



## **ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DE EXTRATO E FRAÇÕES DE *Paullinia cupana* FRENTE A *Helicobacter pylori***

Karina Miyuki Retamiro<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/Uem), César Armando Contreras Lancheros<sup>1</sup>, Eliana Harue Endo<sup>1</sup>, Celso Vataru Nakamura<sup>1</sup> (Co-orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com, João Carlos Palazzo de Mello<sup>1</sup> (Orientador), e-mail: mellobrasil04@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Farmacêuticas/  
Maringá, PR<sup>1</sup>

**Centro de Ciências da Saúde/ Departamento de Farmácia**

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*, *Paullinia cupana*, biofilme.

### **Resumo**

*Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa, microaerófila que pode colonizar o estômago humano e é capaz de formar o biofilme, fator predisponente para o desenvolvimento de doenças gástricas. O pequeno arsenal para o tratamento de infecções por *H. pylori* utiliza da claritromicina em associação, porém o desenvolvimento de resistência leva a necessidade de buscar novos fármacos. *Paullinia cupana*, conhecida como guaraná é rico em compostos fenólicos como os taninos, que apresentam atividade antimicrobiana. O trabalho tem o objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e anti-biofilme do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) de *P. cupana*. Foram determinadas as concentrações inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM), além da atividade na formação de biofilme e sobre biofilme pré-formado. A CIM da FAE foi de 1250 µg/ml, sendo mais ativo que EB e FAQ, 2500 µg/ml. Para a claritromicina, a CIM foi de 0,39 µg/ml. Quanto a CBM, o guaraná foi bactericida nas concentrações correspondentes da CIM e a claritromicina apresentou atividade bacteriostática. No ensaio anti-biofilme, FAE na concentração de 312,5 µg/ml inibiu 54,6% na formação do biofilme, enquanto a inibição do biofilme pré-formado foi de 27,14% demonstrando maior efetividade comparado aos outros compostos. Apesar da CIM apresentar-se > 1000 µg/ml, concentrações mais baixas demonstram eficácia na formação do biofilme bacteriano. Logo, pode-se comprovar a atividade do extrato e frações de *P. cupana* frente a *H. pylori*.





## Introdução

*Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa, espiralada, microaerófila que pode colonizar o estômago humano. Sua distribuição é cosmopolita e sua transmissão decorre do contato fecal-oral, oral-oral e iatrogênica (Dunn et al., 1997). Um dos fatores de virulência dessa bactéria, é a capacidade de formação do biofilme, gerando uma rede complexa no epitélio gástrico, o que propicia o desenvolvimento de patologias como a gastrite, úlcera péptica e o linfoma gástrico.

A terapia empregada para o tratamento das infecções causadas pelo *H. pylori* se baseia em um conjunto de fármacos, utilizando a claritromicina em associação. Porém, o índice de prevalência de cepas resistentes a esses antibióticos é crescente, levando a busca de novas substâncias que apresentem um potencial antimicrobiano. *Paullinia cupana*, planta típica do Brasileira conhecida como guaraná, apresentando em sua composição substâncias com propriedades estimulantes do sistema nervoso central e rico em compostos fenólicos como os taninos, que apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (Jesus et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi determinar a atividade antimicrobiana do extrato e frações de *P. cupana*, avaliando a CIM e CBM frente a bactéria *H. pylori* e sua influência na formação do biofilme.

## Materiais e métodos

### *Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)*

A partir de uma cultura bacteriana de *H. pylori* ATCC 43504 cultivada em caldo BHI contendo 10% de soro fetal bovino em microaerofilia por 24 h e ajustado a uma concentração de  $10^7$  UFC/ml em salina, para preparação do inóculo. O extrato bruto (EB) e as frações acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ), foram solubilizadas em água destilada para a solução teste (ST). Em uma placa de 96 poços foi realizado uma diluição seriada, com uma concentração inicial de 5000 µg/ml. Em seguida, foram adicionados aos poços, 5 µl da suspensão de microrganismos padronizada, e a placa foi incubada a 37 °C durante 72 h e em microaerofilia. A concentração inibitória mínima foi determinada como sendo a menor concentração da fração capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro*.

### *Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)*

A partir do MIC realizado, foram transferidos 10 µl de cada poço da placa de 96 poços para uma placa de Petri contendo ágar sangue 5% e





incubados por 24 h em microaerofilia. A CBM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento em placa (Pastene et al., 2010).

#### Ensaio anti-biofilme

**Ensaio da formação do biofilme:** *H. pylori* foi cultivada em caldo BHI suplementado com 2% de soro fetal bovino e 0,3% de glicose e incubada 24 h a 37°C em microaerofilia e agitação constante a 90 rpm. Após incubação, o inóculo foi ajustado para a densidade óptica de 0,15 a 600 nm ( $DO_{600}$ ), correspondente a  $2,84 \times 10^7$  UFC/ml e colocados em placa de 24 poços. Foram adicionados os tratamentos com o EB, FAE e FAQ de guaraná nas concentrações de 5000, 2500, 1250, 675 e 312,5  $\mu\text{g/ml}$  e claritromicina, incubadas nas mesmas condições por 48 h. Após incubação, foi quantificado utilizando uma solução de cristal violeta 0,1% e ressuspensas com etanol e acetona (80:20) e feito a leitura em 540 nm, em leitor de ELISA.

**Ensaio do biofilme pré-formado:** utilizou-se o mesmo procedimento, modificando o tratamento, que foi adicionado depois de 48 h para a formação do biofilme e incubados por 24 h, e realizado a leitura (Gaddy et al., 2015 modificado).

### Resultados e Discussão

A CIM para o EB, FAE, FAQ e a claritromicina, foram respectivamente: 2500  $\mu\text{g/ml}$ , 2500  $\mu\text{g/ml}$ , 1250  $\mu\text{g/ml}$  e 0,39  $\mu\text{g/ml}$ . A CBM foi correspondente a CIM, com características bactericidas exceto para a claritromicina que a 0,78  $\mu\text{g/ml}$ , foi bacteriostática. O ensaio do biofilme, foi realizado em dois procedimentos distintos, com o objetivo de avaliar o tratamento com os extratos e frações de *P. cupana* na formação (Fig. 1A), e sobre o biofilme pré-formado (Fig. 1B).

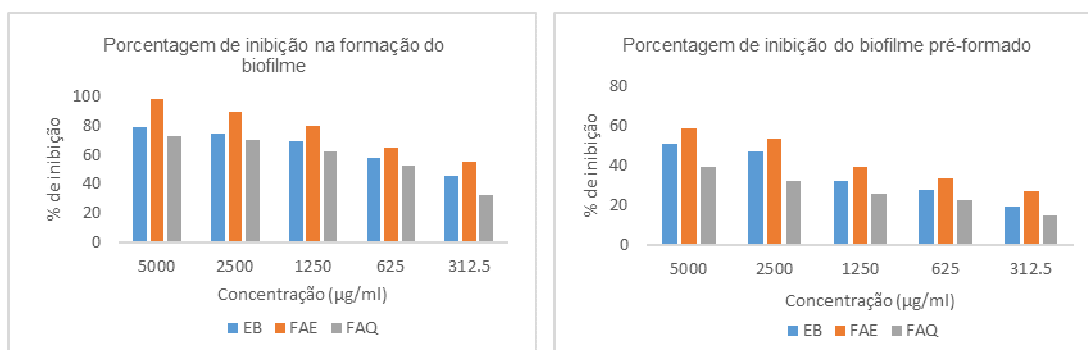


Figura 1 A - Porcentagem de inibição na formação do biofilme de *H. pylori* com *P. cupana*.  
 Figura 1 B- Porcentagem de inibição do biofilme pré-formado de *H. pylori* com *P. cupana*.





Nesse estudo, foi demonstrado que o extrato e frações de *P. cupana* atuam na formação e no biofilme de *H. pylori*. A fração acetato de etila (FAE), demonstrou uma maior atividade em relação ao extrato bruto (EB) e a fração aquosa (FAQ), em ambos os experimentos. Na formação do biofilme, observou-se que mesmo na concentração de 312,5 µg/ml de FAE a inibição foi de 54,6%, enquanto o tratamento com o biofilme pré-formado, foi de 27,1%. Para a claritromicina, avaliada na concentração de 0,78 µg/ml, a inibição foi correspondente a 85,5% na formação e 63,0% no biofilme pré-formado. Apesar da concentração inibitória mínima dos compostos apresentarem um valor >1000 µg/ml, concentrações mais baixas demonstraram efetividade na inibição da formação do biofilme.

### Conclusões

Foi determinado a concentração inibitória e bactericida mínima, além da porcentagem de inibição do biofilme com o extrato e frações de *Paullinia cupana* frente a bactéria *Helicobacter pylori*, comprovando sua capacidade de inibição na formação do biofilme.

### Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio e Bolsa de iniciação científica.

### Referências

DUNN B.E.; COHEN H.; J. BLASER M.J. *Helicobacter pylori*. **Clinical microbiology**. Reviews. Vol. 10, No. 4, p. 720–741, 1997.

JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. A.; LIMA, G. R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BATISTA, L. M. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. Review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13, p. 3203-3228, 2012.

PASTENE, E.; SPEISKY, H.; GARCÍA, A.; MORENO, J.; TRONCOSO, M.; G. FIGUEROA G. In Vitro and in Vivo Effects of Apple Peel Polyphenols Against *Helicobacter pylori*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7172-7179, 2010.

