

ATIVIDADE ANTI-*Helicobacter pylori* ex vivo DE EXTRATO DE RIZOMAS DE *Limonium brasiliense*

Ana Rita dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eloisa Lorenzi da Silva, Mariana Nascimento de Paula, Jéssica Faustino de Góis, Augusto Santos Borges, Ana Carolina Guidi (Coorientadora), João Carlos Palazzo de Mello (Orientador). E-mail: mello@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá/PR.

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Plantas medicinais; Farmacognosia; Antimicrobiano.

RESUMO

Helicobacter pylori é uma bactéria responsável por causar infecção em cerca de 50% da população mundial. Essa bactéria se instala no estômago e sua infecção costuma ser assintomática, mas, nos casos em que se agrava, a infecção pode desencadear inflamação da mucosa gástrica, úlceras pépticas e câncer gástrico. A espécie vegetal *Limonium brasiliense* é conhecida por sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, podendo ser uma nova fonte de substâncias com ação anti-*H. pylori*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade anti-*H. pylori* de extrato de rizomas de *L. brasiliense* em estômagos de camundongos C57BL/6. O extrato bruto foi obtido por turbo-extração. Os estômagos de camundongos C57BL/6 foram previamente infectados com *H. pylori* e tratados com o extrato bruto, divididos em grupos (n=7): não infectados e não tratados (C-), infectados e não tratados (C+), infectados e tratados com o extrato nas doses de 50 e 100 mg/kg (T1 e T2, respectivamente). Foi realizado o teste rápido da urease (TRU) e a análise histológica (AH), observando a preservação do epitélio gástrico, a presença de infiltrado inflamatório e a presença de bactérias. Para o TRU, o grupo T1 e T2 apresentaram cerca de 70% de resultados negativos. Na AH, observou-se preservação do epitélio, ausência de infiltrado inflamatório e ausência de *H. pylori* em aproximadamente 70% dos estômagos do grupo T1 e T2. Assim, o extrato de *L. brasiliense* possui atividade anti-*H. pylori*, devido à menor positividade para o TRU e apresentação histológica dos estômagos dentro da normalidade.

INTRODUÇÃO

O estômago é o órgão responsável pela digestão das proteínas, por ação do ácido clorídrico e pepsina, sendo um ambiente ácido. Para neutralizar o pH desse ambiente há a produção de muco pelas células da mucosa, que tem por função ser uma barreira protetora da superfície da mucosa gástrica. Quando há um desequilíbrio entre o sistema protetor da mucosa e fatores agressores, podem surgir

úlceras pépticas, que se caracterizam pelo surgimento de lesões na mucosa, pela ação do ácido estomacal (CRISTO; COOPER-DOCKERY, 2016).

Outra causa comum para o surgimento de úlceras é devido à infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*. Essa bactéria possui como fator de virulência a enzima urease, que promove a hidrólise da ureia em amônia. Com isso, ocorre a neutralização do pH na superfície da mucosa gástrica, permitindo que a bactéria fixe-se nesse local (LADEIRA et al., 2003).

A espécie vegetal *Limonium brasiliense* Kuntze (Plumbaginaceae), popularmente conhecida como baicuru, é encontrada na América do Sul. Seu uso popular consiste no preparo de infuso ou decocto dos rizomas. Estudos indicam sua ação anti-inflamatória e antioxidante (MOURA et al., 1985; BLAINSKI et al., 2017; PILATTI et al., 2022).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*H. pylori* de extrato de rizomas de *L. brasiliense*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extrato vegetal

O extrato utilizado foi obtido através da utilização de rizomas secos e fragmentados de *L. brasiliense*, empregaram-se 10 L de uma mistura de solventes. O extrato foi filtrado, removido a fase orgânica por rotaevaporação sob pressão reduzida e liofilizado, produzindo o extrato bruto (EB), o qual foi conservado em baixa temperatura (-20,0 °C) até sua utilização.

Amostra utilizada

Foram utilizados estômagos de camundongos da linhagem C57BL/6 separados em 4 grupos (n=7): animais não infectados e não tratados (C-), animais infectados e não tratados (C+), animais infectados e tratados com dose de 50 e 100 mg/kg (T1 e T2, respectivamente). Os animais foram previamente infectados e tratados. A dose utilizada foi definida através de concentrações testadas *in vitro* sendo transposta para o estudo em animais. Os animais dos C- e C+ receberam água filtrada para controle do estresse gerado devido a inoculação forçada.

A eutanásia dos camundongos foi realizada com superdosagem de cetamina e xilazina (1:1), via intraperitoneal. Os animais foram abertos na região abdominal e a remoção de seus estômagos foi feita com auxílio de pinça e tesoura. Os estômagos foram abertos em sua curvatura maior, esticados com o auxílio de espinhos em isopor e lavados com solução salina. Foi seccionado em sua metade longitudinalmente: em um dos lados foi coletada uma amostra de diâmetro de 4 mm da região do antro, a qual foi utilizada no teste de urease e o outro lado íntegro dele foi fixado para análise histológica. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, sob número 4554021215.

Teste rápido de urease (TRU)

As amostras dos estômagos foram colocadas em microtubos de 2 mL, previamente autoclavados, contendo solução tampão fosfato-salino (PBS, 100 mM e pH 6,8), 0,001% de vermelho de fenol (p/v) e 200 mM de solução de ureia filtrada. Após a adição da amostra ao microtubo, eles foram mantidos em temperatura ambiente e armazenados protegidos da luz. Os resultados foram avaliados após 24 h, observando a alteração da cor do meio.

Análise histológica (AH)

A outra metade do estômago foi fixada em formalina tamponada [formol 10% (v/v) em solução tampão PBS, pH 7,4]. Após 24 h, a solução foi removida e adicionado álcool 70% para conservação do tecido. Posteriormente, os estômagos foram submetidos ao processo de desidratação, com série de álcool 80, 90 e 100%, e ao processo de clarificação e remoção do álcool, em xilol. Em seguida, foi removido o xilol através da imersão da amostra em parafina líquida, duas vezes, e, em seguida, foi realizado o processo de emblocamento.

Na região do antro, foram realizados cortes transversais semi seriados, na espessura de 6 µm, com o auxílio de um micrótomo, e foram preparadas 4 lâminas, coradas com corante Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas qualitativamente enquanto a preservação do epitélio gástrico, observando áreas com focos inflamatórios e a presença da bactéria *H. pylori*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infecção causada pela bactéria *H. pylori* foi confirmada através do TRU, devido à alta taxa de positividade do grupo C+ quando comparada ao grupo C-. Os grupos T1 e T2 apresentaram redução na taxa de positividade desse teste, podendo indicar a capacidade do EB na inibição da enzima urease ou atividade bactericida para *H. pylori*, como demonstra a tabela 1.

Tabela 1- Resultados do TRU e da análise histológica para os grupos analisados

Grupo	Taxa de positividade para o TRU (%)	Aspecto do epitélio	Presença de infiltrado inflamatório	Taxa de estômagos com infiltrado inflamatório (%)
C-	0	Preservado	Ausente	0
C+	57	Preservado	Presente	43
T1	29	Preservado	Ausente	29
T2	29	Preservado	Ausente	29

Como critério de avaliação para a AH, observou-se a diferença entre os estômagos dos grupos C- e C+, determinando como seria um estômago “normal” e um estômago infectado com a bactéria, respectivamente. No C- foi observado uma preservação do epitélio gástrico e ausência de infiltrado inflamatório. Já no C+ observou-se a presença de neutrófilos e linfócitos em maior abundância quando comparados ao C-, indicando a infecção causada pela bactéria *H. pylori*.

No T1 e no T2 foi observado semelhança ao grupo C-. O epitélio apresentou-se preservado, íntegro. A mucosa gástrica possuía células superficiais, parietais e mucosas, com ausência de infiltrados inflamatórios. Portanto, na maioria dos estômagos que receberam os tratamentos não houve alterações causadas pela infecção de *H. pylori*, podendo indicar a efetividade dos tratamentos.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir do TRU e da AH de estômagos de camundongos C57BL/6 sugerem que o extrato de rizomas de *L. brasiliense* possui atividade anti-*H. pylori*, podendo ser uma nova fonte de substâncias ativas, ou então uma nova proposta de tratamento contra essa infecção.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Araucária (FA) pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

BLAINSKI, A. et al. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. **J. Ethnopharmacol.**, v. 198, p. 313-323, 2017.

CRISTO, S.; COOPER-DOCKERY, D. **Fisiologia simplificada dos sistemas digestório, circulatório e excretório**. Estados Unidos da América: Health 4D International and Cooper Wellness Center Editorial, 2016.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol. Med. Labor.**, v. 39, p. 335-342, 2003.

MOURA, T.F.A.L. et al. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze-Plumbaginaceae (Baicuru). **Cad. Farmácia**, v. 1, p. 45-54, 1985.

PILATTI, F. et al. Microstructured polymer system containing proanthocyanidin-enriched extract from *Limonium brasiliense* as a prophylaxis strategy to prevent

32º Encontro Anual de Iniciação Científica
12º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



23 e 24 de Novembro de 2023

recurrence of *Porphyromonas gingivalis*. **Planta Med.**, <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/a-1858-6898>, 2022.