

# Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori in vitro* de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica

Evaluation of antioxidant and anti-*Helicobacter pylori in vitro* potential of medicinal plant extracts popularly used in Amazon

DOI 10.5935/2446-4775.20170023

Nascimento, Juliana E. C.<sup>1</sup>; Reatgui, Walberson da S.<sup>1</sup>; Araújo, Luciana S. de<sup>1</sup>; Ribeiro, Maria Elizelma da S.<sup>1</sup>; Maia, Daniela C. S.<sup>1</sup>; Giacomini, Leandro L.<sup>1,2</sup>; Kitagawa, Rodrigo R.<sup>3</sup>; Baratto, Leopoldo C.<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA, Av. Marechal Rondon, s/n, Caranazal, CEP: 68040-070, Campus Santarém, PA, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA, Herbário HSTM, Santarém, PA, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Laboratório de Triagem de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, CEP: 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Farmácia, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, CEP: 21941-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*Correspondência: [leopoldo.ufrj@gmail.com](mailto:leopoldo.ufrj@gmail.com)

## Resumo

A região amazônica contempla uma enorme diversidade de espécies de plantas que contribuem para uma vasta riqueza natural. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante, anti-*Helicobacter pylori* e atividade inibitória da enzima urease *in vitro* de extratos de espécies de plantas medicinais usadas popularmente na região oeste do Pará. Foram realizados ensaios antimicrobianos através da técnica espectrofotométrica de microdiluição em caldo, antioxidante pelos ensaios de DPPH e ABTS<sup>•+</sup> e de inibição da urease. O extrato etanólico de folhas de *Schnella* sp. apresentou o melhor potencial antioxidante frente aos dois métodos, com  $CI_{50} = 6,35 \mu\text{g/mL}$  (DPPH) e  $1,81 \mu\text{g/mL}$  (ABTS<sup>•+</sup>) e, ainda, o maior percentual de inibição da urease (45%) na concentração de  $1024 \mu\text{g/mL}$ . O extrato etanólico da resina de breu-branco inibiu 82,8% ( $512 \mu\text{g/mL}$ ) do crescimento da bactéria. Estes resultados, em conjunto, evidenciam o potencial das espécies vegetais utilizadas na região oeste do Pará, na busca por moléculas com ação antioxidante e antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Antioxidante. *Helicobacter pylori*. Urease. Antimicrobiano. Amazônia.

## Abstract

The Amazon region has an enormous diversity of plant species, which contributes to its known vast natural wealth. In this context, the aim of this work was to evaluate the antioxidant, anti-*Helicobacter pylori* and anti-urease potentials of medicinal plant extracts popularly used in the western Pará, northern Brazil. Antimicrobial assays were carried out using spectrophotometric broth microdilution technique, the antioxidant potential by the DPPH and ABTS<sup>•+</sup> assays and anti-urease activity by inhibition of the enzyme urease. The ethanolic extract of leaves of *Schnella* sp. showed the best antioxidant potential in both methods, with IC<sub>50</sub>= 6.35 µg/mL (DPPH) and 1.81 µg/mL (ABTS<sup>•+</sup>) and the highest percentage of inhibition of urease (45%) at 1024 µg/ml. The ethanolic extract of the resin of “breu-branco” inhibited 82.8% (512 µg/mL) of the bacterial growth. These results together show the potential of the plant species used in the western Pará, in the search for molecules with antioxidant and antimicrobial action.

**Keywords:** Antioxidant. *Helicobacter pylori*. Urease. Antimicrobial. Amazon rainforest.

---

## Introdução

Na região amazônica, ainda que não conclusivo, estima-se a existência de aproximadamente 60.000 espécies de plantas contribuindo para uma vasta riqueza natural. Considerando essa estimativa, são necessários investimentos em ciência e tecnologia, proteção e valorização dos recursos naturais e, principalmente, a importância dos conhecimentos tradicionais associados à biodiversidade (Albagli, 2010). O conhecimento tradicional tem fornecido informações valiosas para a descoberta de novos agentes antimicrobianos a partir das plantas (Duraipandiyar, Ayyanar e Ignacimuthu, 2006), destacando a importância da medicina popular na busca por moléculas eficazes contra micro-organismos cada vez mais resistentes (Lopez, Hudson e Towers, 2001), como por exemplo *Helicobacter pylori*.

*H. pylori* é um bacilo em forma de espiral, Gram-negativo, encontrado na mucosa que reveste o estômago humano e tem sido associado a diferentes doenças gastrointestinais, principalmente úlceras gástricas, sendo um dos patógenos humanos que mais prevalece em todo o mundo (Khalifa, Sharaf e Aziz, 2010). Estima-se que metade da população mundial esteja contaminada por *H. pylori*, com uma proporção maior nos países em desenvolvimento. As vias de transmissão não estão esclarecidas, mas as vias oral-oral e oral-fecal são consideradas as principais formas de transmissão (Kodaira, Escobar e Grisi, 2002; Ladeira, Salvadori e Rodrigues, 2003). Fatores como variação geográfica, idade, sexo, predisposição genética, etnia, nível educacional e saneamento contribuem para o aumento de sua incidência e prevalência (Khalifa, Sharaf e Aziz, 2010). A ingestão de água contaminada por fezes evidencia um modo importante de se adquirir a infecção, principalmente em localidades com ínfimas condições de saneamento básico e distribuição de água potável, como é o caso da maioria das cidades na região Norte do Brasil (Kodaira, Escobar e Grisi, 2002; Ladeira, Salvadori e Rodrigues, 2003).

Hoje se reconhece que mais de 95% das úlceras são causadas por *H. pylori* (Núcleo Brasileiro para Estudo do *Helicobacter pylori*, 2017). O mecanismo de formação das úlceras não está totalmente elucidado, mas sabe-se que as ocorrências associadas ou isoladas com *H. pylori* podem provocar ulcerações, e que o excesso de radicais livres produzidos durante a infecção pode danificar consideravelmente algumas membranas biológicas (Borrelli e Izzo, 2000).

Associado ao interesse pela busca de novas substâncias com potencial antimicrobiano contra *H. pylori*, a procura por moléculas antioxidantes também mostra-se importante no combate à infecção desta bactéria. A investigação dos antioxidantes naturais por meio de extratos vegetais evidencia benefícios, tendo em vista a baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos (Bergamaschi, 2010).

Nesse contexto, dentre os compostos bioativos produzidos pelas plantas, os compostos fenólicos, entre eles flavonoides, taninos e cumarinas, destacam-se devido a sua ação antioxidante. Os antioxidantes podem retardar ou inibir a oxidação de substratos, auxiliando na eliminação de radicais livres e principalmente nas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cooper, 2005).

Os radicais livres tendem a ser moléculas altamente instáveis, que possuem orbitais, contendo um elétron desemparelhado, e podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada ou quando um átomo ou molécula recebe um só elétron transferido durante uma reação de oxirredução. Eles são capazes de alterar quimicamente muitos tipos de moléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Karp, 2005).

Além da produção excessiva de EROS, outro fator de virulência da *H. pylori* é a enzima urease. Vários estudos mostraram que a urease desempenha papel central na patogênese da bactéria, uma vez que a enzima é essencial para a colonização bem-sucedida do micro-organismo na mucosa gástrica e para o desencadeamento de uma vigorosa resposta imune (Moblely, 1996). Ureases são capazes de catalisar a hidrólise de ureia obtendo-se amônia e carbamato. Por conseguinte, o carbamato decompõe-se obtendo outra molécula de amônia e ácido carbônico (Moblely, Island e Hausinger 1995). Grande parte das ureases sintetizadas pela *H. pylori* situa-se no citoplasma (Ladeira, Salvadori e Rodrigues, 2003). Algumas espécies de *H. pylori* produzem elevados níveis da enzima urease, principalmente em processos patogênicos por ocasionar mudança no pH tornando-o alcalino, dessa forma, evidenciando um ambiente propício para a colonização bacteriana. (Moblely, Island e Hausinger, 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial anti-*H. pylori* e antioxidante *in vitro*, além da atividade inibitória da enzima urease, envolvida em processos de formação de úlcera gástrica relacionada àquela bactéria, de extratos de plantas medicinais usadas popularmente na região oeste do Pará (Amazônia Central).

## Material e Métodos

### Material Vegetal

O material vegetal utilizado foi oriundo do oeste do Pará, região Norte do Brasil, nos municípios de Santarém, Belterra e Rurópolis, sendo este último na Comunidade São José, entre os meses de maio a junho de 2015. A região em questão é área de atuação direta da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). As espécies vegetais foram devidamente identificadas e materiais testemunho foram depositados no Herbário HSTM da UFOPA, na forma de exsicatas (dados disponíveis para consulta em <http://hstm.jbrj.gov.br/>). Foram obtidas amostras das seguintes espécies (epítetos específicos são seguidos do município e dos números de tombo do Herbário HSTM): folhas de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Fabaceae) (Santarém, HSTM – 004653/004654); folhas de *Genipa americana* L. (Rubiaceae), (Rurópolis, HSTM - 004655); folhas e látex de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae) (Santarém, HSTM - 000601), sendo o látex de *H. articulatus* coletado a partir de incisões no caule por meio de um estilete; folhas de *Kalanchoe pinnata* Pers. (Crassulaceae) (Rurópolis, HSTM - 000602); folhas de

*Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance (Chrysobalanaceae) (Santarém, HSTM - 004422); partes aéreas de *Portulaca pilosa* L. (Portulacaceae) (Santarém, HSTM-00601); folhas de *Schnella* sp. (Fabaceae) (Rurópolis, HSTM-004652); folhas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) (Santarém, HSTM-000019); resina de breu-branco (*Protium* sp., Burseraceae), adquirido em feira popular de plantas e ervas medicinais de Santarém (testemunho não produzido). Os nomes aqui empregados seguem o que é aceito na Flora do Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>) para espécies nativas, sendo que para espécies subespontâneas cultivadas não citadas nessa fonte utilizou-se o conceito do The Plant List (<http://www.theplantlist.org>). As grafias e autorias dos nomes utilizados foram checadas no International Plant Names Index (<http://www.ipni.org>).

### **Preparo dos Extratos Brutos**

O material vegetal foi seco em estufa a uma temperatura de 40°C, moído e macerado em álcool etílico absoluto durante sete dias, à temperatura ambiente, com agitação ocasional, ao abrigo da luz. Os extratos foram filtrados em algodão e evaporados até a secura em rotaevaporador. O látex de *H. articulatus* não passou por nenhum processo de preparação e foi utilizado *in natura*.

## **Avaliação da Atividade Anti-*Helicobacter pylori***

### **Cultivo do *H. pylori***

Cepas de *H. pylori* (ATCC 43504) foram cultivadas em ágar Columbia contendo 5% de sangue de carneiro a 36-37°C, numa atmosfera de 5% de O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% de atmosfera de N<sub>2</sub> durante três dias. Após esse período, foram recolhidas e suspensas em tampão fosfato-salino (PBS) (Bonacorsi et al., 2013).

### **Antimicrobianos padrões**

Soluções de amoxicilina nas concentrações de 0,065 a 4 µg/mL e metronidazol nas concentrações de 16 a 512 µg/mL foram os padrões de antibióticos utilizados como controle nos ensaios antimicrobianos.

### **Diluição dos extratos brutos**

Os extratos etanólicos e o látex de *H. articulatus* foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo empregada a concentração de 40 mg/mL.

### **Microdiluição em caldo**

A atividade anti-*H. pylori* dos extratos brutos foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com a norma CLSI (M7-A6, 2003), com modificações. A cada poço da microplaca adicionou-se 100 µL de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com 10% de soro fetal bovino com diversas concentrações dos extratos obtidos por diluição seriada 1:2 (1024 µg/mL a 32 µg/mL), e o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> bactérias/mL). A microplaca foi submetida à leitura espectrofotométrica em 620 nm em leitor de microplaca iMark®, BioRad (Washington, USA) e, em seguida, incubada à temperatura de 36-37°C, em atmosfera contendo 10% de CO<sub>2</sub>, por 72 h. Após esse período, a microplaca foi homogeneizada e nova leitura realizada para determinação da CIM. Os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de

crescimento controle. A CIM foi definida, graficamente, como sendo a menor concentração do extrato que induziu a um brusco declínio no valor da absorvância de no mínimo 90% do crescimento bacteriano, o qual foi mantido nas concentrações seguintes e próximas a zero.

## Avaliação da Atividade Antioxidante

### Ensaio de sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos sobre o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) foi determinada utilizando o método de Yamaguchi et al. (2000), modificado. Em microplaca de 96 poços, adicionou-se 200 µL de uma solução de DPPH (0,004%) em etanol 99% e 100 µL dos extratos-teste em diversas concentrações obtidas por diluição seriada (100 a 0,39 µg/mL). A mistura foi incubada ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 30 min, sendo então observada a alteração da absorvância do DPPH a 540 nm em leitor de microplaca. A partir dos valores das absorvâncias obtidos calculou-se a  $CI_{50}$ . O ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®) foi a substância utilizada como controle antioxidante. O ensaio foi realizado em triplicata.

### Ensaio de sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup>

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos sobre ABTS<sup>•+</sup> [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] foi determinada utilizando-se o método de Re et al. (1999), modificado. Inicialmente uma mistura aquosa de ABTS (7 mmol.L<sup>-1</sup>) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L<sup>-1</sup>) foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 h. A solução formada de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em etanol a uma absorvância de 0,70 (734 nm). O ensaio foi realizado com 1000 µL da solução de ABTS<sup>•+</sup> para 10 µL de cada concentração de extrato (200 a 0,10 µg/mL). Após 10 min, alíquotas de 200 µL foram transferidas para microplacas de 96 orifícios e incubadas por 30 min a temperatura ambiente e a redução do ABTS<sup>•+</sup> pelos extratos foi observada no comprimento de onda 750 nm em leitor de microplaca. A partir dos valores das absorvâncias obtidos calculou-se a  $CI_{50}$ . O Trolox® foi a substância utilizada como controle antioxidante. O ensaio foi realizado em triplicata.

### Ensaio de Inibição da Urease

O ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Tanaka, Kawase e Tani (2004), com modificações, baseado no princípio da conversão de ureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) em amônia (NH<sub>3</sub>) através da catálise enzimática. Utilizou-se uma isoforma de urease da planta *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) homóloga a urease presente em *H. pylori*, as quais possuem forma terciária idêntica. Utilizou-se microplacas de 96 poços, com a adição de 25 µL de urease 4UI (Jack Bean urease tipo III) e 25 µL dos extratos-teste em diversas concentrações (32 a 1024 µg/mL), com incubação por 2h em temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se 25 µL de vermelho de fenol (0,02%) e 200 µL de ureia (50 mM) em tampão fosfato 100 mM (pH 6,8). Efetuou-se a leitura imediata em leitor de microplaca iMark®, BioRad (Washington, USA) no tempo zero  $t=0$  com posterior leitura a cada 5 min para o registro da reação, terminando no tempo trinta  $t=30$  a 540 nm. A partir dos valores das absorvâncias obtidas foi possível calcular a porcentagem de atividade de urease. O ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) foi a substância utilizada como padrão de inibição. O ensaio foi realizado em triplicata.

## Resultados e Discussão

### Avaliação da Atividade Anti-*H. pylori*

Para avaliação da atividade anti-*H. pylori* realizou-se primeiramente uma triagem de todos os extratos. No entanto, muitos extratos não apresentaram nenhuma inibição do crescimento bacteriano. As amostras selecionadas para o ensaio foram: extratos de resina de breu-branco, *K. pinnata*, *Schnella* sp., *H. articulatus*, *G. americana* e *S. malaccense* e o látex de *H. articulatus*.

Nenhum dos extratos etanólicos atingiu a concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>), ou seja, nenhum extrato foi capaz de inibir o crescimento da bactéria em 90%. Entretanto, o resultado mais promissor foi observado com o extrato da resina de breu-branco, a qual inibiu em 82,8% na concentração de 512 µg/mL o crescimento bacteriano. Outro extrato com elevado potencial inibitório de *H. pylori* foi o de *Schnella* sp., com inibição de 73,4% na concentração de 256 µg/mL. Os demais extratos testados apresentaram inibição abaixo de 50%. A amoxicilina apresentou CIM<sub>90</sub> em 0,5 µg/mL com porcentual de inibição de 91,9% destacando a sensibilidade da cepa; metronidazol não apresentou CIM, confirmando a resistência bacteriana ao antibiótico. Os resultados da atividade anti-*H. pylori* (TABELA 1).

**TABELA 1** – Valores referentes aos potenciais de inibição de *H. pylori* na presença dos extratos etanólicos de plantas medicinais amazônicas.

Extratos e Controles	Concentração testada [µg/mL]	Concentração mais ativa [µg/mL]	Inibição (%)
<i>G. americana</i>	1024 a 256	512	14,8
<i>H. articulatus</i>	1024 a 256	1024	40,1
<i>H. articulatus</i> (látex)	1024 a 256	1024	24,4
<i>K. pinnata</i>	1024 a 32	1024	47,6
<i>Protium</i> sp.	1024 a 32	512	82,8
<i>S. malaccense</i>	1024 a 256	1024	24,2
<i>Schnella</i> sp	1024 a 32	256	73,4
Amoxicilina*	4 a 0,065	4	100
Metronidazol	512 a 16	512	48,6

\*concentração na qual a amoxicilina inibe o crescimento bacteriano em 100%. Porém, a CIM<sub>90</sub> é a 0,5 µg/mL.

Embora neste estudo o extrato de *S. malaccense* não tenha atingido a CIM para *H. pylori*, há dados na literatura que evidenciam potencial antimicrobiano e antiulcerogênico de espécies do mesmo gênero. Estudo realizado por Araújo (2014) para avaliar a atividade anti-*H. pylori* dos extratos etanólico, hexânico e aquoso, e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e aquosa das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels por meio da técnica de difusão em disco não apresentou inibição de crescimento em nenhuma das concentrações avaliadas. Já o óleo essencial das folhas apresentou atividade inibitória tanto para técnica de difusão em disco quanto para determinação da CIM, que foi atingida na concentração de 205 µg/mL. Donatini et al. (2009) avaliaram a atividade antiulcerogênica aguda do extrato hidroetanólico a 70%

liofilizado de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston na dose de 400 mg/kg, o qual apresentou excelente efeito preventivo de lesões gástricas em modelo de indução de úlcera por etanol/HCl em ratos.

Braz, Oliveira e Viana (2013) obtiveram resultados significantes de ação gastroprotetora do extrato aquoso de *K. pinnata* em modelos de úlcera induzida por indometacina em camundongos, corroborando que possivelmente o efeito antiulcerogênico esteja relacionado com a presença de flavonoides e taninos.

### Avaliação da Atividade Antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante realizou-se primeiramente uma triagem de todos os extratos. Os extratos etanólicos de *Schnella* sp., *M. rigida* e *L. ferrea* apresentaram os resultados mais promissores, com valores de  $CI_{50}$  no ensaio de DPPH 6,35  $\mu\text{g/ml}$ , 14,76  $\mu\text{g/ml}$  e 10,57  $\mu\text{g/ml}$ , e no ensaio de ABTS<sup>•+</sup> 1,81  $\mu\text{g/ml}$ , 3,36  $\mu\text{g/ml}$  e 2,77  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, quando comparados ao Trolox<sup>®</sup>. Os extratos de *H. articulatus* apresentaram  $CI_{50}$  em torno de 40,00  $\mu\text{g/ml}$  pelo ensaio de DPPH e  $CI_{50}$  de aproximadamente 15,00  $\mu\text{g/ml}$  pelo ensaio do ABTS<sup>•+</sup>, enquanto o extrato de *S. malaccense* apresentou  $CI_{50}$  = 23,29 e 6,56  $\mu\text{g/ml}$  pelos testes do DPPH e ABTS<sup>•+</sup>, respectivamente. Os extratos de *K. pinnata* e *G. americana* apresentaram resultados semelhantes, com  $CI_{50}$  de 61,05 e 59,36  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, no ensaio do DPPH, e  $CI_{50}$  de 13,97 e 13,93  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, no ensaio do ABTS<sup>•+</sup>. Por outro lado, o látex de *H. articulatus*, assim como o extrato de *P. pilosa* e a resina de breu-branco foram considerados inativos, com  $CI_{50}$  acima de 100  $\mu\text{g/ml}$  em ambos os ensaios. Os resultados de  $CI_{50}$  de todos os extratos avaliados (TABELA 2).

**TABELA 2** – Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos etanólicos de plantas medicinais frente aos ensaios de atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS<sup>•+</sup>.

Extrato etanólico	DPPH ( $CI_{50}$ , $\mu\text{g/ml}$ )	ABTS <sup>•+</sup> ( $CI_{50}$ , $\mu\text{g/ml}$ )
<i>G. americana</i>	59,36	13,93
<i>H. articulatus</i> (folhas)	39,76	15,35
<i>H. articulatus</i> (látex)	>100	>100
<i>K. pinnata</i>	61,05	13,97
<i>L. ferrea</i>	10,57	2,77
<i>M. rigida</i>	14,76	3,36
<i>P. pilosa</i>	>100	>100
<i>Schnella</i> sp.	6,35	1,81
<i>S. malaccense</i>	23,29	6,56
Protium sp.	>100	>100
Trolox <sup>®</sup>	5,24	1,62

A maioria das espécies vegetais, avaliada neste trabalho pelos métodos DPPH e ABTS<sup>•+</sup>, possuem compostos fenólicos reconhecidamente capazes de sequestrar radicais livres, o que justifica o potencial antioxidante, como é o caso de *G. americana*, *S. malaccense*, *K. pinnata*, *M. rigida* e *L. ferrea*.

Em um estudo realizado por Porto et al. (2010), o extrato alcoólico dos frutos de *G. americana* apresentou  $CI_{50}$  de 606,7 µg/ml no ensaio de sequestro do radical DPPH. Pacheco et al. (2014) avaliaram também a atividade antioxidante do extrato etanólico dos frutos dessa mesma espécie obtendo valor de porcentagem de inibição de oxidação do radical livre DPPH de 70,2%, o que pode ser justificado pelos altos teores de vitamina C e compostos fenólicos presentes nos frutos.

Zambelli et al. (2006) detectaram em testes fitoquímicos a presença significativa de taninos, flavanonas, flavonóis, flavonas, flavonóis e xantonas e constataram a atividade antioxidante das frações acetato de etila, metanólica e do extrato bruto de *S. malaccense* com os respectivos índices de varredura 89,70%, 91,16% e 91,32% pelo método sequestrador de radicais livres DPPH. Savi (2015) identificou ácido gálico, catequina, rutina, miricetina e quercetina no extrato das folhas de *S. malaccense*. Nunes (2015) determinou em extratos da mesma espécie quantidades relevantes de ácido ascórbico, flavonoides, antocianinas e fenólicos totais.

Sousa, Silva e Rosa (2010) verificaram baixa atividade antioxidante para o extrato etanólico das folhas de *K. pinnata* [sob o sinônimo *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken] frente ao DPPH, apresentando valores inferiores a 50% em todas as concentrações testadas. Em outro estudo, Sobreira (2013) determinou a capacidade antioxidante do extrato bruto de *K. pinnata* cujo  $CI_{50}$  foi 72,63 µg/ml; fração acetato de etila 41,91 µg/ml e fração aquosa 110,02 µg/ml. *K. pinnata* é rica em flavonoides (quercitrina e quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1→2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo), substâncias conhecidamente antioxidantes, além de alcaloides, bufadienólídeos, antocianinas, taninos e mucilagem (Sobreira, 2013; Cavalcante, 2013).

Martão (2013) relata excelentes resultados da atividade antioxidante de extratos etanólicos de algumas espécies do gênero *Protium*, conhecidas como breu, pelo método DPPH, as quais apresentaram melhores resultados de  $CI_{50}$  em relação ao padrão de *Ginkgo biloba* L. (Gikgoaceae) (*G. biloba*,  $CI_{50}$  32,04±0,17 µg/ml; *P. subserratum*,  $CI_{50}$  8,96±0,11 µg/ml; *P. trifoliolatum*,  $CI_{50}$  12,21±0,15 µg/ml).

Um estudo realizado por Macedo (2011) avaliou a capacidade antioxidante de extratos etanólico, aquoso e hidroetanólico das folhas de *M. rigida* pelo método de redução do DPPH, no qual o extrato etanólico apresentou o melhor resultado na concentração de 500 µg/mL (72,62%), em relação aos demais extratos. Farias et al. (2013) avaliaram a capacidade antioxidante de sementes de *M. rigida* e *Moquilea tomentosa* Benth., através do mesmo método de redução do radical DPPH, obtendo respectivamente os valores de  $CI_{50}$  de 487,51 µg/mL e 216,72 µg/mL. *M. rigida* que contém principalmente taninos, flavonoides e saponinas (Pessoa, 2015).

Oliveira (2013) avaliou o potencial antioxidante pelo método do DPPH do extrato metanólico e suas frações (diclorometano e aquosa) das raízes secas de *H. succuba* e obteve  $CI_{50}$  de 265,62 µg/mL para a fração diclorometano e  $CI_{50}$  849,55 µg/mL para a fração aquosa, indicando, desta forma, uma baixa capacidade de sequestro do radical.

Barros (2012) realizou avaliação do potencial antioxidante pelo método de DPPH do extrato aquoso da vagem e da casca de *L. ferrea*, obtendo, respectivamente,  $CI_{50}$  de 7,90 e 8,70 µg/mL. Em outro estudo,



Nascimento et al. (2015) verificaram o potencial antioxidante dos extratos etanólicos das vagens de *L. ferrea* pelos métodos de DPPH obtendo  $CI_{50}$  de 4,40  $\mu\text{g/mL}$  e ABTS com  $CI_{50}$  de 2,50  $\mu\text{g/mL}$ .

### Ensaio de Inibição da Enzima Urease

Para avaliação do ensaio de inibição da urease realizou-se primeiramente uma triagem de todos os extratos. O ensaio teve como objetivo avaliar se os extratos possuíam a capacidade de inibir a enzima, pois ela é elemento chave para colonização, sobrevivência e neutralização da acidez no entorno da bactéria. A maioria dos extratos não apresentou atividade inibitória expressiva da enzima. Entretanto, três extratos apresentaram atividade inibitória da urease (*S. malaccense*, 27%; *Schnella* sp., 45%; *M. rigida*, 35%), ainda que não expressiva quando comparados ao padrão de ácido bórico (71% de inibição), o qual foi utilizado como controle positivo (TABELA 3).

**TABELA 3** – Inibição (%) da enzima urease pelos extratos etanólicos de plantas medicinais coletadas na região oeste do Pará.

Extrato etanólico	Inibição (%) da enzima a 1024 $\mu\text{g/mL}$ <sup>(1)</sup>
<i>S. malaccense</i>	27%
<i>Schnella</i> sp.	45%
<i>M. rigida</i>	35%
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	71%

<sup>(1)</sup> inibição no tempo=20 min.

Embora a busca por inibidores da urease tenha crescido nos últimos anos, não há dados na literatura relacionados com as espécies deste trabalho, o que demonstra a relevância dessa triagem. A baixa atividade inibitória de extratos e produtos naturais sobre essa enzima já foi observada por outros autores. Num estudo recente realizado por Nunes (2016) foi verificado que a fração acetonitrila/clorofórmio de *Baccharis crispa* Spreng. [Sob o sinônimo *Baccharis trimera* (Less.) DC.] inibiu a urease em 36,24% na concentração de 1024  $\mu\text{g/mL}$ . Em outro estudo, Damasceno (2016) encontrou baixa atividade de inibição (12,3%) da enzima utilizando amostras contendo a isocumarina paepalantina obtida de *Paepalanthus latipes* Silveira (Eriocaulaceae).

### Conclusão

A infecção por *H. pylori* leva a uma excessiva produção de EROs por células de defesa, ocasionando danos ao tecido gástrico. Além do mais, a expressão da enzima urease propicia que a bactéria sobreviva ao ambiente ácido estomacal, favorecendo a formação de úlceras. Os resultados inferem que os extratos provenientes de plantas amazônicas utilizadas na região oeste do Pará apresentaram potencial antioxidante, antibacteriano e antiurease. O extrato de *Schnella* sp. foi o que apresentou o maior potencial antioxidante, quando comparado ao controle. O mesmo extrato obteve porcentagem de inibição da urease em torno de 50%. Com relação à atividade antibacteriana ressalta-se que apesar dos extratos não terem atingido a  $CIM_{90}$ , o valor de inibição do crescimento de *H. pylori* da resina do breu-branco foi maior que 80% e do extrato de *Schnella* sp. foi de 73,4%. Estes resultados, quando avaliados em conjunto, evidenciam principalmente o potencial dessas duas espécies vegetais comumente utilizadas como medicinais no oeste do Pará na busca por moléculas com ação antioxidante e antimicrobiana.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à UFOPA pela bolsa de mobilidade acadêmica conferida a J.E.C. Nascimento e ao suporte técnico do Laboratório de Triagem de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

## Referências

Albagli S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Revista “Parcerias estratégicas”**. 2010; 6(12): 05-19. ISSN: 2176-9729. [\[Link\]](#)

Araújo GM. **Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori* e citotóxica in vitro de extratos orgânicos obtidos das folhas de *Encholirium spectabile* e *Syzygium cumini***. Natal, RN. 78f. Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. UFRN, 2014. [\[Link\]](#)

Barros AO. **Avaliação das atividade antioxidantes e inibitória sobre enzimas elastase e colagenase e hialuronidase da *Libidibia ferrea* MART**. Manaus, AM. 69f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas. UFAM, 2012. [\[Link\]](#)

Bergamaschi KB. **Capacidade Antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 96p. Dissertação de Mestrado apresentada na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, 2010. [\[Link\]](#) [\[CrossRef\]](#)

Bonacorsi C, Fonseca LM, Raddi MSG, Kitagawa RR, Vilegas W. Comparison of Brazilian plants used to treat gastritis on the oxidative burst of *Helicobacter pylori*-stimulated neutrophil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013; (2013):1-8. ISSN: 1741-4288. [\[CrossRef\]](#)

Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**. 2000; 14(8): 581-591. ISSN: 1099-1573. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Braz DC, Oliveira LRS, Viana AFSC. Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso da *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. **Rev. Bras. Plantas Med.**. 2013;15(1): 86-90. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#)

Cavalcante R. **Fitodontologia**. Ed. do Autor: Rio Branco. 2013; 269p.

Cooper KH. **Revolução Antioxidante**. 3ª ed. Editora Record: Rio de Janeiro, 2005; 249p. ISBN: 9788501042675.

Damasceno JPL. **Estudo de solubilidade e das atividades antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* da isocumarina paepalantina obtida de *Paepalanthus latipes* Silv**. Vitória, ES. 83f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo. UFES, 2016. [\[Link\]](#)

Donatini RS, Ishikawa T, Barros S, Bacchi EM. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farmacog.** UFPR. 2009;19(1a): 89-94. ISSN: 1981-528X. [[CrossRef](#)]

Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary Altern. Med.** 2006; 6(1): 1. ISSN: 1472-6882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Farias DF, Souza TM, Viana MP, Soares BM, et al. Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Res. Int.** 2013; (2013): 1-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Karp G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3ª ed. Manole: Barueri, 2005. ISBN: 85-204-1593-8.

Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? **BioMed Central**. 2010; 2(1); 2. ISSN: 1757-4749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Kodaira MS, Escobar AMU, Grisi S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Rev. Saúde Pública**. 2002; 36(3): 356-69. ISSN: 1518-8787 [[CrossRef](#)]

Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopathology of *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 2003; 39(4): 335-342. ISSN: 1678-4774. [[CrossRef](#)]

Lopez A, Hudson JB, Towers GHN. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 2001; 77(2-3): 189-196. ISSN: 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Macedo JBM. **Capacidade antioxidante in vitro e avaliação da toxicidade aguda in vivo de extratos de folhas de *Licania rigida* Benth., *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch e *Couepia impressa* Prance (Chrysobalanaceae)**. Natal, RN. 104f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. UFRN, 2011. [[Link](#)]

Martão VM. **Atividade antioxidante in vitro de plantas medicinais da Amazônia Ocidental**. Porto Velho, RO. 97f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Fundação Universidade Federal de Rondônia. UNIR, 2013. [[Link](#)]

Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol. Rev.** 1995; 59(3): 451-480. ISSN: 1098-5557. [[PubMed](#)]

Mobley HL. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. **Aliment. Pharmacol. & Ther.** 1996; 10(supl 1): 57-64. ISSN: 1365-2036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Nascimento PLA, Nascimento TCS, Gomes JEG, Silva MDS, et al. A. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods. **Rev. Fitos Eletr.** 2015; 9(3): 207-216. ISSN 2446-4775. [[CrossRef](#)]

Núcleo Brasileiro para Estudo do *Helicobacter pylori* e Microbiota. Disponível em: [\[Link\]](#). Acesso em: 17/04/2017.

Nunes PC. **Caracterização física, química e avaliação da capacidade antioxidante do fruto jambo vermelho** (*Syzygium malaccense*). Recife, PE. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco. UFPE, 2015. [\[Link\]](#)

Nunes OC. **Avaliação in vitro da atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de extratos e frações de *Baccharis trimera* Less.** DC. Vitória, ES. 96f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Espírito Santo. UFES, 2016. [\[Link\]](#)

Oliveira AAD. **Análise fitoquímica dos extratos e frações obtidos de *Himatanthus sucuuba*.** Manaus, AM. 93p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas. UFAM, 2013. [\[Link\]](#)

Pacheco P, Paz JG, Silva CO, Pascoal GB. Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos do jenipapo (*Genipa americana* L.) in natura. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*. 2014; 9(4):1041-1054. ISSN: 2238-913X. [\[CrossRef\]](#)

Pessoa IP. **Caracterização química, atividade antioxidante e segurança de uso de sementes de *Licania rigida* Benth.** Fortaleza, CE. Dissertação de Mestrado apresentado Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. UFC, 2015. [\[Link\]](#)

Porto RGCL, Cunha EMF, Barros NVA, Silva MGSS, Moreira-Araújo RSR. **Correlação entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de vitamina C, antocianinas, flavonoides e fenólicos totais no Jenipapo (*Genipa americana* L.).** Universidade Federal do Piauí. 2010; 1-4. Disponível em: [\[Link\]](#)

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. & Med.* 1999; 26(9-10): 1231-1237. ISSN: 0891-5849. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Savi A. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos de folhas de jambo (*Syzygium malaccense*).** Pato Branco, PR. Trabalho de Conclusão de Curso. Departamento de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015. [\[Link\]](#)

Sobreira FC. **Avaliação da atividade antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Crassulaceae).** São Paulo, SP. 106f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. USP, 2013. [\[Link\]](#)

Sousa TO, Silva RAC, Rosa MSL. **Avaliação do potencial antioxidante pelo método DPPH do extrato etanólico das folhas de *Bryophyllum pinnatum*.** VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação - CONNEPI, 2010. Palmas.

Tanaka T, Kawase M, Tani S.  $\alpha$ -Hydroxyketones as inhibitors of urease. *Bioorg. Med. Chem.* 2004; 12(2): 501–505. ISSN: 0968-0896. [\[CrossRef\]](#)

Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Antioxidative and antiglycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **J. Agric. Food Chem.** 2000; 48(2): 180-185. ISSN: 1520-5118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Zambelli AR, Aguiar LA, Cunha AP, Vieira MGS, Cavalcanti ESB, Morais SM. **Avaliação do potencial antioxidante e análise do teor de taninos totais de *Syzygium malaccense***. In: Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, 2006. [[Link](#)]

---

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Histórico do artigo:** Submissão: 05/05/2017 | Aceite: 12/10/2017 | Publicação: 09/01/2018

**Como citar este artigo:** Nascimento JEC, Reatgui WS, Araújo LS, Ribeiro MES, Maia DCS, Giacomini LL, Kitagawa RR, Baratto LC. Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. **Revista Fitos.** Rio de Janeiro. 2017. v.11, n.2. p. 140-152. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/527>>. Acesso em: 11 maio 2017.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

---