultantes de uma infecção do estômago provocada por *H. pylori* (AHMED, 2005).

A descoberta dessa bactéria provocou mudanças conceituais profundas no entendimento das enfermidades gastrointestinais. Marshall tirou todas as dúvidas existentes e questionadas pelos pesquisadores que até então achavam que nenhuma bactéria era capaz de sobreviver no ambiente ácido do estômago. A consistência dos fatos apresentados mostrando a relação do *H. pylori* com gastrites, úlceras gástricas e duodenais, carcinomas e linfomas gástricos, também proporcionou o uso de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas.

H. pylori constitui, hoje, uma vasta fonte de pesquisa em diversos campos investigativos. Estudos sobre os mecanismos de transmissão, prevalência, resistência a drogas antimicrobianas, novas alternativas terapêuticas e desenvolvimento de vacinas são necessários e bastante promissores.

1.2. Características morfológicas, culturais e tintoriais

Helicobacter pylori é um bacilo Gram negativo encurvado ou em espiral medindo aproximadamente 0,6 μm de largura e 1,5 μm de comprimento (MARSHALL, 2002). À microscopia óptica apresenta de cinco a seis flagelos monopolares embainhados (DUNN et al., 1997). São bactérias não esporuladas, móveis e que podem formar corpos cocóides ou esferóides quando submetidos a culturas prolongadas (KUSTERS et al., 1997). A forma cocóide não se

adere às células epiteliais e não induz a produção de interleucina. A conversão da forma espiral para a cocóide se dá diante de condições adversas: aerobiose, pH alcalino, alta temperatura, incubação prolongada, exposição a concentrações altas de oxigênio, tratamento com inibidor de bomba de próton, antibióticos, óxido nítrico, etc. Acredita-se que a forma cocóide seja uma forma de resistência capaz de suportar condições ambientais adversas (COLE et al., 1997). Alguns estudos fracassaram no sentido de cultivar as formas cocóides, *in vitro*, sendo estas consideradas viáveis, mas não cultiváveis (EATON et al., 1995; KUSTERS et al., 1997; BRENCIAGLIA et al., 2000).

Histologicamente, o microrganismo pode ser observado através de diversas colorações como Giemsa, hematoxilina-eosina Warthin-Starry, Steiner e carbofucsina. A análise histopatológica tem especificidade e sensibilidade altas permitindo avaliar o tipo e intensidade da inflamação na mucosa gástrica (ROCHA, 1996). A bacterioscopia pelo método de Gram, utilizado para identificação presuntiva, permite a verificação da morfologia da bactéria a partir da cultura (QUEIROZ et al., 1987).

H. pylori é uma bactéria microaerófila. O sucesso do cultivo requer uma atmosfera úmida mantida a 37°C com reduzidos níveis de oxigênio (5 a 10%) e elevados níveis de dióxido de carbono (7-12%) juntamente com um período de incubação prolongado (3-5 dias) (BURY-MONÉ et al., 2006). As colônias formadas são circulares, convexas, translúcidas e não apresentam hemólise. A identificação após a cultura deve ser feita com base na morfologia da colônia, coloração de Gram e provas bioquímicas positivas para urease, catalase e oxidase (NDIP et al., 2003).

H. pylori é uma bactéria muito adaptada ao seu habitat, fastidiosa e de crescimento lento, sendo assim muito difícil cultivá-la *in vitro* (QUEIROZ et al., 1987). O isolamento primário pode ser afetado por vários fatores como o número de biópsias, o meio, a duração e a temperatura do transporte e o próprio meio de cultura. A cultura é o método mais sensível para a identificação da bactéria e o único que permite a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos (MEGRAUD et al., 1999). Vários meios de cultura como Brain Heart Infusion (BHI) agar, Brucella agar, Columbia agar ou Skirrow's agar suplementados com sangue de cavalo, soro de cavalo, ou sangue de carneiro têm sido usados para o cultivo de *H. pylori*. A adição de agentes antimicrobianos torna os meios seletivos e facilita o isolamento da bactéria onde há presença de bactéria e fungos contaminantes (HOLTON, 1999). São poucos os centros no Brasil que trabalham com essa técnica diagnóstica, que é cara, e requer laboratório

especializado. Na verdade, a técnica tem sido utilizada apenas no âmbito de pesquisa (SIQUEIRA, 2007).

No Brasil, o uso de um novo meio de cultura indicador, denominado Belo Horizonte, foi proposto para reconhecimento de colônias e identificação presuntiva de *Campylobacter pylori*. O diferencial deste meio foi a adição ao BHI agar, suplementado com sangue de carneiro e agentes antimicrobianos, de 2,3,5-cloreto de trifenilterazólio (TFT). O agente confere às colônias um aspecto brilhante, translúcido e dourado facilitando a identificação bacteriana (QUEIROZ et al., 1987). O meio Belo Horizonte (BHM) é bastante reconhecido e utilizado pela comunidade científica também para o isolamento de *H.pylori*.

1.3. Patogênese e mecanismo de virulência

H. pylori é uma bactéria que coloniza de maneira crônica o epitélio gástrico e infecta aproximadamente a metade da população mundial. Este patógeno é responsável por gastrites crônicas, úlceras pépticas e sua presença está relacionada à ocorrência de câncer gástrico. Possui capacidade de aderência, possuindo afinidade pelas células mucíparas. A resistência ao ácido clorídrico é de vital importância na patogênese do *H. pylori*, visto que, sem este atributo biológico, a bactéria não teria condições de colonizar a mucosa gástrica. A enzima urease, que é uma proteína de alto peso molecular (500 a 600 KDa), atua promovendo a hidrólise da uréia, presente em condições fisiológicas no suco gástrico, levando à produção de amônia. Esta atua como receptor de íons H^+ , gerando pH neutro no interior da bactéria, o que confere ao *H. pylori* resistência à acidez gástrica. Desta maneira a bactéria fica protegida dos efeitos deletérios do pH ácido do estômago (MONTECCUCO et al., 2001).

Um estudo recente realizado por Maeda et al. (2007) mostra a formação de biofilmes de *H. pylori* na mucosa gástrica através de biópsias de indivíduos com teste da urease positivo. A aderência da bactéria às células epiteliais gástricas garantiria o fornecimento de nutrientes e moléculas essenciais ao desenvolvimento da doença.

As manifestações da infecção por *H. pylori* dependem da complexa interação entre o hospedeiro e a bactéria. Vários fatores estão relacionados com a agressividade e, portanto, ao dano sobre epitélio. Dentre estes fatores podemos destacar a síntese de várias enzimas (urease, catalase, lipase, fosfolipase e proteases) e a produção de toxinas. A urease é a enzima mais importante produzida pelo *H. pylori* sendo capaz de hidrolizar a uréia presente no suco gástrico. A hidrólise promovida pela enzima gera um pH neutro no espaço interno da bactéria tornando-a resistente ao ácido clorídrico e, portanto, aos efeitos deletérios provocados por este (RADOSZ-

KOMONIEWSKA et al., 2005). Outras enzimas produzidas conferem resistência à bactéria contra radicais tóxicos produzidos pelas células de defesa do hospedeiro (OLIVARES; GISBERT, 2006).

A primeira toxina descrita foi a toxina vacualizadora (VacA) codificada pelo gene *vacA*. Está presente em todas as cepas de *H. pylori* podendo apresentar polimorfismo (SWERBAUM; MICHETTI, 2002). A toxina VacA facilita a entrada de uréia e nutrientes para o interior da bactéria e causa efeitos deletérios sobre as células do hospedeiro. Outro fator de virulência bastante estudado é o gene associado à citotoxina (*cagA*), sendo considerado marcador de cepas que conferem um risco aumentado para doenças péptico-ulcerosas e carcinomas gástricos. A proteína CagA é codificada pelo gene *cagA* caracterizando a chamada “ilha de patogenicidade” (BLASER; ATHERTON, 2004). Outros fatores de virulência têm sido considerados, porém ainda sem nenhuma comprovação clara de efetiva relação com diferentes evoluções clínicas. Dentre os mais investigados, podemos citar a presença de adesinas (BabA2), os genes *iceA* e seus variantes (*iceA1* e *iceA2*) e o gene *oipA* (MAEDA; MENTIS, 2007). Evidências de que as espécies de *H. pylori* são geneticamente diferentes são cada vez maiores. Esta diversidade genética está associada aos tipos de agressividade e, portanto, a uma maior ou menor inflamação na mucosa gástrica e diferentes prognósticos dos indivíduos infectados. O genoma de *H. pylori* consta mais de 1000 genes conservados e específicos de certas cepas, contudo, a bactéria pode adquirir ou perder DNA exógeno, ou ainda, sofrer mutações permitindo uma grande variabilidade genética podendo gerar cepas adaptadas a diversos ambientes (OLIVARES; GISBERT, 2006).

A estrutura espiralada da bactéria permite sua introdução na camada de muco gástrico. A motilidade, gerada pelos flagelos, também funciona como fator de virulência (COVACCI et al., 1999). Os flagelos são cobertos por uma camada lipoprotéica que confere proteção contra os ácidos gástricos.

Estas características estruturais e bioquímicas permitem a perda da proteção da mucosa gástrica que juntamente com a liberação de citocinas e o processo inflamatório crônico levam a formação de gastrites, úlceras, carcinomas e linfomas de baixo grau do tipo MALT (OLIVARES; GISBERT, 2006).

1.4. Epidemiologia

O gênero *Helicobacter* é composto de mais de 20 espécies que compartilham propriedades comuns. Espécies de *Helicobacter* têm sido isoladas do trato gastrointestinal e

hepatobiliar de mamíferos e pássaros. Isolados de *Helicobacter* de origem gástrica habitam primariamente o estômago e podem localizar-se no fundo e no corpo, mas é principalmente no antro gástrico onde se encontram em maior densidade (MURRAY et al., 2006). O *H. pylori* localiza-se no interior ou sob a camada de muco adjacente ao epitélio gástrico e raramente alcança a corrente sanguínea. O *H. pylori* pode distribuir-se de maneira focal, segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica (BLASER; BERG, 2001). Estes microrganismos também podem ser encontrados transitoriamente em áreas de metaplasia gástrica do duodeno, saliva, vômitos e fezes (DUNN et al., 1997).

Evidências sugerem que a transmissão entre humanos é principalmente oral-oral e oro-fecal (FRENCK JR.; CLEMENS, 2003). A transmissão interpessoal é, entretanto, considerada a mais importante, conforme evidenciado em estudos com famílias que moravam em condições de aglomeração (ROMA-GIANNIKOU et al., 2003). Outros estudos relatam casos de contaminação sexual pela via oral-anal, além de casos mais raros com transmissão por meio da endoscopia (ESLICK, 2001; LEHOURS; YILMAZ, 2007). A transmissão oral-oral é explicada pela freqüente presença de *H. pylori* na cavidade oral de indivíduos infectados (SIAVOSHI et al., 2005). O *H. pylori* tem sido isolado freqüentemente da placa dental, saliva e vômito (MARSHALL, 2002). A presença desta bactéria está associada à baixa condição socioeconômica, maior densidade de moradia, baixo nível educacional, baixas condições de saneamento básico e fatores dietéticos (JÚNIOR, 2003).

Estudos de prevalência da infecção por *H. pylori* mostram-se diferentes entre as populações de diversos países. Podendo variar entre as áreas geográficas de um mesmo país e também em relação à idade e grupo étnico. Os modos de transmissão podem variar entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento, sendo ainda as condições socioeconômicas determinantes na aquisição de infecção por *H. pylori*. (QUEIROZ; LUZZA, 2006).

Aproximadamente 50% da população mundial está infectada com *H. pylori*, sendo que o mesmo indivíduo pode se infectar por diferentes cepas (LEE et al., 2005). Esse índice é ainda maior quando consideramos indivíduos de uma mesma família devido ao modo de contágio que inclui contato íntimo, uso de talheres, copos, etc. (KODAIRA et al., 2002).

Felizmente, apenas uma minoria dos indivíduos infectados desenvolve gastrites, úlceras ou tumores, mostrando que essas doenças são multifatoriais e que há certamente uma predisposição genética do hospedeiro e influência de fatores ambientais. O risco de infecção ao longo da vida em pessoas que vivem em países desenvolvidos é de 25 a 50%, portanto, esse

índice pode ser de até 90% no caso de países em desenvolvimento onde mais de 50% da população está infectada aos 10 anos de idade (SUERBAUM; MICHETTI, 2002).

No Brasil, um estudo realizado em crianças e jovens até 18 anos, de famílias de baixa renda, evidenciou um percentual de soropositividade de 34% que aumentava com a idade (BEDOYA et al., 2003).

Segundo estudo realizado por Rodrigues et al. (2005), a prevalência da infecção em comunidades pobres do Brasil é alta. Sugerindo também que a infecção é adquirida predominantemente na infância. Outro estudo também realizado por Rodrigues et al. (2005) avaliou a prevalência da infecção por *H. pylori* em Fortaleza, no estado do Ceará. *H. pylori* foi detectado em 62,9% da população estudada com aumento significativo da prevalência em relação à idade.

O estudo realizado por Santos et al. (2005), no Sudeste do Brasil, indicou prevalência da infecção de 63,4% e mostrou que a condição socioeconômica está significativamente associada com a infecção pela bactéria.

Em um estudo mais recente realizado com doadores de sangue, sem sintomas de infecção por *H. pylori*, mostrou prevalência da infecção de 66,5% entre os homens e 63,2% entre as mulheres. Essa prevalência aumentava com a idade e era mais elevada em indivíduos não-brancos. Ambos os fenômenos foram independentes do gênero. O estudo também confirmou que as condições sócio-econômicas, sanitárias e o nível educacional influenciam na prevalência da infecção por *H. pylori* (ZATERKA et al., 2007).

1.5. Fatores de risco para a infecção pelo *H. pylori*

Praticamente todos os estudos têm demonstrado que existe uma relação inversa entre a infecção por *H. pylori* e a condição socioeconômica ou o nível de educação. Vários estudos sugerem que um baixo nível socioeconômico durante a infância pode ser um indicador de risco para infecção por *H. pylori*. Outro fator de risco é a história familiar ou hereditariedade. O sexo parece não interferir na prevalência da infecção (SHERMAN et al., 2002; FRENCK; BEDOYA et al., 2003; CLEMENS, 2003).

Ser profissional da área de saúde, tal como enfermeiro, médico endoscopista ou dentista constitui um fator de risco por estes profissionais estarem em contato com pacientes infectados (QUEIROZ; LUZZA, 2006). O consumo de álcool, tabaco e fármacos antiinflamatórios parece não está associado a um aumento da prevalência da infecção pelo *H. pylori*. Ter cônjuge infectado também não constitui fator de risco (MALATY; NYREN, 2003).

1.5.1. A dieta como fator de risco para o câncer gástrico

O *H. pylori* constitui um fator de risco forte para o câncer gástrico, contudo, não é suficiente para promover a doença. Estudos epidemiológicos de caso-controle mostram fatores ligados à dieta que podem influenciar no aparecimento deste tipo de câncer. Uma alimentação pobre em vitaminas A e C, carnes e peixes, ou ainda com um alto consumo de nitrato, alimentos defumados, enlatados, com corantes ou conservados no sal são fatores de risco para o aparecimento de câncer gástrico (TSUGANE; SASAZUKI, 2007).

O sal, composto de 40% de sódio e 60% de cloreto, está envolvido em diversas funções do corpo. É um mineral bastante importante na regulação dos fluidos corpóreos e na transmissão de impulsos nervosos e musculares. A ingestão diária de 0,5g de sal é suficiente para a manutenção das funções vitais. Por ter propriedades importantes como a de aumentar a durabilidade dos alimentos, impedir a proliferação de microrganismos, dar gosto e realçar o sabor de outros ingredientes, o sal vem sendo utilizado com maior frequência pelas indústrias alimentícias. Por conta disso, esse mineral é cada vez mais adicionado aos produtos provocando um aumento na sua ingestão. Os hábitos populacionais, com frequentes refeições em cantinas e restaurantes, também exercem influência nesse consumo exagerado. Cerca de 76% do sal que ingerimos é proveniente dos alimentos processados, 5% é encontrado naturalmente no alimento e 19% é adicionado durante o processo de cozimento. A ingestão de sal torna-se cada vez mais inconsciente, alimentos essenciais e considerados saudáveis em uma dieta tais como pães e cereais, podem conter uma quantidade excessiva de sal que possa prejudicar a saúde (GILBERT; HEISER, 2005).

Por estar sendo consumido em quantidade superior a necessária para o bom funcionamento do corpo, o sal vem sendo responsável por diversas doenças. Hoje, o sal está imputado como um fator que lesa a mucosa gástrica, causando sua atrofia, facilitando a ação de agentes genotóxicos e de carcinógenos (NGOAN; YOSHIMURA, 2003). A ingestão excessiva de sal realça a colonização do *H. pylori* podendo modificar e alterar o risco de câncer. Portanto, a associação de uma dieta rica em alimentos salgados e a presença de *H. pylori* no estômago pode afetar significativamente a ocorrência de processos carcinogênicos (SUN et al., 2006).

As alterações gástricas promovidas pelo sal têm chamado à atenção da comunidade científica. Estudos experimentais com ratos mostraram que a ingestão de sal está associada à gastrite e a exacerbação dos efeitos carcinogênicos, pelo *H. pylori*, por romper a barreira protetora da mucosa gástrica ocasionando inflamação com lesões erosivas e degenerativas de forma difusa ao longo do epitélio gástrico (TSUGANE, 2005).

1.6. Tratamento

Ainda não existe um esquema terapêutico ideal. São vários os antimicrobianos usados no tratamento da infecção por *H. pylori*, em várias associações e tempos diversos. Os modernos esquemas terapêuticos combinam potentes drogas anti-secretoras da família dos inibidores de bomba de próton (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rebeprazol, e esomeprazol) com antibióticos (amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina, e furazolidona). A duração do tratamento varia de 7-14 dias. Apesar de existirem diversos medicamentos para a eliminação do patógeno nem sempre as terapias são bem sucedidas. Os esquemas de tratamento, apesar de serem eficazes, têm apresentado falhas, pois um pequeno número de pacientes não respondem ao tratamento (MEGRAUD et al., 1999).

Analisando os esquemas terapêuticos de erradicação do *H. pylori*, observamos na literatura que a resistência a claritromicina implica em falha no tratamento, o mesmo acontecendo no caso de resistência ao metronidazol (LEE et al., 2005).

As infecções recidivantes por *H. pylori* são intrigantes para os médicos e têm sido alvos de inúmeros testes clínicos nos últimos 10 anos. A prevalência da resistência pelo *H. pylori* vem apresentando crescimento significativo, mudando geograficamente e dinamicamente, requerendo monitoramento constante (DZIERZANOWSKA-FANGRAT et al., 2005).

O aumento da resistência aos antimicrobianos tem proporcionado novas linhas de pesquisa onde sejam buscadas novas alternativas de tratamento, particularmente as não-tóxicas, naturais e menos dispendiosas. Alguns estudos têm mostrado propriedades antibacterianas de vegetais e extratos de plantas mostrando que os pacientes podem vir a se beneficiar dessas novas alternativas terapêuticas (BYTZER; O'MORAIN, 2005).

1.7. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos

A utilização de produtos naturais pelo homem é tão antiga quanto sua própria história. Seu uso se dava tanto para fins nutricionais como para fins terapêuticos. O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo. Diferentes culturas dos mais distintos lugares, desenvolvidos ou não, conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças, práticas estas que acompanham o homem desde a pré-história e que evoluíram com ele ao longo dos anos primitivos (ARAÚJO; LEON, 2001).

Os mais antigos relatos sobre o uso de produtos naturais estão presentes nos sâncritos dos Ayurverdas datados há mais de 2.000 a.C. Tais manuscritos falam de finos óleos, perfumes e incensos usados para a adoração de deuses. No século XII, durante o período das Cruzadas, o conhecimento sobre plantas, especiarias e perfumes difundiu-se do Oriente Médio para a Europa (MARQUES, 2007).

Em diversos países o uso de plantas medicinais vem sendo legalizado e reconhecido. A China usa o conhecimento popular das ervas há cinco séculos, com mais de 5 mil espécies utilizadas. As tradições populares do uso de plantas medicinais no Brasil guardam elementos de várias culturas e representam um importante ponto de encontro entre permanências e rupturas culturais, estabelecidas desde os primeiros contatos inter-tribais (povos nativos), e consolidadas no entrecruzamento das principais matrizes presentes no processo de formação do povo brasileiro. Ao longo do tempo em que se estreitou o contato com as sociedades ocidentais, o conhecimento fitoterápico do povo brasileiro passou a incorporar saberes e práticas civilizadas, oriundas principalmente da medicina européia. Assim, as culturas européias vieram somar novos conhecimentos e novas práticas a este universo. Ao longo dos séculos XVI, XVII e XVIII, espanhóis, portugueses e ingleses, holandeses e franceses, entre outros mantiveram contato com o território brasileiro difundindo seus conhecimentos e contribuindo para a diversificação no conhecimento sobre as plantas medicinais (SANTOS, 2000).

Neste período as missões religiosas desempenharam papel preponderante em relação à difusão do conhecimento europeu entre os nativos. Dentre essas missões destacou-se a Companhia de Jesus, formada em 1540, por iniciativa de Inácio de Loyola, e que se configurou como uma ordem-modelo de um novo momento da cristandade na Europa (CALAINHO, 2005).

Além de trabalharem incansavelmente na difusão da fé cristã, os jesuítas também foram uma grande âncora da saúde no Brasil. A escassez de médicos formados por escolas de medicina na Europa fez dos jesuítas os responsáveis quase que exclusivos pela assistência médica no primeiro século de colonização do Brasil, além de serem exímios observadores da fauna e da flora brasileira, identificando várias espécies e cultivando as de efeitos curativos (CALAINHO, 2005).

Os produtos de origem natural, especialmente as plantas, são considerados uma fonte alternativa de medicação. A grande diversidade vegetal do território brasileiro, onde é possível encontrar diversas plantas medicinais, tornou comum a prática da fitoterapia. As práticas populares sobre o uso e a eficiência de fitoterápicos continuam em alta até hoje e têm despertado o interesse de muitos pesquisadores. As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no

cuidado da saúde tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (BASTOS, 2007).

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer até aos microrganismos patogênicos. As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina. Nota-se nos últimos anos que o interesse em trabalhar com fitoterapia tem ressurgido. Na última década, registrou-se um aumento expressivo no interesse em substâncias derivadas de espécies vegetais, evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (CALIXTO, 2000).

Dentre os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas estão a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais e a resistência das bactérias as drogas com fins terapêuticos. O grande problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antimicrobianas, incerta (NASCIMENTO et al., 2000). Tendo em vista que as bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos (PEREIRA et al., 2004).

Além das propriedades terapêuticas, as plantas medicinais também contêm princípios ativos responsáveis por intoxicações e reações adversas que podem aparecer devido ao seu emprego em doses inadequadas e por tempo prolongado. A falta de informação objetiva e atualizada sobre os possíveis riscos e benefícios que o uso de plantas medicinais pode provocar, é um dos principais fatores que contribui para a automedicação da população com ervas, alegando que estas são inócuas e mais seguras, pelo simples fato de serem naturais (BASTOS, 2007).

Com o aumento de microrganismos resistentes às drogas antimicrobianas já conhecidas, vários extratos de plantas medicinais já foram testados, com finalidade de se procurar novas drogas com atividades antimicrobianas reconhecidas (BASTOS, 2007).

Os principais produtos de origem vegetal com atividade antimicrobiana são os extratos, as frações látex, os óleos essenciais e as proteínas de origem vegetal (MARQUES, 2007).

Os extratos são produtos obtidos pelo tratamento de substâncias vegetais, por um solvente apropriado, o qual é evaporado até a consistência desejada. O emprego de extratos

vegetais de conhecida atividade antimicrobiana está adquirindo cada vez mais importância nos tratamentos terapêuticos. Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos, em diferentes países, para comprovar a eficácia dessas substâncias (COUTINHO et al., 2004; NASCIMENTO, et al., 2000).

Stamatis et al. (2003), realizaram um estudo com extratos de 70 plantas gregas comercializadas e usadas tradicionalmente na medicina popular contra distúrbios gástricos, incluindo úlceras pépticas. Os extratos de *Anthemis melanolepis*, *Cerastium candidissimum*, *Chammomilla recutita*, *Conyza albida*, *Dittrichia viscosa*, *Origanum vulgare* e *Stachys alopecuros* mostraram atividade contra uma cepa clínica e 15 isolados clínicos de *H. pylori*.

Uma das formas mais simples do uso de extratos vegetais para fins medicinais é o extrato bruto. Nariman et. al. (2004), apresentaram uma seleção de extratos de plantas iranianas com atividade antimicrobiana contra *H. pylori*. As espécies *Glycyrrhiza aspera*, *Juglans regia*, *Ligustrum vulgare*, *Thymus kotschyanus*, *Trachyspermum copticum* e *Xanthium brasiliicum* foram efetivas na inibição da bactéria.

O extrato alcoólico de própolis a 50% foi avaliado por Vargas et al. (2004) frente a 161 cepas de bactérias, sendo 81 Gram-positivas e 80 Gram-negativas, obtendo atividade *in vitro* em 67,7% das amostras, sendo mais efetivos nas Gram-positivas do que em Gram-negativas. Estudos recentes, *in vivo*, realizados por Coelho et al. (2007) mostraram que a própolis é capaz de inibir o crescimento de *H. pylori*.

Cerca de 50 extratos de plantas utilizadas na medicina popular de Taiwan tiveram sua atividade contra *H. pylori* investigada. Os resultados mostraram que *Plumbago zeylanica* L. tinha um alto poder inibitório frente à bactéria (WANG; HUANG, 2005).

Durante os séculos XVI e XVII, os óleos essenciais receberam suas primeiras aplicações e sua introdução no comércio. A partir daí, a aromaterapia (terapia alternativa, onde o óleo essencial é utilizado para reequilibrar disfunções físicas, emocionais e energéticas) cresceu rapidamente ao redor do mundo e no século XVIII, vinagres aromáticos e águas perfumadas tornaram-se bastante populares. O emprego de óleos essenciais tem duas grandes áreas de atuação: em nível fisiológico, uma vez que as substâncias constituintes são absorvidas pelo organismo por via oral, cutânea, respiratória e injetável e em nível psicológico, onde os óleos essenciais atuam sobre o estado emocional e mental, trazendo equilíbrio pela estimulação ou sedação (BASTOS, 2007).

Com o desenvolvimento da indústria química, os óleos sintéticos começaram a ser produzidos em grande escala, tornando-se mais acessíveis economicamente (Simões et al., 1999). Dessa forma, pesquisas demonstravam que os óleos essenciais, que são constituídos por um

conjunto de substâncias, apresentavam uma melhor atividade terapêutica do que a substância isolada que representa seu principal constituinte, por exemplo: o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* tem atividade anti-séptica maior do que o seu principal constituinte ativo isolado, o cineol ou eucaliptol, que representa 80% da sua composição (LA CRUZ, 2005).

O termo óleo essencial é utilizado de maneira geral para designar líquidos voláteis dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraído de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais freqüente a destilação por arraste de vapor d'água (BARBOSA, 2003). Simões et al., (1999) definiram óleos essenciais como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas.

A composição química dos óleos essenciais contidos em diferentes espécies é bastante complexa e sofre influência tanto do material genético da planta (variedade vegetal), quanto das condições de cultura e desenvolvimento (tipo de solo e clima), assim como da colheita e processamento pós-colheita. São constituídos principalmente de terpenos, sesquiterpenos, ésteres, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos. Em sua composição também são encontrados antibióticos, vitaminas, hormônios e anti-sépticos e sua natureza volátil os diferencia dos óleos graxos. Eles podem ter ação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas e ainda contra leveduras e fungos filamentosos (BASTOS, 2007).

Embora a composição do óleo essencial de uma planta seja geneticamente determinada, sendo em geral específica para um determinado órgão e característica para o estágio de desenvolvimento da planta, as condições ambientais são capazes de causar variações significativas. A ocorrência de quimiotipos ou raças químicas é freqüente em plantas ricas em óleos essenciais. Este termo é usado para designar plantas botanicamente idênticas, mas que diferem quimicamente (BARBOSA, 2003).

Um estudo realizado por Bergonzelli et al (2003) identificou 16 óleos essenciais disponíveis comercialmente que apresentavam atividade anti-*Helicobacter*, *in vitro*. Os constituintes puros de alguns desses óleos essenciais tiveram sua atividade antimicrobiana investigada. Carvacrol, isoeugenol, nerol, citral e sabineno mostraram um forte poder de inibição de *H. pylori*.

Ohno et al. (2003) realizaram estudos, *in vivo*, com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (lemongrass) e observaram uma diminuição da densidade de *H. pylori* no estômago de ratos tratados com o óleo em relação ao grupo de ratos não-tratados, sugerindo que o óleo pode ter potencial como um novo e eficaz agente contra *H. pylori*.

A seguir serão descritas as plantas cujos extratos e óleos essenciais foram mais ativos neste trabalho: alfavaca, aroeira, erva-cidreira e macela.

1.8. Caracterização das plantas

1.8.1. Alfavaca

O gênero *Ocimum* L. compreende 30 espécies de distribuição tropical e subtropical. O gênero tem se destacado pela produção de óleos essenciais e muitas de suas espécies são utilizadas como medicinais, na culinária ou como repelentes de insetos. *Ocimum gratissimum* L. (Figura 1), planta conhecida popularmente no Nordeste brasileiro como “alfavaca”, “alfavaca-cravo” ou “alfavaca de caboclo”, possui, segundo a literatura, propriedades antifúngica, antibacteriana, antidiarréica, hipoglicemiante e antiinflamatória (AGUIYI et al., 2000; DUBEY et al., 2000; NAKAMURA et al., 1999; OFFIAH et al., 1999; COSTA FILHO et al., 2006).

A alfavaca é pertencente à família Lamiaceae caracterizando-se como um subarbusto aromático, ereto, com até 1 m de altura, originário do oriente e subespontâneo em todo o Brasil. Seu aroma é muito parecido com o cravo, daí o seu nome popular em algumas regiões como alfavaca-cravo. Este aroma agradável se deve à presença de um componente do seu óleo essencial, o eugenol, que está presente com uma concentração de até 70%. O eugenol, que também está presente no óleo essencial de cravo, possui excelentes qualidades terapêuticas sendo bastante utilizado por sua ação anti-séptica e analgésica. Atividade antibacteriana, frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também foi atribuída ao eugenol no estudo realizado por Nakamura, et al. (1999).



FIGURA 1 – *Ocimum gratissimum* L.

1.8.2. Aroeira

Myracrodruon urundeuva (Allemão) (Figura 2) é uma espécie florestal pertencente à família Anacardiaceae. É uma árvore de tronco alto, com altura de seis a quatorze metros, linheiro, podendo chegar a ter mais de 1 m de diâmetro, encimada por larga copa, formada de ramos flácidos. É utilizada para construção civil, esteios, dormentes, vigamentos, postes, obras hidráulicas, quase imputrescível ao contato do solo. A casca é balsâmica e hemostática, usada entre os sertanejos, como tônico e contra as doenças das vias respiratórias, do aparelho urinário, nas hemoptises e metrorragias. As folhas maduras são forrageiras. Cresce de preferência nos sopés e quebradas das serras litorâneas e nos tabuleiros praiheiros, vindo daí a denominação de aroeira da serra ou aroeira-do-sertão (LORENZI; MATOS, 2002).

Apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o México até a Argentina. No Brasil tem ocorrência desde o Ceará (caatinga) até o estado do Pará e Mato Grosso do Sul, sendo mais freqüente no nordeste do país, oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (LORENZI; MATOS, 2002).

A *M. urundeuva* é uma das plantas de uso ginecológico mais freqüente e mais antigo na medicina popular do Nordeste do Brasil (ligada à prática do “banho de assento” usada por muitas mulheres nordestinas no tratamento ginecológico pós-parto). A planta também é usada no tratamento de gastrites, úlcera gástrica e hemorróidas sendo considerada como um excelente antiinflamatório e cicatrizante tanto para adultos quanto para crianças (LORENZI; MATOS, 2002).

A parte usada da planta é a entrecasca (parte interna da casca, depois de retirada a parte de fora) e os brotos com até seis meses de crescimento obtidos a partir de sementes. A casca é muito rica em tanino e outras substâncias fenólicas mais simples. Contém, também, como substâncias ativas, flavonóides e duas chalconas diméricas, as urundeuvinas A e B, de forte ação antiinflamatória (BANDEIRA, 2002). Nesse trabalho, a folha foi a parte da planta submetida à

investigação. Existem poucos estudos realizados com o óleo essencial das folhas de *M. urundeuva* All. A verificação da atividade antibacteriana do óleo essencial foi proposta neste estudo.



FIGURA 2 - *Myracrodruom urundeuva* (Allemão)

1.8.3. Erva-cidreira

Lippia alba (Mill.) N.E.B. (Figura 3) é uma espécie pertencente à família Verbenaceae e no Brasil recebe várias denominações populares: chá-de-tabuleiro, cidrila, erva-cidreira-de-arbusto, alecrim-selvagem, cidreira-brava, falsa-melissa, erva-cidreira, erva-cidreira-brasileira, erva-cidreira-do-campo, cidreira-carmelitana, salva, salva-do-brasil, salva-limão, alecrim-do-campo, salva-brava e sálvia. É uma espécie subarborescente de morfologia variável, alcançando até um metro e meio de altura, raramente dois metros, nativa de quase todo território brasileiro (BARBOSA, 2003).

É uma planta típica de solos arenosos e úmidos de margens de rios e lagoas de todo o litoral brasileiro, sendo também muito cultivada para fins medicinais (BARBOSA, 2003).

O emprego de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae), na medicina popular é bastante difundido em farmacopéias populares de vários países do mundo, principalmente através das ervas-medicinais deste gênero, que em sua maioria são aromáticas e são utilizadas na produção de chás de sabor e aroma apreciável. As partes das plantas usadas, na maioria dos casos, para a preparação de chás de infusão ou decocção, são as folhas ou partes aéreas e flores (BARBOSA, 2003).

A espécie *L. alba*, ocupa um papel de destaque na medicina tradicional, sendo empregada no tratamento de 15 tipos de enfermidades, além de ser utilizada também na culinária. Pascual et al. (2001) descreveram os diversos usos tradicionais e atividades farmacológicas da espécie. Segundo o autor, *L. alba*, tradicionalmente, é utilizada como analgésica, antiinflamatória, antipirética, antiespasmódica, e também para distúrbios gastrointestinais e hepáticos, doenças respiratórias e de pele. Estudos farmacológicos comprovaram que a espécie tem atividade analgésica, antiinflamatória, antipirética, sedativa, antidiarréica, antimicrobiana, antiviral, citostática e anticonvulsivante (PASCUAL et al., 2001).

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *L.alba* foi investigada contra bactérias Gram-positivas. Todas as bactérias foram sensíveis, sendo o *S. aureus* inibido com a menor dose do agente antibacteriano (ALEA et al., 1996).

A investigação da atividade anti-*H. pylori* desta espécie foi baseada na utilização popular da planta no tratamento de distúrbios gastrointestinais e também por existirem estudos, *in vivo*, que mostram ação gastroprotetora de *L. alba*.



FIGURA 3 – *Lippia alba* (Mill.) N. E. B. quimiotipos I, II e III.

1.8.4. Macela

Egletes viscosa Less. é uma espécie pertencente à família Compositae. Existem três espécies de grande emprego na medicina popular como estomacais recebendo o nome de macela. *Chrysanthemum partenium*, *Achirocline latiroides* e *E. viscosa* L., que são respectivamente, macela do reino, macela do Brasil e macela da terra (Figura 4), que é a única erva silvestre existente no Nordeste do Brasil. Em Minas Gerais é conhecida como losna do mato; na Paraíba é chamada de macela do campo e no Peru, Botancella. Está distribuída na América intertropical (GUEDES, 2002).

Macela é descrita como uma pequena erva silvestre, amarga, aromática, anual, comum no Nordeste onde cresce abundantemente à margem de lagoas, açudes, cursos d'água, no começo do verão, após o baixar das águas. Suas folhas têm tamanhos diferentes e são muito recortadas. Os capítulos florais (cabecinhas) aparecem um a três meses após a estação chuvosa. Medem 3 a 6mm de diâmetro, são amargos, aromáticos e apresentam um anel de pequenas pétalas esbranquiçadas (lígulas) e uma parte central amarela (MATOS, 2002).

Infusões preparadas a partir dos capítulos florais (Figura 5) são empregadas, na medicina popular, no tratamento de gastrites, cólicas intestinais e males hepáticos (BEZERRA et al., 2003). Os capítulos florais ou cabecinhas, facilmente encontrados no mercado de ervas, podem ser usados na forma de chá ou tintura. O chá de emprego mais habitual é preparado na ocasião do uso (MATOS, 2002).

Alguns componentes químicos fixos e voláteis já foram identificados, mas seus princípios ativos ainda não foram completamente determinados. O acetato de trans-pinocarveíla é o responsável pelo cheiro característico da planta, ácido centipédico e a ternatina contribuem para o sabor amargo e para suas ações espasmolítica e protetora da mucosa gástrica (MATOS, 2002). Estudos anteriores com ternatina, mostraram que este flavonóide possui atividade no Sistema

Nervoso Central, anti-anafilática, anti-trombótica e antidiarréica. O óleo essencial isolado de *E. viscosa* foi estudado e mostrou possuir atividade antinociceptiva, anticonvulsivante e bactericida (GUEDES, 2002)

A atividade anti-*H. pylori* do extrato e óleo essencial de *E. viscosa* L. foi investigada baseando-se no uso popular e em estudos prévios que mostravam atividade gastroprotetora da planta.



FIGURA 4 - *Eglletes viscosa* Less.



FIGURA 5 - Capítulos florais de *Egletes viscosa* Less.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- ✓ Avaliar a atividade *in vitro* de componentes da dieta, extratos e óleos essenciais do nordeste brasileiro sobre *Helicobacter pylori*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Observar a influência de componentes da dieta (sal, vinagre, pimenta e sumo de batata) no crescimento de *H. pylori*.
- ✓ Verificar a influência do sal (NaCl) no crescimento e morfologia do *H. pylori* e na sua sensibilidade a agentes antimicrobianos.
- ✓ Realizar uma triagem para verificação de plantas com potencial antimicrobiano frente à *H. pylori*.
- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos e óleos essenciais frente a uma cepa clínica e uma cepa padrão de *H. pylori*.
- ✓ Identificar dos constituintes químicos majoritários das plantas ativas contra *H. pylori*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas

Foram utilizadas no estudo uma cepa padrão (TX30A) proveniente da Universidade de Tennessee, USA, gentilmente cedida pelo Dr. Atherton e uma cepa clínica (536.01) proveniente do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) cedida gentilmente pelo Dr. Gifone Rocha do Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da mesma universidade. Testes de identificação foram realizados para a verificação de características morfológicas, bioquímicas e de crescimento. A microscopia da colônia foi verificada pela coloração através do método de Gram. Os testes bioquímicos utilizados na identificação das cepas foram oxidase, catalase e urease. O crescimento sob condições de microaerofilia também foi avaliado.

3.2. Componentes da dieta e material botânico

Os componentes dietéticos utilizados neste estudo foram o sal (Cloreto de sódio P.A.), o vinagre (ácido acético P.A.) e a pimenta. O critério de escolha dessas substâncias baseou-

se na utilização destes componentes, na forma de condimento, na dieta populacional de nosso estado.

A escolha do material botânico baseou-se na utilização popular das plantas, na forma de chás, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. As plantas analisadas foram cultivadas e coletadas do horto de plantas medicinais da Universidade Federal do Ceará (UFC). A identificação foi realizada pelo Doutor Francisco José de Abreu Matos, pesquisador da universidade responsável pelo horto. O quadro 1 mostra de forma simplificada as plantas medicinais escolhidas para a realização da triagem, destacando a forma usada e partes utilizadas dessas plantas.

QUADRO 1 – Plantas medicinais utilizadas nos testes antimicrobianos deste trabalho.

NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	FORMA USADA	PARTE UTILIZADA
<i>Anacardium occidentale</i>	Caju	Extrato etanólico	Pseudo-fruto
<i>Cróton zehntneri</i>	Canela-de-cunhã, canelinha	Óleo essencial	Folhas e ramos finos
<i>Caryocar coriaceum wittm</i>	Pequi	Óleo essencial	Fruto
<i>Egletes viscosa Less.</i>	macela, macela-do-campo	Extrato etanólico e óleo essencial	Capítulos florais

<i>Lippia alba</i> (Mill). <i>N.E.B.</i>	erva-cidreira, alecrim-selvagem	Extrato etanólico e óleo essencial	Folhas e ramos finos
<i>Mangifera indica</i>	Manga	Extrato	Fruto
<i>Myracrodrum urundeuva</i> (Allemão.)	Aroeira, aroeira- do-sertão	Óleo essencial	Folhas e ramos finos
<i>Ocimum spp.</i>	Alfavaca, alfavacão	Extrato etanólico e óleo essencial	Folhas
<i>Piper nigrum</i>	Pimenta preta	Extrato aquoso	Fruto
<i>Plectranthus grandis</i>	Boldo Grande	Extrato etanólico	Folhas

Fonte: LORENZI; MATOS, 2002.

3.3. Cultura

As cepas foram mantidas viáveis através de culturas em placas de Petri contendo meio Belo Horizonte (BHM). Este meio era constituído de Brain Heart Infusion (BHI) - ágar (DIFCO) acrescido de sangue desfibrinado de carneiro a 7%, vancomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) na concentração de 6mg/l, 20 mg/l de ácido nalidíxico (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), 500 mg/l de cicloeximida (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) e 40mg/l de 2,3,5-cloreto de trifenetrazólio (TFT) (Riedel, De Haën, AG Seelze, Hannover, Federal Republic of Germany). A inoculação em placa era realizada com auxílio de alça bacteriológica de platina. As placas, depois de serem inoculadas, eram levadas à estufa à 37° em jarra de microaerofilia contendo catalisador e envelope (microaerobac/PROBAC) gerador de atmosfera de microaerofilia (5% a 15% O₂/10% CO₂). A incubação inicialmente prosseguia por cinco dias. Após a abertura da jarra, caso não fosse verificado crescimento, o meio era suplementado com (BHI) caldo, a atmosfera geradora de microaerofilia era trocada e uma nova incubação era realizada por mais 5 dias (CUNHA, 2002).

3.4. Identificação e Conservação bacteriana

As cepas eram analisadas quanto às características morfológicas das colônias. Índícios de crescimento bacteriano eram visualizados pela presença de pequenas colônias arredondadas, translúcidas e brilhantes. Em seguida, eram realizados esfregaços em lâmina corados pelo método de Gram para visualização de estruturas características e também os testes da urease e oxidase (CUNHA, 2002).

A conservação era realizada com culturas novas (5 dias) obtidas na primeira abertura da jarra de microaerofilia. A partir da cultura, era preparada uma suspensão bacteriana em 1ml de BHI caldo suplementado com 25% de glicerol. A suspensão era distribuída em frascos para congelamento e congelada em freezer a -70°C (CUNHA, 2002).

3.5. Preparação e análise dos extratos vegetais

A preparação e a análise dos extratos vegetais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para a obtenção do extrato bruto, cerca de 50g das partes selecionadas das plantas foram submetidas à maceração e deixadas sob infusão em 100ml de etanol P.A. Esta mistura foi deixada por 24 horas em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Posteriormente, a infusão foi filtrada em papel de filtro, concentrada em rotaevaporador e submetida à secagem em banho-maria na temperatura de 40°C para evaporação do álcool etílico (MALEKZADEH et al., 2001).

Os extratos foram analisados por cromatografia em TCL Si gel (Merck-Germany) utilizando diferentes solventes: EtOAc-HCOOH-AcOH- H_2O (100:11:11:26, v:v), EtOAc-HCOOH-AcOH- H_2O (100:0,5:0,5:0,5:v:v), Et₂Otolueno-AcOH 10%(50:50:50, v:v). Tolueno-AcOEt (97: 3 v/v), n-BuOH-Me₂-Buffer Phosphate pH = 5,0 (40:50:10 v/v).

3.6. Extração e análise dos óleos essenciais

A extração e a análise dos óleos essenciais das plantas selecionadas foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da UFC e no Laboratório de produtos naturais da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação ou destilação com arraste de vapor d'água (Figura 6). O tempo de extração foi em torno de 2h para cada planta. Os óleos essenciais foram em seguida secos com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e mantidos em refrigerador até a análise (OLIVEIRA et al., 2006).

Os óleos essenciais foram analisados por RMN ^1H (Ressonância Magnética Nuclear ^1H) e CG/EM (Cromatografia Gasosa/ Espectrometria de Massas) com um instrumento Hewlett - Packard 5971 CG/MS equipado com uma coluna capilar de sílica fundida de dimetilpolisiloxano DB- 5 (30mm x 0,25 mm espessura do filme) e carregado com gás Hélio com um fluxo de $1\mu\text{L}/\text{min}$ e temperatura programada de $35^\circ\text{C} - 180^\circ\text{C}$ na velocidade de $4^\circ\text{C}/\text{min}$ e $180^\circ\text{C} - 280^\circ\text{C}$ na velocidade de $20^\circ\text{C}/\text{min}$. O injetor e detector foram mantidos a 250°C e 200°C , respectivamente. A identificação dos constituintes foi realizada por consulta aos bancos de dados de espectros do programa do aparelho (software), pelo índice de retenção (IK) e interpretação visual dos espectros de massa (ADAMS, 2001).



**3.7. Teste
de**

**da zona
inibição**

FIGURA 6 - Aparelho de destilação com arraste de vapor d'água

O teste da zona de inibição foi utilizado como método de triagem para a seleção de plantas com atividade antimicrobiana. A concentração analisada foi de 125 mg (0,125g) para os extratos etanólicos e 100% para os óleos essenciais (BERTINI et al., 2005) que foram dissolvidos em 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 3% (CELIKTAS et al., 2005).

Após a abertura da jarra e verificação de crescimento bacteriano, uma suspensão com turvação 2 (1×10^7 a 1×10^8 UFC/mL) na escala de McFarland era preparada em BHI caldo e inoculada em BHI agar contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro com auxílio de um “swab” estéril. Na placa contendo o meio de cultura foram feitos orifícios de 7mm de diâmetro e a estes adicionados o volume de $30\mu\text{l}$ dos extratos vegetais ou óleos essenciais a serem testados. As placas foram incubadas à 37° sob condições de microaerofilia por 48 horas. Depois do período de incubação, foi realizada a leitura com a verificação da formação de um halo de inibição ao

redor dos orifícios. O diâmetro dos halos foi mensurado com auxílio de uma régua e expressado em milímetros (WANG et al., 2005; CLSI, 2005).

3.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.8.1. Método de diluição em ágar

A determinação da CIM para o sal (NaCl), vinagre, sumo de batata, extratos vegetais e óleos essenciais de plantas foi realizada pelo método de diluição em ágar através da adição no meio de cultura de concentrações selecionadas, diluídas na razão 2, das substâncias a serem testadas. As concentrações de sal e vinagre analisadas variaram de 0,02-65,5 mg/ml e 0-32%, respectivamente. Para os extratos e óleos essenciais as concentrações selecionadas foram de 2,44 a 12,5mg/ml. O meio utilizado para o teste foi o BHI ágar contendo 10% de sangue de carneiro e 0,004% de TFT. A análise da CIM foi realizada conforme metodologia descrita por Magalhães et al, 2002.

O inóculo preparado consistia de uma suspensão bacteriana em salina com turvação equivalente a $2 (1 \times 10^7 \text{ a } 1 \times 10^8 \text{ UFC/mL})$ na escala padrão de McFarland. O inóculo (1-3 μ L por ponto) era semeado diretamente nas placas de diluição em ágar contendo as substâncias submetidas à avaliação. A incubação acontecia a 37°C por 48-72 horas em atmosfera de microaerófila produzida por sistema apropriado de geração de microaerofilia (envelope microaerobac/PROBAC) em jarra. O controle positivo consistia de uma placa sem a substância teste e o negativo continha água destilada no ponto de inoculação (CLSI, 2003).

Decorrido o tempo necessário à incubação sucedeu-se a leitura das placas incubadas. O crescimento obtido nas placas-controle sem substância teste foi comparado com o crescimento obtido nas placas com as substâncias testadas. A CIM para as cepas foi considerada como a menor concentração do antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento da cepa, ou quando se verificou a presença de uma colônia discreta no local da inoculação, ou ainda uma fina película de crescimento visível a olho nu (CLSI, 2003).

3.8.2. Epsilometer Test (E-test)

O método E-test para a verificação da possível influência do sal e dos óleos essenciais frente a antimicrobianos foi realizado conforme a metodologia descrita por WANG et al, 2003. Os antimicrobianos utilizados foram amoxicilina e levofloxacina. Foram escolhidas três concentrações (0,02, 1,0 e 65,5 mg/ml) para a realização do teste. Inicialmente foi preparado o inóculo consistindo de uma suspensão bacteriana em salina com turvação equivalente a $2 (1 \times 10^7$

a 1×10^8 UFC/mL).na escala de McFarland. A suspensão preparada foi inoculada nas placas contendo BHI agar suplementado com 7% de sangue de carneiro, por meio de um “swab” estéril embebido. As placas semeadas eram submetidas à secagem por 10 minutos para posterior aplicação da fita de E-test. As placas eram incubadas imediatamente em jarra de microarofilia a 37°C por 48-72 horas.

Após incubação, havendo crescimento visível, o valor da CIM era determinado a partir do ponto de intersecção entre o halo e a fita de E-test. Para a interpretação de valores da CIM no E-test em diferentes categorias de sensibilidade, utilizou-se o guia de interpretação para a CIM do último documento de diluição CLSI M100-S15.

3.9. Teste de crescimento em agar batata

As cepas de *H. pylori* foram submetidas ao crescimento em ágar batata sob várias condições. O ágar batata foi pesado, preparado e esterilizado conforme as exigências requeridas pelo fabricante e testado sobre as seguintes variações: ágar batata suplementado com 7% de sangue de carneiro desfibrinado, vancomicina, ac. nalidíxico, cloreto de trifeniltetrazólio (TFT) e cicloeximida, nas mesmas concentrações utilizadas para a composição do meio Belo Horizonte; ágar batata suplementado com 10% de sangue desfibrinado de carneiro e TFT; ágar batata com pH neutro (7,0); ágar batata com pH ácido (5,6). O meio Belo Horizonte foi utilizado como controle positivo.

4. RESULTADOS

4.1. NaCl

4.1.1. Efeito do sal (NaCl) no crescimento de *H. pylori*

A cepa de *H. pylori* foi inoculada em BHI ágar contendo concentrações de sal (NaCl) variando de 0,02-65,5 mg/ml. O efeito do sal sobre o crescimento da bactéria foi avaliado macroscopicamente e através da realização da microscopia pelo método de Gram (Figuras 8 e 9). O resultado obtido foi que o sal não inibiu o crescimento bacteriano em todas as concentrações analisadas, portanto, não foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Na figura 7 podemos visualizar o crescimento microbiano na maior concentração de sal testada (65,5 mg/ml). Estudos morfológicos realizados pelo Gram não mostraram alterações, portanto, não foram visualizadas formas cocóides.



FIGURA 7 – Crescimento de *H. pylori* na maior concentração de sal (65,5mg/ml)

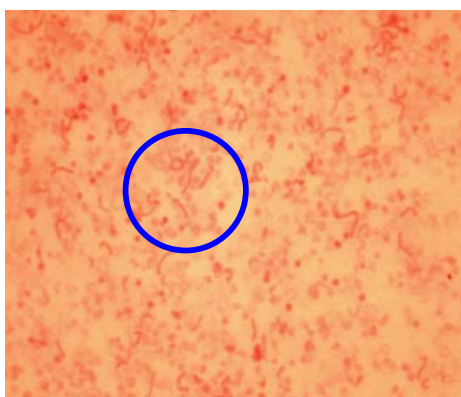


FIGURA 8- Gram – concentração de sal (65,5 mg/ml)

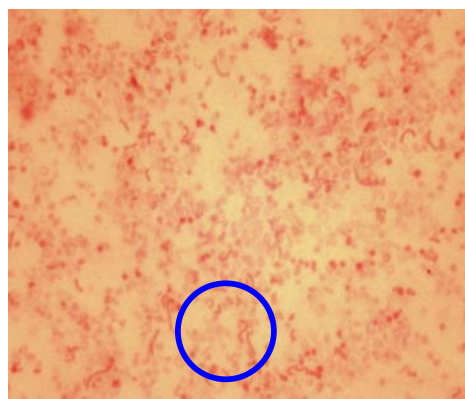


FIGURA 9 – Gram – concentração de sal (0,02mg/ml)

4.1.2 Influência do sal (NaCl) na atividade antimicrobiana da amoxicilina

A ação antimicrobiana da amoxicilina foi verificada na presença de três diferentes concentrações de sal (0,02, 1,0 e 65,5 mg/ml). Na concentração de 0,02 mg/ml de sal não houve crescimento bacteriano, indicando que o sal não exerceu influência na ação do antimicrobiano.

Na concentração de 1,0 mg/ml ocorreu à formação de um halo de inibição sendo a CIM detectada na fita de E-test como 0,5 mg/L e na concentração de 65,5 mg/ml não observamos a formação de halo de inibição sendo visualizado crescimento abundante em toda a superfície da placa. Segundo Dzierzanowska-frangat et. al. (2005) o ponto de corte para a amoxicilina é de 0,5 mg/L. O crescimento observado na placa foi confirmado pela realização do Gram com visualização de bactérias espiraladas compatíveis com *H. pylori*. Os resultados mostraram que quanto maior era a concentração de sal menor era a ação do antimicrobiano, *in vitro*. Portanto, o sal exerceu influência sobre a ação antimicrobiana da amoxicilina.

4.1.3 Influência do sal (NaCl) na atividade antimicrobiana da levofloxacina

A ação antimicrobiana da levofloxacina foi verificada na presença de três diferentes concentrações de sal (0,02, 1,0 e 65,5 mg/ml). Uma placa contendo somente o antimicrobiano foi considerada como controle e comparada com as demais que continham sal. Observou-se que nas três diferentes concentrações o sal não foi capaz de influenciar na ação do antimicrobiano, *in vitro*. A levofloxacina inibiu todo o crescimento microbiano não sendo visualizadas colônias bacterianas na placa.

4.2. Vinagre

4.2.1 Efeito do vinagre (ácido acético) no crescimento do *H. pylori*

As cepas de *H. pylori* foram inoculadas em BHI agar contendo concentrações de vinagre variando de 0-32%. O efeito do vinagre no crescimento de *H. pylori* foi verificado macroscopicamente e confirmado pela bacterioscopia pelo método de Gram. Nas concentrações 0,5, 1, 2 e 4% houve crescimento bacteriano abundante em toda a superfície da placa. Não foram observadas alterações na morfologia bacteriana, portanto, não foram visualizadas formas cocóides.

4.2.2 CIM do vinagre

A menor concentração de vinagre capaz de inibir o crescimento de *H. pylori* foi de 8%.

4.3. Teste da zona de inibição

4.3.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) e canela-de-cunhã (*Cróton zehntneri*) testados nas concentrações de 100% não apresentaram poder de inibição frente à cepa bacteriana testada. Houve crescimento abundante da bactéria em todas as superfícies das placas com ausência da formação de halo de inibição. Os óleos essenciais não se mostraram ativos contra *H. pylori*.

Os óleos essenciais das folhas de aroeira (*Myracrodruom urundeuva* All. quimiotipos β -ocimeno e α -pineno), erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill) E. B quimiotipos I, II e III), sementes de macela (*Egletes viscosa* L. quimiotipos A e B) e folhas de alfavaca roxa (*Ocimum* sp) e verde (*Ocimum gratissimum* L.) testados nas concentrações de 100% apresentaram poder de inibição frente à cepa bacteriana. Foram visualizados halos de inibição variando de 34mm a 11mm demonstrando o poder antimicrobiano dos óleos essenciais analisados. A tabela 1 mostra as medidas dos halos de inibição e as figuras 10, 11, 12 e 13 demonstram os halos de inibição dos óleos essenciais testados.

TABELA 1 - Medidas dos halos de inibição formados pelos óleos essenciais avaliados pelo teste da zona de inibição.

Óleos essenciais	Medidas dos halos de inibição (mm)
Aroeira quimiotipo (β -ocimeno)	14
Aroeira quimiotipo (α -pineno)	24
Erva-cidreira quimiotipo I	20
Erva-cidreira quimiotipo II	17
Erva-cidreira quimiotipo III	17
Macela quimiotipo A	32
Macela quimiotipo B	18
Alfavaca verde	34
Alfavaca roxa	30



FIGURA 10 - Halos de inibição dos óleos essenciais dos três quimiotipos de erva-cidreira (*L. alba* (Mill) N.E. B.)

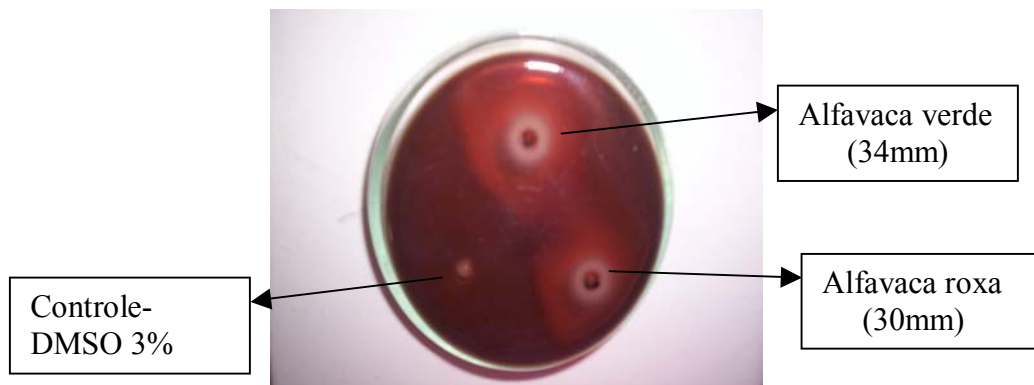


FIGURA 11 – Halos de inibição dos óleos essenciais de alfavaca verde (*O. gratissimum* L.) e alfavaca roxa (*Ocimum* sp.)

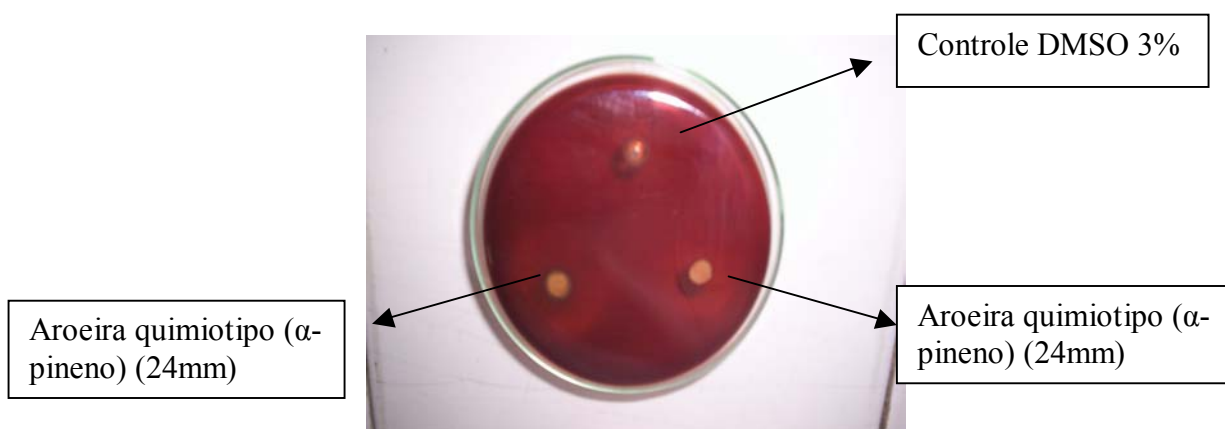


FIGURA 12 - Halo de inibição do óleo essencial de aroeira (*M. urundeuva* All.) quimiotipo α -pineno

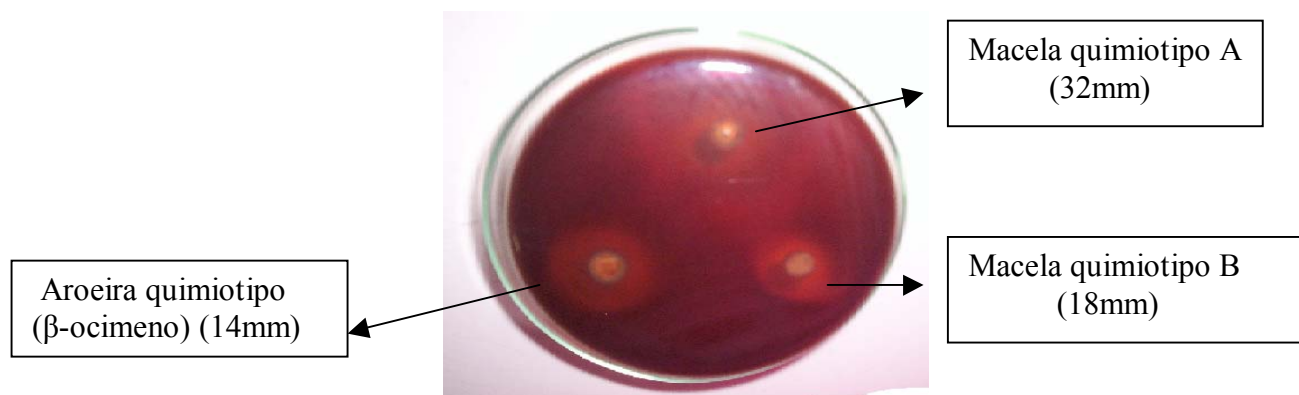


FIGURA 13 – Halos de inibição dos óleos essenciais de aroeira (*M. urundeuva* All.) quimiotipo β -ocimeno e macela (*E. viscosa* L.) quimiotipos A e B

4.3.2. Extratos vegetais

Os extratos etanólicos de alfavaca verde (*O. gratissimum* L.), boldo grande (*Plectranthus grandis*), caju (*Anacardium occidentale*) e manga (*Mangifera indica*), na concentração de 125mg, não apresentaram poder de inibição frente à cepa bacteriana. Houve crescimento abundante da bactéria em todas as superfícies das placas com ausência da formação de halo de inibição e de poder antimicrobiano. O extrato aquoso de pimenta (*Piper nigrum*) também não apresentou poder antimicrobiano na concentração testada.

Os extratos etanólicos de erva-cidreira (*L. alba* (Mill) E. B.) e macela (*E. viscosa* L. quimiotipo B) apresentaram poder de inibição contra *H. pylori* na concentração analisada (125mg). Foram visualizados halos de inibição demonstrando o poder antimicrobiano dos extratos avaliados. A tabela 2 mostra o diâmetro da zona de inibição e as figuras 14 e 15 mostram os halos de inibição dos extratos testados contra as cepas de *H. pylori*.

TABELA 2 – Medidas das zonas de inibição dos extratos vegetais avaliados pelo teste da zona de inibição.

Extratos etanólicos	Diâmetro da zona de inibição (mm)
Alfavaca	0
Boldo grande	0
Caju	0
Erva-cidreira	
quimiotipo I	18
Erva-cidreira	
quimiotipo II	15
Erva-cidreira	
quimiotipo III	14
Macela	15
Manga	0
Pimenta	0



FIGURA 14 – Halo de inibição do extrato etanólico de macela (*E. viscosa* L. quimiotipo A)

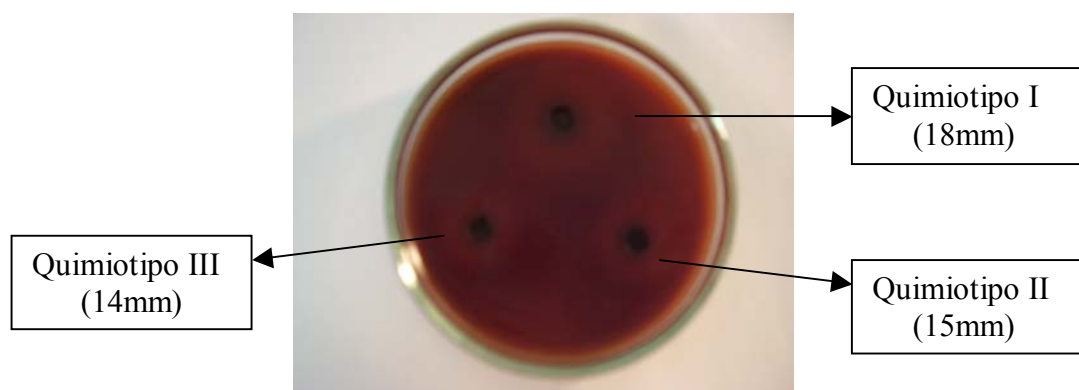


FIGURA 15 - Halos de inibição – extratos etanólicos de erva-cidreira (*L. alba* (Mill) N.E. B.)

4.4. Concentração inibitória Mínima (CIM)

4.4.1. Extratos etanólicos

Baseado nos resultados obtidos através do teste da zona de inibição, a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos de erva-cidreira (*L. alba* (Mill) E. B. quimiotipos I, II, e III) e macela (*E. viscosa* L. quimiotipo B) foi verificada frente a duas cepas clínicas de *H. pylori* pelo método de diluição em ágar.

A tabela 3 mostra a menor concentração dos extratos vegetais capaz de inibir o crescimento microbiano das cepas analisadas.

TABELA 3 – CIM dos extratos etanólicos de erva-cidreira e macela.

Extratos etanólicos	CIM mg/ml	
	Cepa TX 30A	Cepa 536.01
Erva-cidreira (quimiotipo I)	6,25	6,25
Erva-cidreira (quimiotipo II)	3,12	3,12
Erva-cidreira (quimiotipo III)	3,12	3,12
Macela (quimiotipo A)	>12,5	>12,5

4.4.2. Óleos essenciais

De acordo com o resultado obtido no teste da zona de inibição procedeu-se a avaliação do poder antimicrobiano dos óleos essenciais de alfavaca verde (*O. gratissimum* L.), alfavaca roxa (*Ocimum* sp), aroeira (*M. urundeuva* quimiotipos β -ocimeno e α -pineno), erva-cidreira (*L. alba* (Mill) E. B quimiotipos I, II e III) e macela (*E. viscosa* L. quimiotipos A e B) através do método de diluição em ágar.

A tabela 4 mostra de forma simplificada a menor concentração dos óleos essenciais testados capazes de inibir o crescimento microbiano das cepas analisadas.

TABELA 4 – CIM dos óleos essenciais de alfavaca verde e roxa, aroeira, erva-cidreira de macela.

Óleos essenciais	CIM mg/ml	
	Cepa TX 30A	Cepa 536. 01
Aroeira (quimiotipo α -pineno)	3,2	3,2
Aroeira (quimiotipo β -pineno)	>12,5	>12,5
Alfavaca verde	3,2	6,25
Alfavaca roxa	1,56	3,2
Erva-cidreira (quimiotipo I)	12,5	6,25
Erva-cidreira (quimiotipo II)	12,5	12,5
Erva-cidreira (quimiotipo III)	12,5	12,5
Macela (quimiotipo A)	12,5	12,5
Macela (quimiotipo B)	>8,1	>8,1

4.5. Crescimento em ágar batata

As cepas de *H. pylori* apresentaram crescimento em ágar batata, suplementado com sangue de carneiro e antimicrobianos, semelhante ao crescimento obtido no BHM conforme mostrado na figura 16 e 17. Houve crescimento também em ágar batata suplementado com TFT e sem a presença de sangue de carneiro (figura 18).

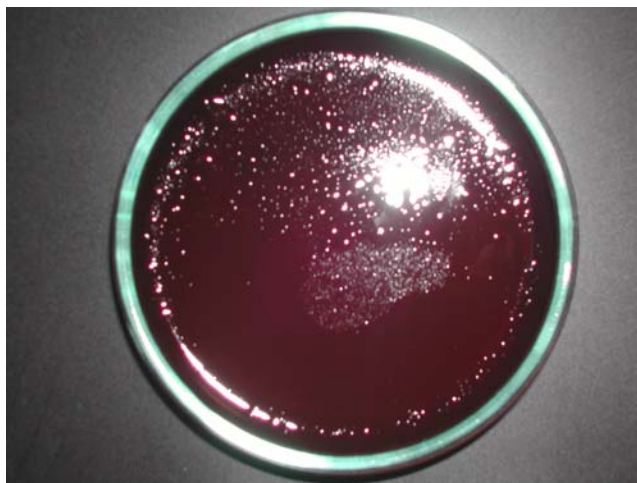


FIGURA 16 – Crescimento de *H. pylori* em BHM



FIGURA 17 – Crescimento de *H. pylori* em ágar batata suplementado com sangue desfibrinado de carneiro e antimicrobianos



FIGURA 18 – Crescimento de *H. pylori* em agar batata sem sangue desfibrinado de carneiro

4.6. Análise da composição química das plantas analisadas

4.6.1. Alfavaca verde e roxa (*Ocimum* sp)

Os óleos essenciais obtidos das flores e inflorescências de alfavaca verde (*O.gratissimum* L.) e alfavaca roxa (*Ocimum* sp) foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear ¹H (RMN ¹H) e Cromatografia gasosa/Espectroscopia de massa (CG/EM). Esse estudo revelou os principais compostos químicos isolados nesses óleos, com os valores percentuais de seus constituintes, conforme a tabela 5 e 6.

Os compostos químicos com maior teor percentual nos óleos de alfavaca roxa (*Ocimum* sp) foram eugenol (47,21%) e β-cariofileno (44,47%) cujas estruturas químicas são apresentadas na figura 19. Enquanto que no óleo essencial de alfavaca verde (*O. gratissimum* L.) foram 1,8-cineol (15,29%) e eugenol (67,78%) dispostos na figura 20.

TABELA 5 - Constituintes químicos (%) dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de *Ocimum* sp.

Constituintes	IK	%
Linalol	1102	2,13
Borneol	1167	1,46
Eugenol	1358	47,21
β-cariofileno	1421	44,47
α-humuleno	1449	1,73

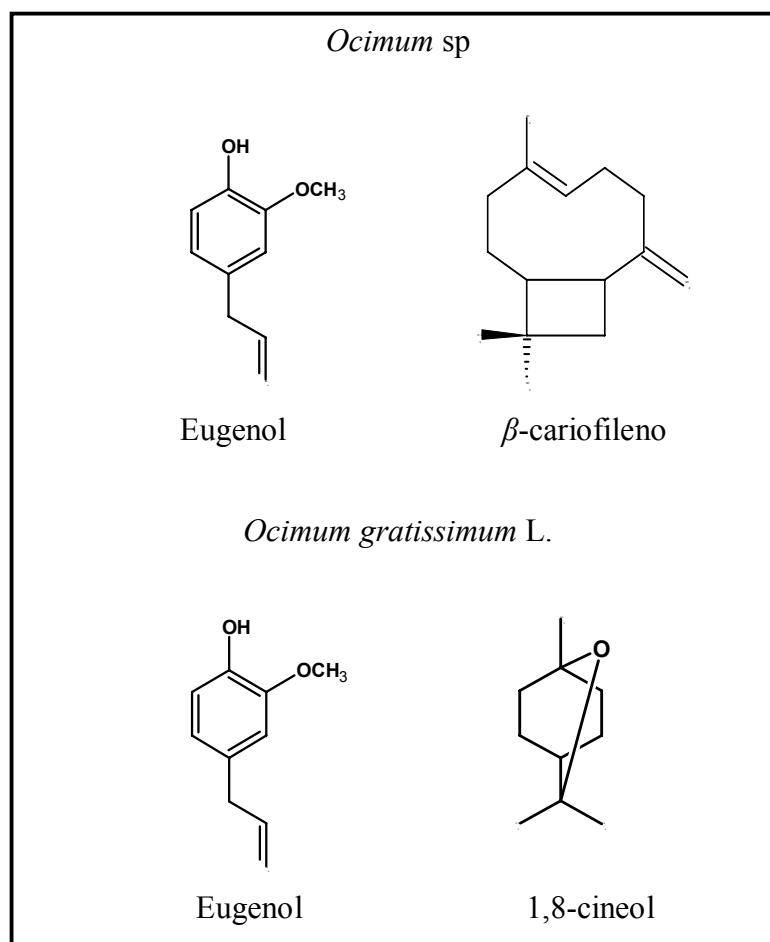
IK: índice de kovacs

TABELA 6 - Constituintes químicos (%) dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de *O. gratissimum* L.

Constituintes	IK	%
1,8-cineol	1031	15,29
cis-ocimeno	1039	1,97
Eugenol	1357	67,78
β -cariofileno	1420	4,85
Germacreno-D	14,75	1,27
β -selineno	14,80	5,94
α -selineno	14,88	1,60

IK: índice de kovacs

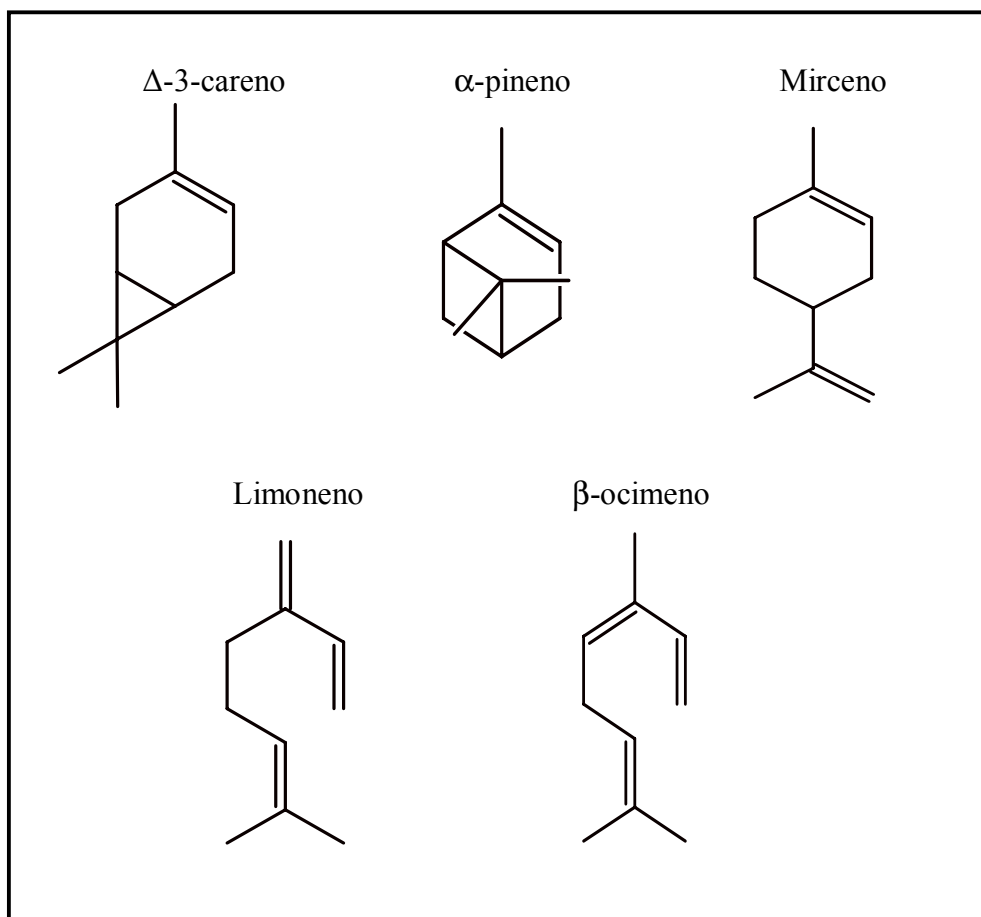
FIGURA 19 - Estrutura química dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Ocimum* sp e *Ocimum gratissimum* L.



4.6.2. Aroeira (*M. urundeuva* All.)

As análises dos espectros de RMN ¹H dos óleos essenciais das folhas de aroeira (*M. urundeuva* All.) permitiu a identificação de 5 tipos químicos principais, identificados como: limoneno, β-ocimeno, Δ-3-careno, α-pineno e mirceno. Esses quimiotipos são caracterizados pelos constituintes majoritários apresentados com teor superior a 90%. As análises por CG/EM revelou, com poucas exceções, a presença, como constituintes minoritários, os mesmos constituintes que caracterizam cada tipo químico.

FIGURA 20 – Estrutura química dos constituintes majoritários dos 5 quimiotipos de aroeira (*M. urundeuva* All.)



4.6.3. Erva-cidreira (*L. alba* (Mill) N. E. B)

Os óleos essenciais dos quimiotipos I, II e III de *L. alba* com atividade antimicrobiana viável foram submetidos à análise por CG/EM. Esse estudo revelou os principais compostos químicos isolados nesses óleos, com os valores percentuais de seus constituintes, conforme a tabela 7.

Os compostos químicos com maior teor percentual nos óleos de *Lippia alba* quimiotipo I foram: mirceno (6,88%) e citral (neral – 29,31% e geranial – 39,72%); para o quimiotipo II foram: limoneno (9,19%) e citral (neral - 31,44% e geranial – 39,66%); para o quimiotipo III foram: limoneno (17,81%) e carvona (58,16%). A figura 22 mostra a estrutura química dos constituintes majoritários.

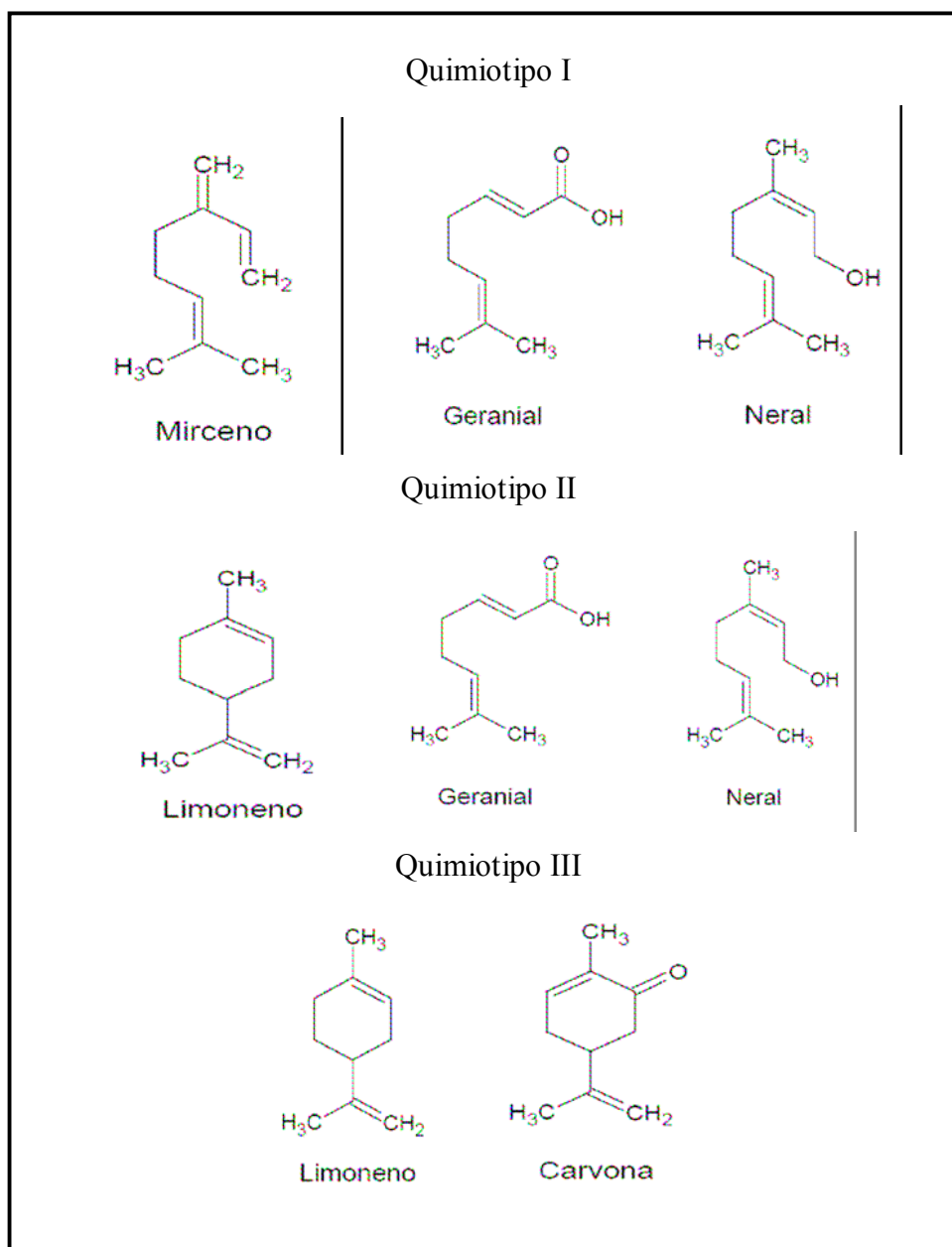
A análise da fração não-volátil (extrato) dos quimiotipos de *L. alba* revelaram a presença de alcalóides, terpenos, iridóides, saponinas, açúcares, cumarinas, flavonóides, fenilpropanóides, leucoantocianidinas e quinonas.

TABELA 7 – Composição química dos óleos essenciais dos quimiotipos de *L. alba*

CONSTITUINTES	IK	TEORES PERCENTUAIS		
		<i>La I</i>	<i>La II</i>	<i>La III</i>
α -tujeno	930			4,27
α -pineno	939	0,5		
sabineno	975			0,62
6-metil-5-hepten2-ona	979	1,04	1,18	
β-mirceno	991	6,88		
<i>p</i> -cimeno	1025	2,69	3,94	
limoneno	1029		9,19	17,81
β -ocimeno	1037			2,07
γ -terpineno	1060	1,82	2,32	1,06
linalol	1097	0,79	1,03	0,67
<i>trans</i> -hidrato de sabineno	1098			0,82
4-terpineol	1189			0,80
nerol	1228	1,76	1,73	
citronelol	1230			
neral	1238	29,31	31,44	
carvona	1243			58,16
geraniol	1253	3,03	2,41	
geranial	1267	39,72	39,66	
piperitenone	1343			1,39
α -cubebeno	1351		2,31	4,40
α -copaeno	1377	2,31		
elemol	1550	3,99	3,26	3,91
e-nerolidol	1563	0,92	0,72	0,68
espatulenol	1576	0,56	0,80	

La I: *L. alba* quimiotipo I; La II: *L. alba* quimiotipo II; La III: *L. alba* quimiotipo III
 IK: índice de Kovacs.

FIGURA 21 – Constituintes majoritários dos quimiotipos de *L. alba*



4.6.4. Macela (*E. viscosa* L.)

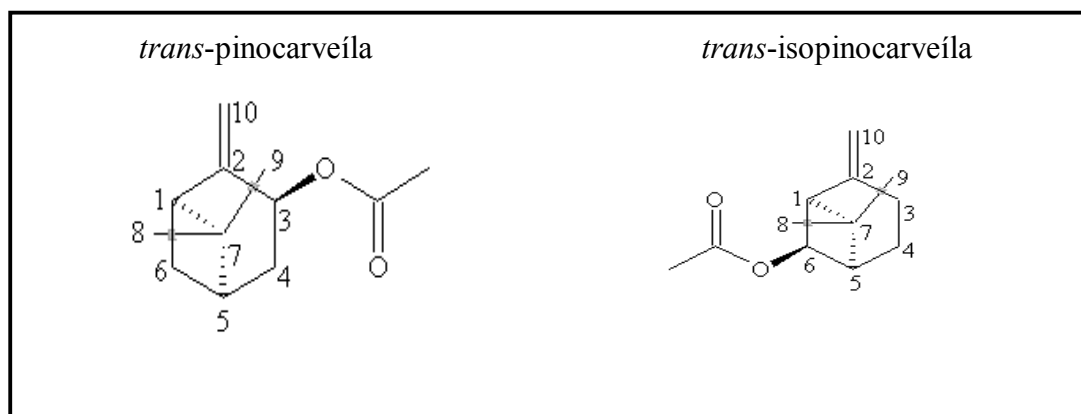
A análise da fração volátil, obtida por RMN 1H, das duas amostras analisadas, permitiu a caracterização do acetato de *trans*-pinocarveila (figura 22), como principal constituinte encontrado no quimiotipo A e do derivado acetilado do 2-hidroxi-beta-pineno, designado de acetato de *trans*-isopinocarveila (figura 21), como que composto majoritário do quimiotipo B. A tabela 8 relaciona a composição e teor dos diferentes componentes dos óleos essenciais de macela quimiotipos A e B.

Na fração química não-volátil do quimiotipo A foi identificado um flavonóide, a ternatina, e os diterpenos ácido centipédico, lactona do ácido Hawtriwaico, barbatol e paratacol.

TABELA 8 - Constituintes químicos (%) dos óleos essenciais de *E. viscosa* L. quimiotipos A e B.

Constituintes	QuimiotipoA(%)	Quimiotipo B(%)
β -pineno	1,9	-
limoneno	0,4	-
β -felandreno	0,3	-
<i>trans</i> -pinocarveol	1,6	-
mirtenol	0,8	-
acetato de <i>cis</i> -crisantenila	-	5,2
acetato de <i>trans</i>-pinocarveila	76,3	16,9
acetato de <i>cis</i>-pinocarveila	0,7	77,9
acetato de <i>trans</i> -carveila	2,4	-
acetato de α -terpinila	0,6	-
acetato de diidro-neo-iso-carveila	0,7	-
acetato de <i>trans</i> -mirtenol	0,2	-
β -cubebeno	0,5	-
<i>trans</i> -cariofileno	-	-
γ -muroleno	0,7	-
germacreno-D	0,2	-

FIGURA 22 - Estrutura química do acetato de *trans*-pinocarveíla e acetato de *trans*-isopinocarveíla.



5. DISCUSSÃO

O *H. pylori* é uma bactéria que infecta cerca de 50% da população mundial constituindo um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico. O aparecimento deste tipo de câncer está associado à presença da bactéria, juntamente com uma soma de elementos de risco, tais como os hábitos alimentares, a predisposição genética e fatores ambientais. (KELLEY; DUGGAN, 2003).

No mundo, o câncer de estômago configura-se como o quarto tipo de câncer mais comum, e o segundo em relação ao número de óbitos. Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008).

O número de novos casos de câncer de estômago estimados para o Brasil no ano de 2008 é de 14.080 entre homens e de 7.720 entre as mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 15 novos casos a cada 100 mil homens e 8 para cada 100 mil mulheres. O câncer de estômago em homens é o segundo mais freqüente nas regiões Norte e Nordeste. Entre as mulheres é o terceiro mais freqüente na região Norte e o quarto na região Nordeste (INCA, 2008).

Os mecanismos pelos quais o *H. pylori* poderia promover o câncer estão sob investigação. Um possível mecanismo seria o aumento da produção de radical livres aumentando a taxa de mutação nas células do hospedeiro. O outro mecanismo proposto envolve o aumento da transformação do fenótipo das células do hospedeiro por meio de alterações nas proteínas celulares como as proteínas de adesão. Os mecanismos propõem ainda uma indução da inflamação com altos níveis locais de TNF- α e/ou interleucina 6. As moléculas de sinalização associadas à inflamação como TNF-alfa poderiam alterar a adesão às células epiteliais gástricas e levar à dispersão e migração de células epiteliais transformadas sem a necessidade de mutações adicionais nos genes supressores de tumor (TSUJI et al., 2003).

Outro fator importante no estabelecimento de uma infecção por *H. pylori* é a virulência das cepas infectantes. Evidências recentes demonstram que cepas de *H. pylori* apresentam diversidade genotípica, cujos produtos acionam o processo inflamatório por meio de mediadores e citocinas, podendo levar a diferentes graus de resposta inflamatória do hospedeiro resultando em diferentes destinos patológicos. O gene da citotoxina vacuolizante (*vacA*) e o gene relacionado a citotoxina (*cagA*) são expressos por cepas de *H. pylori*, tendo sido identificados como possíveis determinantes de virulência e considerados os genes com maior patogenicidade e habilidade em provocar a doença (CUNHA, 2002).

Cepas que produzem a citotoxina vacuolizante (*vacA*) estão associadas com resposta inflamatória e propensão ao desenvolvimento de úlceras duodenais. A citotoxina relacionada ao gene A (*cagA*) é importante na patogênese da inflamação sendo mais comum entre pessoas com úlceras pépticas, linfomas e adenocarcinomas, além de constituir um marcador para a ilha de patogenicidade *cag*, que engloba genes relacionados à inflamação induzida por cepas patogênicas, e inclui *cagA*, *picA* e *picB*. Outros genes de virulência já foram identificados sendo estas variações genômicas das cepas responsáveis pela codificação de fatores de virulência, capazes de determinar diversos tipos de lesão no hospedeiro (CUNHA, 2002).

A diminuição na incidência de câncer de estômago tem sido observada, e pode ser explicada por reduções nas taxas de prevalência de fatores de risco. Dentre os fatores de risco relacionados ao câncer de estômago, a dieta vem sendo muito enfatizada por sua interação sinérgica com *H. pylori*, exacerbando os efeitos inflamatórios no epitélio gástrico. Vários estudos têm demonstrado que a dieta é um fator preponderante no aparecimento do câncer. Uma alimentação pobre em vitamina A e C, carnes e peixes, ou ainda com um alto consumo de nitrato, alimentos defumados, enlatados, com corantes ou conservados no sal são fatores de risco para o aparecimento deste tipo de câncer (TSUGANE; SASAZUKI, 2007).

No Brasil, observa-se que os tipos de câncer que se relacionam aos hábitos alimentares estão entre as seis primeiras causas de mortalidade por câncer. O câncer de estômago ocupa o primeiro lugar em mortalidade entre homens no Brasil, sendo São Paulo, Fortaleza e Belém as cidades onde este tipo de câncer atinge os mais altos níveis de frequência do mundo. A relação entre o consumo de certos alimentos e o risco de câncer possui evidência científica apesar da complexidade dos fatores que estão associados à ingestão dos alimentos, como conservação e preparo do alimento, tipo e quantidade de alimento consumido (INCA, 2008).

Estudos epidemiológicos foram realizados na tentativa de identificar fatores dietéticos e protetores para a infecção por *H. pylori*. Muitos componentes da alimentação têm sido associados com o processo de desenvolvimento do câncer, principalmente câncer de mama, cólon (intestino grosso), reto, próstata, esôfago e estômago. Os vegetais, por exemplo, exercem ambos os efeitos. Alguns são fontes de compostos nitrogenados que aumentam o risco de câncer e outros apresentam substâncias protetoras. Estudos de caso-controle em diversos países têm demonstrado efeitos protetores de vegetais frescos, frutas e frutas cítricas, sozinhas ou combinadas. Estudos mostram que o risco de câncer gástrico reduz com o consumo de diferentes tipos de frutas e vegetais (YAMAGUCHI; KAKIZOE, 2001).

Alguns tipos de alimentos, se consumidos regularmente durante longos períodos de tempo, parecem fornecer o tipo de ambiente que uma célula cancerosa necessita para crescer, se multiplicar e se disseminar. Esses alimentos devem ser evitados ou ingeridos com moderação. Neste grupo estão incluídos os alimentos ricos em gorduras, tais como carnes vermelhas, frituras, molhos com maionese, leite integral e derivados, bacon, presuntos, salsichas, lingüiças, mortadelas, dentre outros. Existem também os alimentos que contêm níveis significativos de agentes cancerígenos. Por exemplo, os nitritos e nitratos usados para conservar alguns tipos de alimentos, como picles, salsichas e outros embutidos e alguns tipos de enlatados, se transformam em nitrosaminas no estômago. As nitrosaminas, que têm ação carcinogênica potente, são responsáveis pelos altos índices de câncer de estômago observados em populações que consomem alimentos com estas características de forma abundante e freqüente. Já os defumados e churrascos são impregnados pelo alcatrão proveniente da fumaça do carvão, o mesmo encontrado na fumaça do cigarro e que tem ação carcinogênica conhecida. Os alimentos preservados em sal, como carne-de-sol, charque e peixes salgados, também estão relacionados ao desenvolvimento de câncer de estômago em regiões onde é comum o consumo desses alimentos (KELLEY; DUGGAN, 2003).

O câncer de estômago ocorre mais freqüentemente em alguns países do Oriente e em regiões pobres onde não há meios adequados de conservação dos alimentos (geladeira), o que torna comum o uso de picles, defumados e alimentos preservados em sal (KELLEY; DUGGAN, 2003).

O Estado do Ceará, situado na região nordeste do Brasil, apresenta clima tropical e hábitos alimentares típicos herdados por povos que habitavam a região no passado como índios, portugueses e holandeses. Devido a heranças passadas e a baixa condição sócio-econômica é costume da população de nosso estado à ingestão de alimentos ricos em sal, como a carne-de-sol, e condimentos como vinagre e a pimenta. Avaliando o hábito populacional nordestino e partindo do princípio de que a dieta exerce um papel importante na colonização pelo *H. pylori*. o presente trabalho comprometeu-se em avaliar a influência desses componentes comuns no crescimento da bactéria *H. pylori*, *in vitro*.

Têm-se conhecimento que o sal (NaCl) é um dos fatores que viabilizam o aparecimento de câncer gástrico sendo considerado um fator de risco para esta doença. Diante das evidências de que uma dieta acrescida de sal está envolvida na etiologia do câncer gástrico e de que estudos quantitativos consistentes sobre a influência do sal sobre *H. pylori* permanecem ausentes, foi investigado nesse trabalho o possível efeito do sal, *in vitro*, sobre a bactéria *H.*

pylori. A influência do sal usado concomitantemente com as drogas utilizadas para o tratamento do *H. pylori* foi também verificada.

De acordo com nossos resultados, o sal não foi capaz de provocar nenhum efeito inibitório no crescimento da bactéria. O crescimento de *H. pylori* mostrava-se acentuado em altas concentrações de sal apresentando, na microscopia pelo método de Gram, uma morfologia bacilar bem característica.

Foi verificada a influência do sal na ação da amoxicilina e levofloxacina frente à *H. pylori*. A amoxicilina foi escolhida por ser um dos antimicrobianos mais utilizados nos esquemas de tratamento da bactéria e a levofloxacina por ser uma alternativa terapêutica nos casos de resistência as drogas de primeira escolha. Foi observado nesse estudo que o sal pode influenciar, *in vitro*, a ação da amoxicilina. A amoxicilina é um antimicrobiano pertencente à classe das penicilinas que possuem um anel β -lactâmico e um núcleo 6-aminopenicilâmico, que por sua vez, consiste de um anel tiazolidínico unido a um anel β -lactâmico de onde grupos amino-secundários são inseridos. Os grupos hidroxil e amino presentes na molécula de amoxicilina são ionizáveis. Possivelmente, o íon Cl^- do sal, cuja fórmula é NaCl , foram capazes de ionizar a molécula e esta perdeu sua ação. Isso ocorreu quando o sal estava presente em concentrações maiores. O resultado observado com a amoxicilina não foi visto com a levofloxacina. Quimicamente, a levofloxacina é uma carboxiquinolona quiral racêmica enantioméricamente a substância ofloxacina e que não apresenta grupamentos ionizáveis. Levofloxacina tem potencial para formar compostos de coordenação estáveis com metálicos. Este potencial de quelação, *in vitro*, tem a seguinte ordem de formação: $\text{Al}^{+3} > \text{Cu}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Ca}^{+2}$ e nenhum destes íons compõem a molécula de sal (KOROLKOVAS, 1996). Nesse estudo realizado com o sal não foi observado diferença de crescimento entre as cepas padrão e clínica.

Estudo semelhante ao proposto neste trabalho foi realizado com a aspirina. A interação entre a aspirina e *H. pylori*, *in vitro*, foi investigada através do efeito da aspirina no crescimento da bactéria e na sensibilidade aos antimicrobianos. No estudo, a aspirina foi capaz de inibir o crescimento de *H. pylori* e aumentar a sensibilidade a amoxicilina, claritromicina e metronidazol (WANG et al., 2003).

Outro componente da dieta cujo estudo foi proposto foi a pimenta. Esta traz consigo alguns mitos, como por exemplo, o de que provocar gastrite, úlcera, pressão alta e até hemorróidas. As pesquisas científicas mostram justamente o oposto. Muitos dos benefícios da pimenta estão sendo investigados pela comunidade científica e farmacêutica mostrando que a substância química que dá à pimenta o seu caráter ardido é exatamente aquela que possui as

propriedades benéficas à saúde. As substâncias que dão caráter picante à pimenta (capsaicina e piperina) melhoram a digestão estimulando as secreções do estômago. Possuem também efeito carminativo (antiflatulência) e estimulam a circulação de sangue no estômago, favorecendo a cicatrização de feridas (úlceras), desde que, é claro, outras medidas alimentares e de estilo de vida sejam aplicadas conjuntamente (CAPASSO et al., 2002). O critério de escolha para o estudo da pimenta (*P. nigrum*) baseou-se no seu costumeiro uso como condimento e nas contradições existentes quanto aos seus males ou benefícios. Quanto a investigação da interação da pimenta com *H. pylori*, o estudo mostrou que a pimenta não foi capaz de inibir o crescimento microbiano.

Continuando na mesma linha de pesquisa quanto aos hábitos alimentares da população cearense, o vinagre é outro componente bastante utilizado na dieta e também como composto para possível remoção de microorganismos de legumes e hortaliças. O vinagre, juntamente com o sal e a pimenta, está na lista de condimentos proibidos para quem apresenta alterações gástricas. Acredita-se que seja por ele aumentar ainda mais o pH gástrico exacerbando os sintomas de doenças estomacais. Esse estudo verificou se a concentração do vinagre (ácido acético) utilizado pela população, disponível comercialmente (4%), tinha ação contra *H. pylori*. Nesse trabalho foi visto que na concentração de 4% o vinagre não inibiu o crescimento da bactéria, portanto, em concentrações superiores foi capaz de inibi-la.

Além de uma alimentação rica em sal, pimenta e vinagre, as plantas medicinais são também consideradas componentes dietéticos da população de nosso estado. O costume de se utilizar chás de plantas como recurso terapêutico é muito freqüente. Folhas, flores, raízes, cascas e sementes, usadas na culinária ou para cura sob a forma de chás, infusões, xaropes e garrafadas, tiveram seus efeitos reconhecidos entrando em definitivo para a farmacopéia.

Além do uso das plantas, também são comum relatos da utilização do sumo de batata para o tratamento de dor estomacal. Por conta disso, surgiu a idéia de incorporar o sumo da batata inglesa no meio de cultura utilizado para o crescimento de *H. pylori* no sentido de investigar a capacidade da substância em inibir ou promover o crescimento bacteriano. Ao ser observado que o crescimento bacteriano era satisfatório, foi decidido que a bactéria seria inoculada em um meio de cultura, chamado de agar batata, disponível comercialmente. De forma inesperada e satisfatória, também foi observado crescimento da bactéria só que em pequena proporção. Estudos de isolamento primário com *H. pylori* devem ser realizados para futuramente ser proposto um meio de cultura alternativo e barato para o crescimento da bactéria.

Em relação às plantas, estas podem apresentar compostos químicos com atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias, incluindo espécies resistentes a

antibióticos e antifúngicos, constituindo uma alternativa terapêutica no tratamento de diversas doenças (BERTINI et al, 2005). Por conta disso, foi proposta neste estudo a avaliação de algumas plantas usadas popularmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais cuja ação frente *H. pylori* é desconhecida, com o objetivo de observar se a utilização da planta, em diferentes formas, exerce efeito na colonização bacteriana.

Os extratos e óleos essenciais foram os tipos de produtos de origem vegetal estudados. Extratos são obtidos pelo tratamento de substâncias vegetais, por um solvente apropriado, o qual é evaporado até uma consistência desejada. O solvente utilizado na confecção dos extratos foi o Etanol P.A por ser considerado um dos melhores solventes extratores e de onde se consegue obter a maioria dos compostos químicos.

Nesse trabalho, os extratos etanólicos dos três quimiotipos de erva-cidreira (*L. alba* (Mill.) N. E. B.) e macela (*E. viscosa* L.), os óleos essenciais de alfavaca verde (*O. gratissimum* L.) e roxa (*Ocimum* sp), aroeira (*M. urundeuva* All.) e erva-cidreira (*L. alba* (Mill.) N. E. B.) mostraram-se ativos contra *H. pylori* . Por se tratar de um estudo pioneiro, dados comparativos em relação à CIM desses produtos, frente à bactéria estudada, são ausentes e constituem um alvo investigativo para a comunidade científica.

De acordo com esse estudo, os extratos etanólicos de erva cidreira quimiotipos II e III apresentaram uma menor CIM, não demonstrando diferença entre as cepas padrão e clínica. Os óleos essenciais da aroeira quimiotipo α -pineno e da alfavaca foram os mais ativos, sendo que a CIM da cepa padrão foi menor que a da cepa clínica. Isso seria esperado pela cepa clínica muitas vezes ser considerada mais resistente.

Poucos estudos farmacológicos com o gênero *Lippia* foram realizados sendo estes poucos estudos concentrados nos óleos essenciais. Entre as espécies estudadas as que têm atividade antimicrobiana relatada são: *Lippia formosa*, *Lippia dulcis*, *Lippia gracilis*, *Lippia sidoides*, *Lippia grandifolia*, *Lippia javanica*, *Lippia microphyla*, *Lippia palmeri* e *Lippia alba* (PASCUAL et al., 2001).

Uma triagem foi realizada na Guatemala para a verificação da atividade antimicrobiana de algumas plantas utilizadas no país. Três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*) foram utilizadas nos testes. Entre as plantas originárias da América com grande atividade antibacteriana destacaram-se duas espécies do gênero *Lippia* (*L. alba* e *L. dulcis*). *L. alba* inibiu principalmente *S. aureus* e *S. pneumoniae* e moderadamente *S. pyogenes* enquanto *L. dulcis* inibiu mais efetivamente *S. pneumoniae* e *S. aureus* e não inibiu *S. pyogenes* (AGUIAR; COSTA, 2005).

Estudos químicos do óleo essencial e dos caracteres organolépticos e morfológicos das cidreiras (*L. alba*) encontradas no Brasil, especialmente no Ceará, levaram à identificação de três tipos fundamentais ou quimiotipos. O primeiro (quimiotipo I) caracterizado por teores elevados de citral (neral – 23,21% e geranial – 31,92%) e mirceno (10,54%) no óleo essencial, apresenta folhas ásperas e largas, inflorescências capituliformes maiores, com até 8 flores liguladas externas em torno de um amplo conjunto central de flores ainda fechadas. O segundo (quimiotipo II) caracterizado por teores elevados de citral (neral – 27,33% e geranial – 35,63%) e limoneno (12,06%) no óleo essencial, possui folhas e ramos mais delicados e inflorescências menores, compostas por um pequeno disco central de flores ainda não desenvolvidas rodeado por apenas três a cinco flores liguladas. E o terceiro (quimiotipo III) é caracterizado por semelhança morfológica ao segundo, mas contém altos teores de carvona (54,69%) e limoneno (23,18%) (BARBOSA, 2003).

Segundo Matos (2002), o tipo classificado como quimiotipo I recebe a designação popular de cidreira-brava, apresenta cheiro fraco de limão, as folhas são ásperas medindo de 4 a 5 cm e largas, inflorescências com um grande disco de flores fechadas no centro arrodado por cerca de oito pétalas das floretas externas. As sementes são poucos visíveis por causa do seu pequeno tamanho. É freqüente nas margens dos rios e riachos do Estado do Maranhão, sendo facilmente cultivável por estaquia. O tipo classificado como quimiotipo II, popularmente é designado como cidreira-carmelitana, possui odor forte de limão, com folhas macias, estreitas e pequenas. As inflorescências são menores, com um pequenos disco de flores, fechadas e rodeadas por 3 a 5 flores, pétalas das floretas externas. As sementes também são pouco visíveis, sendo a planta facilmente cultivada por estaquia. Cidreira-comum é a denominação popular dada ao quimiotipo III, que também possui folhas macias, estreitas e pequenas e inflorescências menores, com um disco de flores fechadas e rodeadas por 3 a 5 pétalas das floretas externas. Possui odor forte, adocicado e um pouco alimonado. Suas sementes também são pouco visíveis e a planta cultivável por estaquia.

Estudos dos óleos essenciais de *L. alba* coletados de três municípios do Pará revelaram outros componentes majoritários que permitiram a identificação de outros quimiotipos diferentes dos encontrados em nosso estado. A classificação realizada pelos pesquisadores foi através de grupos. Desta forma, os óleos essenciais foram divididos em três grupos segundo seus componentes: grupo A, caracterizado por 1,8, cineol (34,9%), limoneno (18,4%), carvona (31,8%) e sabineno (8,2%); grupo B, caracterizado por limoneno (32,1%), carvona (31,8%) e mirceno (11%); e grupo C, caracterizado por neral (13,7%), geranial (22,5%), germacreno-D

(25,4%) e cariofileno (10,2%) Os diferentes achados nos diversos estudos mostram que os constituintes químicos podem variar de acordo com a região (AGUIAR; COSTA, 2005).

A análise química realizada com as cidreiras (*L.alba*) cearenses, mostrou que os compostos químicos majoritários encontrados confirmam a existência dos três quimiotipos com teores percentuais semelhantes aos descritos por Barbosa (2003). Os compostos majoritários para *Lippia alba* quimiotipo I foram: mirceno (6,88%) e citral (neral – 29,31% e geranial – 39,72%); para o quimiotipo II foram: limoneno (9,19%) e citral (neral - 31,44% e geranial – 39,66%); para o quimiotipo III foram: limoneno (17,81%) e carvona (58,16%). Além desses constituintes majoritários existem outros denominados de monoterpenos que segundo o estudo realizado por Griffin et al. (1999) mostram alta atividade antimicrobiana. Estes monoterpenos, possivelmente, responsáveis pela atividade antimicrobiana são o nerol e geraniol estão presentes nos três quimiotipos. Ao citral, mirceno, limoneno e carvona são atribuídas propriedades analgésicas, antiinflamatória, espasmolítica e miorelaxante.

Aroeira-do-sertão (*M. urundeuva* All) conhecida pela atividade antiinflamatória das cascas do caule é uma das plantas de uso popular mais antigo e difundido no nordeste do Brasil (VIANA et al, 2003). No entanto, não há registros da caracterização química e farmacológica do óleo essencial desta espécie na literatura. A caracterização química é objeto de estudo de uma tese de doutorado em andamento sendo que os dados preliminares são mostrados nos resultados de nosso trabalho.

A constituição química volátil de aroeira do sertão apresenta os monoterpenos limoneno, β -ocimeno, D-3-careno, α -pineno e mirceno como constituintes majoritários e/ou minoritários, caracterizando 5 tipos químicos. Os óleos essenciais dos quimiotipos β -ocimeno e α -pineno apresentaram atividade antimicrobiana frente à *H. pylori*. Como os constituintes majoritários estão presentes em concentrações superiores a 90% em cada quimiotipo, provavelmente são eles os responsáveis pela atividade antimicrobiana. β -ocimeno e α -pineno são monoterpenos presentes também nos quimiotipos de cidreira (*L. alba*) sendo mais um indício de que estes são provavelmente os responsáveis pela ação antimicrobiana.

São inexistentes estudos sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alfavaca (*Ocimum* spp) frente à *H. pylori*, contudo, um potente poder antimicrobiano contra várias bactérias já foi demonstrado. Estudos realizados mostram que *O. gratissimum* inibe *S. aureus*, *Shigella flexineri*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes concentrações. (NAKAMURA et al., 1999).

Orafidiya et al. (2003) relataram a atividade de óleo de *O. gratissimum* contra *E. coli* enteroagregativa.

A maioria dos estudos indica o eugenol como componente majoritário do óleo essencial de *O. gratissimum* L. é responsável pela atividade antimicrobiana (NAKAMURA et al., 1999). A análise química de nosso trabalho também mostra o eugenol com constituinte majoritário, contudo, outros estudos destacaram o timol como o principal constituinte. Outras combinações como timol-geraniol, eugenol/ocimeno, cinamato de etila/linalol e timol, p-cimeno e g-terpineno também têm sido mencionadas. Os constituintes químicos da planta podem variar de acordo com o período do dia em que se foi realizada a coleta (MATOS, 2002).

O eugenol encontra-se distribuído no reino vegetal como constituinte dos óleos essenciais de diversas plantas. É o princípio ativo do cravo (85-92%), de plantas do gênero *Ocimum*, da canela e noz-moscada. Algumas de suas propriedades conhecidas do eugenol são as funções antioxidante, anticarminativa, antiespasmódica, antisséptica. Outra propriedade do eugenol que vem sendo muito estudada e tem aplicação na área de alimentos é a sua ação antimicrobiana, apesar do seu mecanismo exato de ação ainda não estar bem esclarecido. É possível que parte do efeito antimicrobiano do eugenol esteja relacionada com sua natureza fenólica. Em estudos acerca da atividade *in vitro* do eugenol e de seus derivados sobre o crescimento de fungos, leveduras, bactérias e vírus, demonstraram apenas a ausência de atividade antiviral. Autores ainda verificaram que o grupamento hidroxila livre do eugenol é necessário para a sua atividade antibacteriana, mas não para a atividade antifúngica. O mecanismo de ação do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas, e, ou, no material genético celular. Em razão da similaridade estrutural entre eugenol e butilhidroxianisol, é provável que sua ação esteja relacionada com alterações dos lipídios celulares, perda de material intracelular e inibição da síntese de ácidos nucléicos (PEREIRA; MAIA, 2007).

Durante a última década, os extratos e óleos essenciais de macela vem sendo objeto de investigação fitoquímica, agrônômica e farmacológica *in vivo*. Estudos sobre atividade antimicrobiana *in vitro* são escassos.

O óleo essencial dos capítulos florais de macela teve sua atividade antimicrobiana investigada contra cepas de *S. aureus* resistentes. O óleo mostrou uma boa atividade antibacteriana com CIM variando de 0,625 a 2,5µL/ml (SOUZA et al., 1998). Nenhum estudo foi ainda relatado a respeito do poder antimicrobiano do extrato e óleos essenciais de macela frente a *H. pylori*.

Avaliando a composição química do extrato de macela observamos a presença compostos chamados de flavonóides e terpenóides que são bastante descritos na literatura por apresentarem ação antimicrobiana e, possivelmente, podem ser os responsáveis por essa atividade (AHERNE et al., 2002; SILVA FILHO et al., 2007). O flavonóide isolado da macela é a ternatina e estudos farmacológicos sua mostram atividade gastroprotetora, hepatoprotetora, antiinflamatória e antidiarréica. Os diterpenos também foram submetidos a ensaios farmacológicos dando resultados positivos em antinocicepção e gastroproteção, enquanto os óleos essenciais foram testados como antinociceptivos, anticonvulsivantes e antibacterianos (SOUZA, 1998).

A análise química de proposta no trabalho confirmou os dois compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais de macela quimiotipo A e B, que são *trans*-pinocarveila e *trans*-isopinocarveila, respectivamente. Nenhuma atividade farmacológica foi ainda atribuída a esses componentes e carecem de investigação.

Os resultados apresentados nesta dissertação corroboram a importância da seleção de plantas para triagem de bioatividade. Os resultados apresentam uma expressiva contribuição quanto a caracterização da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas da flora nordestina, utilizados na medicina tradicional, podendo constituir mais uma fonte de pesquisa onde estudos aprofundados são necessários.

Em resumo, neste trabalho foi verificado que o sal (NaCl) não inibiu o crescimento de *H. pylori* e nem alterou a sua morfologia, contudo, foi capaz de influenciar na ação antimicrobiana da amoxicilina *in vitro*. O vinagre, na concentração disponível comercialmente, não foi capaz de inibir o crescimento de *H. pylori*. A pimenta (*P. nigrum*), na forma de extrato aquoso, não apresentou poder antimicrobiano contra *H. pylori*. *H. pylori* foi capaz de crescer em um meio de cultura suplementado com o sumo de batata e em um meio de cultura disponível comercialmente denominado agar batata. Os extratos de erva-cidreira (*L.alba* quimiotipos I, II, III) e macela (*E. viscosa*) foram ativos contra *H. pylori*. Os óleos essenciais de alfavaca verde (*O. gratissimum*) e roxa (*Ocimum* sp), erva-cidreira (*L.alba* quimiotipos I, II, III), aroeira (*M. urundeuva* quimiotipos α -pineno e β -ocimeno) foram capazes de inibir o crescimento de *H. pylori*.

6. CONCLUSÃO

Através desses experimentos concluímos que o *H. pylori* pode não ser uma bactéria tão exigente no crescimento como os estudos sugerem, já que foi capaz de crescer em meio de cultura simples e sem suplementos. Entretanto, estudos mais aprofundados de isolamento primário da bactéria nesses meios de cultura são necessários.

Concluímos também que uma dieta acrescida de sal pode influenciar na ação da amoxicilina, que é um dos antimicrobianos inseridos nos esquemas terapêuticos contra *H. pylori*.

Algumas das plantas testadas nesse trabalho, com propriedades digestivas, apresentaram atividade antimicrobiana confirmando o uso popular e a importância do estudo de extratos e óleos essenciais da flora nordestina como fonte de novas alternativas terapêuticas. Os princípios ativos encontrados nas plantas podem ser determinantes contra a bactéria constituindo novas linhas de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publishing, Carol Stream, IL. 2001.

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Rev Bras Pl Med.**, v.8, n.1, p. 79-84, 2005.

AGUIYI, J.C.; OBI, C.I.; GANG, S.S. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia**, v.71, p.444- 6, 2000.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, v.18, p.75– 81, 2002

AHMED, N. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over? **Ann Clin Microbiol**. v.4, n.17, 2005.

ALEA, J.A.P., LUIS, A.G.O., PÉREZ, A.R., JORGE, M.R., BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Rev Cubana Farm.**, v. 30, n.1., p. 29-35, 1997.

ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 723-728, 2001.

BANDEIRA, M.A.M. **Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão): constituintes químicos ativos da planta em desenvolvimento e adulta**. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BARBOSA, F.G. **Contribuição ao conhecimento químico de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown cultivadas no horto de plantas medicinais**. 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

BARBOSA, R.C. **Doença do refluxo gastroesofágico: influência da cepa *cagA* do *Helicobacter pylori* na resposta terapêuticas à inibição da bomba protônica em pacientes com esofagite erosiva leve**. 2006, 77p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BASTOS, G.M. **Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas**. 2007. 107f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BEDOYA, A., GARAY, J., SANZÓN, 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. 206-213, 2003.

- BERGONZELLI, G.E.; DONNICOLA, N.P.; CORTHÉSY-THEUILAZ, E. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infections. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, n. 10, p. 3240-3246, 2003.
- BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Fortaleza, v. 17, nº 3/4, 2005.
- BEZERRA, A.M.E.; MEDEIROS FILHO, S.; FREITAS, J.B.S. Maturidade fisiológica e germinação de sementes de macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.) submetidas à secagem. **Hortic. Bras.**, v. 21, n. 3, p. 549-552, 2003.
- BLASER, M.J.;ATHERTON, J.C. *Helicobacter pylori*: biology and disease. **J Clin Invest.**, v. 113, p. 321-333, 2004.
- BLASER, M.J.; BERG, D.E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J Clin Invest.**, n. 7, p. 767-773, 2001.
- BRENCIAGLIA, M.I., FORNARA, A.M., SCALTRITO, M.M., DUBINI, F. *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibility of coccoid forms. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 13, p. 237-241, 2000.
- BURY-MONÉ, S., KAAKOUSH, N.O., ASENCIO, C., MÉGRAUD, F., THIBONNIER, M., DE REUSE, H., MENDZ, G.L. Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile ? **Helicobacter**, v. 11, p. 296-303, 2006.
- BYTZER, P.; O'MORAIN, C. Treatment of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 10, suppl. 1, p. 40-46, 2005.
- CALAINHO, D. B. **Jesuítas e medicina no Brasil colonial**. Tempo, Rio de Janeiro, n. 19, p. 61-65, 2005.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.**, v.33, p. 179-189, 2000.
- CAPASSO, F.; MASCOLO, N. Effect of piperine, the active ingredient of black pepper, on intestinal secretion in mice. **Life Sciences**, v 71, p. 2311-2317, 2002.
- CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chem.**, v. 100, p. 553-559, 2007.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard-Sixth Edition. CLSI document M7-A6, USA, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. CLSI document M100-S15, USA, 2005.

COELHO, L.G.V., BASTOS, E.M.A.F., RESENDE, C.C., SILVA, C.M.P., SANCHES, B.S.F., CASTRO, F.J., MORETZSOHN, L.D., VIEIRA, W.L.S., TRINDADE, O.R. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 12, p. 572-574, 2007.

COLE, S.P., CIRILLO, D., KAGNOFF, M.F., GUINEY, D.G., ECKMANN, L. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. **Infect Immun.**, v. 65, n. 2, p. 843-846, 1997.

COSTA FILHO, L.O., ENCARNAÇÃO, C.R.F., OLIVEIRA, A.F.M. Influência hídrica e térmica no crescimento e desenvolvimento de *Ocimum gratissimum* L. **Rev Bras Pl Med.**, v.8, n.2, p.8-13, 2006.

COUTINHO, H.D.M.; BEZERRA, D.A.C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I.J.F. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais**. Pernambuco, 2003-2004.

COVACCI, A., TELFORD, J.L., DEL GIUDICE, G., PARSONNET, J., RAPPOULI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science**, v. 284, p. 1328-1333, 1999.

CUNHA, M.P.S.S. **Avaliação de dois métodos diagnósticos de *Helicobacter pylori* e correlação entre a densidade da colonização bacteriana e achados histopatológicos**. 2002, 58p. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Departamento de Medicina e Patologia Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

DUBEY, N.K. TIWARI, T.N.; MANDIN, D.; ANDRIAMBOAVONJY, H.; CHAUMONT J.P. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, v.71, p.567-9, 2000.

DUNN, B.E., COHEN, H., BLASER, M.J. *Helicobacter pylori*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 10, n. 4, p. 720-741, 1997.

DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K.; ROZYNEK, E.; CELINSKA-CEDRO, D.; JAROSZ, M.; PAWLOWSKA, J.; SZADKOWSKI, A.; BUDZYNSKA, A.; NOWAK, J.; ROMANCZUK, W.; PROSIECKI, R.; JOZWIAK, P.; DZIERZANOWSKA, D. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicentre study. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 26, p.230-234, 2005.

EATON, K.A; CATRENICH, C.E; MAKIN, K.M; KRAKOWA, S. Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **J Infect Dis.**, v. 171, p. 459–462, 1995.

EGAN, B.J.; O' MORAIN, C.M. A historical perspective of *Helicobacter* gastroduodenitis and its complications. **Best Pract Res Cl Ga.**, v. 21, n. 2, p. 335-346, 2007.

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

FRENCK, R.W.; CLEMENS, J. *Helicobacter* in the developed world. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 705-713, 2003.

GISBERT, P.A.; HEISER, G. Salt and health: the CASH and BPA perspective. **Nutr Bull.**, v. 30, p. 62-69, 2005.

GOODWIN, C.S; ARMSTRONG, J.A; CHILVERS, T; PETERS, M; COLLINS, M.D; SLY, L; MCCONNELL, W; HARPER, W.E.S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. **Int J Syst Bacteriol.**, n.39, p.397-405, 1989.

GRIFFIN, S.G; WYLLIE, G.; MARKHAM, J.L. LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p.322-332, 1999.

GUEDES, M.M. **Estudos dos efeitos antinociceptivos e gastrointestinais do extrato hidroalcoólico de *Egletes viscosa* Less. e seus constituintes diterpenóides**. 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

HOLTON, J. Clinical relevance of culture: why, how, and when. **Helicobacter**, v. 2, suppl. 1, p. 25-33, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=mapa.asp&ID=4>. Acesso em: 20 jan. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=329. Acesso em: 20 jan. 2008.

JÚNIOR, F.A. Soroprevalência e fatores de risco para infecção por *Helicobacter pylori*. **J Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 79, n° 1, p.3-4, 2003.

KELLEY, J.R.; DUGGAN, J.M. Gastric cancer epidemiology and risk factors. **J Clin Epidemiol.**, v. 56, p. 1-9, 2003.

KODAIRA, M.S., ESCOBAR, A.M.U., GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Rev Saude Publ.**, v. 36, n. 3, p. 356-369, 2002.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, ed.1999/2000, Rio de Janeiro,1999.

KUSTERS, J.G., GERRITS, M.M., VAN STRIJP, J.A.G., VANDENBROUCKE-GRAULS, M.J.E. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infect Immun.**, v. 65, n. 9, p. 3672-3679, 1997.

LA CRUZ, M.G. **O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social** – Governo do Estado do Mato Grosso, 2005.

- LEE, J.H.; SHIM, J.H.; ROE, I. H.; SOHN, S.G.; LEE, J.H.; KANG, G.H.; LEE, H.K.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Impact of Clarithromycin Resistance on Eradication of *Helicobacter pylori* in Infected Adults. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n° 4, p. 1600-1603, 2005.
- LEHOURS, P.; YILMAZ, O. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.12, suppl. 1, p. 1-3, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.
- MAEDA, S. & MENTIS, A.F. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 12, suppl. 1, p. 10-14, 2007.
- MAGALHÃES, P.P.; QUEIROZ, D.M.M.; BARBOSA, D.V.C.; ROCHA, G.A.; MENDES, E.N.; SANTOS, A.; CORRÊA, P.R.V.; ROCHA, A.M.C.; TEIXEIRA, L.M.; OLIVEIRA, C.A. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 46,.n. 6, p. 2021-2023, 2002.
- MALATY, H.M. & NYREN, O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 8, suppl. 1, p. 8-12, 2003.
- MALEKZADEH, F.; EHSANIFAR, H.; SHAHAMAT, M.; LEVIN, M.; COLWELL, R.R. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. **Internat J Antimicrob Agents**, v. 18, p. 85-88, 2001.
- MARQUES, F.J.F. **Análise química e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas do nordeste brasileiro sobre *Streptococcus mutans***. 2007. 82f. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.
- MARSHALL, B.J. Unidentified curved bacilli on gastric in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 1, p. 1273-1275, 1983.
- MARSHALL, B. J. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clin Med.**, v. 2, n. 2, p. 147-152, 2002.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002.
- MÉGRAUD, F. & LAMOULIATTE, H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. **Aliment Pharmacol Ther** , v. 17, p. 1333-1343, 2003.
- MÉGRAUD, F.; LEHN, N.; LIND, T.; BAYERDORFFER, E.; O'MORAIN, C.; SPILLER, R.; UNGE, P.; ZNTEN, S.V.V.; WRANGSTADH, M.; BURMAN, C.F. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* in Large Multicenter Trial: the MACH 2 Study. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 43, n° 11, p. 2747-2752, 1999.
- MONTECCUCO, C., RAPPOULI, R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. **Nature Rev.**, v. 2, p. 457-466, 2001.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. *Helicobacter*. In: VERSALOVIC, J.; FOX, J.G. **Manual of clinical microbiology**. 8 ed., 2005. v. 1, cap. 58, p. 915-925.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL K.S.; PFAELLER, M.A. *Microbiologia Médica*. In: _____
Campylobacter e Helicobacter. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 33, p. 339-347.

NDIP, R.N.; MACKAY, W.G.; FARTHING, M.J.G.; WEAVER, L.T. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 36, n. 5, p. 616-622, 2003.

NGOAN, L.T.; YOSHIMURA, T. Work, salt intake and the development of stomach cancer. **Med Hypotheses**, v. 60, n. 4, p. 552-556, 2003.

NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, A.F.N.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 675-678, 1999.

NARIMAN, F.; EFTEKHAR, F.; HABIBI, Z.; FALSATI, T. Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian Plants. **Helicobacter**, v. 9, n. 2, p. 146-151, 2004.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol**, v. 31, n. 2, p. 247-256, 2000.

OFFIAH, V.N.; CHIKWENDU, U.A. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract In experimental animals. **J Ethnopharmacol.**, v.68, p.327-330, 1999.

OHNO, T., KITA, M., YAMAOKA, Y., IMAMURA, S., YAMAMOTO, T., MITSUFUGI, S., KODAMA, T., KASHIMA, K., IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 8, p. 207-215, 2003.

OLIVARES, D.; GISBERT, J.P. Factores implicados en la patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. **Rev Esp Enferm Dig.**, v. 98, n. 5, p. 374-386, 2006.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v. 108, p. 103-108, 2006.

ORAFIDIYA, L.O.; S.K. ADESINA, J.R.; IGBENEGHU, O.A.; AKINKUNMI, E.O.; ADETOGUN, G.E.; SALAU, A.O. The effect of honey and surfactant type on the antibacterial properties of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. against common wound-infecting organisms. **Int J Aromather.**, v. 16, p. 57-62, 2006.

PAJARES, J.M.; GISBERT, J.P. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. **Rev Esp Enferm Dig.**, v. 98, n. 10, p. 770-785, 2006.

- PASCUAL, M.E., SLOWING, K., CARRETERO, E., MATA, D.S., VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 201-204, 2001.
- PEREIRA, C.A.M.; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciênc Tecnol Aliment.**, v.27, n. 3, p. 624-632, 2007.
- PRABUSEENIVASAN, S., JAYAKUMAR, M., IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complement Altern Med.**, v. 6, n. 39, 2006.
- QUEIROZ, D.M.M., MENDES, E.N., ROCHA, G.A. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. **J Clin Microbiol.**, v. 25, n. 12, p. 2378-2379, 1987.
- QUEIROZ, D.M.M. & LUZZA, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 11, suppl. 1, p. 1-5, 2006.
- RADOSZ-KOMONIEWSKA, H., BEK, T., JÓZWIAK, J., MARTIROSIAN, G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Microbiol Infect.**, v. 11, p. 602-610, 2005.
- ROCHA, A.F.G. *Helicobacter pylori* – Diagnóstico pelo teste respiratório. **AC. Gastroenterol.**, v.39, n.1, p. 9-13, 1996.
- RODRIGUES, M.N., QUEIROZ, D.M.M, RODRIGUES, R.T, ROCHA, A.M.C., BRAGA NETO, M.B., BRAGA, L.L.B.C. *Helicobacter pylori* infection in adults from a poor urban community in northeastern Brazil: demographic lifestyle and environmental factors. **Braz J Infect Dis.**, v. 9, n. 5, p. 405-410, 2005.
- RODRIGUES, M.N., QUEIROZ, D.M.M., RODRIGUES, R.T., ROCHA, A.M.C., LUZ, C.R.L., BRAGA, L.L.B.C. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Rev Saude Publ.**, v. 39, n. 5, p. 847-849, 2005.
- ROMA-GIANNIKOU, E., KARAMERIS, A., BALATSOS, B., PANAYIOTOU, J., MANIKA, Z., VAN-VLIET, C., ROKKAS, T., SKANDALIS, N., KATTAMIS, C. Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori*: a genetic analysis. **Helicobacter**, v.8, n. 1, p. 15-20, 2003.
- SANTOS, F.S.D. Tradições populares de uso de plantas medicinais na Amazônia. **História, Ciência e Saúde**, Manguinhos, v. VI , p. 919-939, set. 2000.
- SANTOS, I.S., BOCCIO, J., SANTOS, A.S., VALLE, N.C.J., HALAL, C.S., BACHILLI, M.C., LOPES, R.D. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and associated factors among adults in Southern Brazil: a population-based cross-sectional study. **BMC Public Health**, v. 5, n. 118, 2005.
- 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.**, v. 35, p. 128-133, 2002.

SIAVOSHI, F., SALMANIAN, A.H.; KBARI, F.A., MALEKZADEH, R., MASSARRAT, S. Detection of *Helicobacter pylori* specific genes in the oral yeast. **Helicobacter**, v. 10, n. 4, 2005.

SILVA-FILHO, F. A.; LIMA, M.A.; BEZERRA, A.M.E.; BRAZ FILHO, R.; SILVEIRA, E.R. A Labdane Diterpene from the Aerial Parts of *Egletes viscosa* Less. **J Braz Chem Soc.**, v. 18, n. 7, p.1374-1378, 2007.

SIQUEIRA, J.S.; LIMA, P.S.S.; BARRETO, A.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*. **RBAC**, v.39, n. 1, p. 9-13, 2007.

SOUSA, M.F. **Investigação das ações antiinflamatórias da ternatina**. 1998. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

SOUZA, M. F; SANTOS, F. A; RAO, V. S. N; SIDRIM, J. J. C; MATOS, F. J. A; MACHADO, M. I. L; SILVEIRA, E. R. **Phytother Res.**, v.12, n.1, p. 28-31, 1998.

STAMATIS, G., KYRIAZOPOULOS, P., GOLEGOU, S., BASAYIANNIS, A., SKALTSAS, S., SKALTSA, H. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. **J Ethnopharmacol.**, v. 88, p. 175-179, 2003.

SUERBAUM, S. & MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. **N Engl J Med.**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002.

SUN, J., AOKI, K., ZHENG, J.X., SU, B.Z., OUYANG, X.H., MISUMI, J. Effect of NaCl and *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on cytokine expression and viability. **World J Gastroenterol.**, v. 12, n. 14, p. 2174-2180, 2006.

TSUGANE, S. Salt, salt food intake, and risk of cancer gastric: epidemiologic evidence. **Cancer Sci.**, v.96, n. 1, p. 1-6, 2005.

TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the risk of cancer gastric: review of epidemiological evidence. **Gastric Cancer**, v. 10, p. 75-83, 2007.

TSUJI, S.; KAWAI, N.; TSUJII, M.; KAWANO, S.; HORI, M. Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis - a perigenetic pathway". **Aliment Pharmacol Ther.**, v.18 (Suppl 1), p. 82-89, 2003.

VARGAS, A.V., LOUREIRO, A.P., WITT, N.M., COSTA, N.M., SÁ E SILVA, M., VIANA, L.R. Atividade antibacteriana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciência rural**, v. 34, n. 1, p. 154-163, 2004.

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

YAMAGUCHI, N.; KAKIZOE, T. Synergistic interaction between *Helicobacter pylori* gastritis and diet in gastric cancer. **Lancet Oncol.**, v. 2, p. 84-94, 2001.

WANG, Y.C.; HUANG, T.L. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Plumbago zeylanica* L. **FEMS Immunol Med Microb.**, v. 43, p. 407-412, 2005.

WANG, W.H.; WONG, W.M.; DAILIDIENE, D.; BERG, D.E.; GU, Q.; LAI, K.C.; LAM, S.K.; WONG, B.C.Y. Aspirin inhibits the growth of *Helicobacter pylori* and enhances its susceptibility to antimicrobial agents. **Gut**, v.52, p. 490-495, 2003.

WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli on gastric in active chronic gastritis. **Lancet**, v. 1, p. 1273, 1983.

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

ANEXO I

Meios de cultura utilizados

- ✓ BHI caldo (Infusão de cérebro e coração) - OXOID
 - BHI pó37g
 - Água destilada1000ml

- ✓ Meio Belo Horizonte
 - Brucella Agar (BBL)100ml
 - Vancomicina (Sigma)6mg
 - Ácido nalidíxico (Sigma)20mg
 - Cicloheximida (Sigma)100mg
 - Cloreto de trifetil tetrazólio (Riedel)100ml
 - Sangue de carneiro10ml

- ✓ BHI agar (Infusão de cérebro e coração) - OXOID
 - BHI agar52g
 - Água destilada1000ml

- ✓ BHI caldo + glicerol (estoque)
 - BHI pó 37g
 - Glicerol2%
 - Água Destilada1000ml

ANEXO II

Preparação de meios de culturas e suplementos

✓ BHI caldo

Brain Heart Infusion Broth (BHI)	3,7g
Água destilada	100mL
Glicerol	25%

Autoclavar e distribuir asépticamente 1,0mL do meio em cada tubo eppendorf.

✓ Meio Belo Horizonte (BHM)

Brucella Agar (BBL)	100ml
Vancomicina (Sigma)	6mg
Ácido nalidíxico (Sigma)	20mg
Cicloheximida (Sigma)	100mg
Cloreto de trifetil tetrazólio (Riedel)	100ml
Sangue de carneiro	10ml

✓ Vancomicina

60mg-----1000	Pesar 0,06g
6mg-----100	60mg - 10ml (sol. Mãe)
0,6mg-----10	6mg/mL
0,01ml (10µl) para cada 10ml de meio	

✓ Ácido nalidíxico

20mg -----1000	Pesar 0,02g
2mg -----100	20mg – 10ml
0,2mg-----10	T=2mg/ml
0,01ml para 10ml de meio	

Dissolver o ácido nalidíxico primeiramente com o NaOH 1N e depois diluir com água destilada.

✓ **Cicloheximida**

Cicloheximida ---0,5g

Etanol P.A. -----25ml

Água destilada ---- 25ml

Filtrar e distribuir em alíquotas de 0,5ml para 100 ml de agar ou 0,05ml (50 μ l) para 10ml de meio.

✓ **Cloreto de trifeniltetrazólio**

Pesar 0,48g ---10ml (solução mãe)

T=4mg/ml

Tirar 0,1ml para 10ml de meio

ANEXO III

Identificação das colônias

✓ Teste da oxidase

Retirar algumas colônias suspeitas utilizando uma haste de madeira e esfregar sobre uma fita oxidase. Se o local da fita onde forem aplicadas as colônias houver desenvolvimento imediato da cor roxa, a prova é positiva; se, ao contrário, não houver alteração na cor, o teste é negativo.

✓ Teste da catalase

Colocar uma gota de H_2O_2 a 3% sobre uma lâmina de vidro. Emulsionar a colônia sobre a gota de H_2O_2 . Se houver formação imediata de bolhas, o teste é positivo; se, ao contrário, não formar bolhas, o teste é negativo.

✓ Teste rápido da uréia

Emulsionar algumas colônias suspeitas em um tubo contendo caldo uréia. Se houver mudança imediata na cor da solução de amarelo para rosa, o teste é positivo.