



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de *Astronium*
sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**

BRUNA VIDAL BONIFÁCIO

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara – SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de *Astronium*
sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**

BRUNA VIDAL BONIFÁCIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara – SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Bonifácio, Bruna Vidal

B715a Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp incorporados ou não em sistemas nanoestruturados / Bruna Vidal Bonifácio. – Araraquara, 2014
98 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica

Orientador: Taís Maria Bauab

1. Anacardiaceae. 2. *Astronium* sp. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Microdiluição. 5. Sistema lipídico nanoestruturado I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho aos meus pais Sandra e Sidinei...

*Não acredito que serei capaz de agradecer por tudo que seria necessário... Simplesmente decidi direcionar meu primeiro **OBRIGADO** a vocês por simplesmente serem meus pais. Afinal, não estaria aqui se não fosse pelo desejo, pelos planos e por todo o esforço que tiveram para que eu estivesse aqui! Meu sonho??? Poder algum dia retribuir pelo menos um pouco do que vocês fizeram e fazem até hoje por mim... Amo vocês!*

Meu muito obrigado...

A Deus e Nossa Senhora Aparecida por sempre me dar força, iluminar e guiar meus passos em todos os obstáculos presentes nesta caminhada;

Aos meus pais, Sandra e Sidinei, que sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram a estar aqui desde o princípio;

A Profa. Dra. Tais Maria Bauab, minha orientadora, por ter me dado a oportunidade de estar aqui e acreditar em mim desde o primeiro dia. Muito obrigada pela paciência e dedicação, pelos conselhos e por sempre estar batalhando ao meu lado em todos os momentos nesta árdua caminhada;

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, pela colaboração nos ensaios nanotecnológicos, parceria, amizade, incentivos, oportunidades oferecidas e também pelas tardes de café e momentos divertidos;

A Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, por ter me dado a oportunidade de realizar os estágios de aperfeiçoamento técnico e científico;

*Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas e a pós-doutoranda Aline Coqueiro, pelas tardes dedicadas a disciplina de “Espectroscopia Aplicada a Análise de Fármacos e Medicamentos”, e juntamente com seu aluno Leonardo Perez de Souza por fornecer os extratos de *Astronium* sp, além de estarem sempre dispostos a me ajudar com todas as informações necessárias para a realização deste trabalho;*

*À Profa. Dra. Cássia Regina Primila Cardoso da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pela atenção e disposição concedida em relação ao processo de documentação de registro genético dos extratos de *Astronium* sp;*

*Aos professores, Dr. Cristiano B. Pereira e Dr. Eduardo Ribeiro dos Santos, da Universidade de Tocantins em Palmas (TO) pela coleta e identificação de *Astronium fraxinifolium*;*

*A pós-graduanda Eliana Ramos, do Instituto Agronômico de Campinas (Campinas), e ao Prof. Dr. Jorge Tamashiro, do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela coleta e identificação de *Astronium graveolens*;*

Ao Prof. Dr. Jorge Tamashiro pela coleta e identificação de Astronium urundeuva;

Aos professores, Dr. Carlos Henrique Gomes Martins (Universidade de Franca) e Dra. Izabela Dutra Alvim por aceitarem fazer parte da minha banca de defesa de mestrado... Tenho certeza que as contribuições serão extremamente valiosas;

Ao Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e a mestranda Érica de Oliveira Lopes pelos ensaios de citotoxicidade. Ao Prof. Fernando também agradeço pela amizade, participação, disposição e contribuições durante o exame de qualificação;

A Profa. Alexandra Ivo de Medeiros e ao doutorando Felipe Fortino pelas leituras espectrofotométricas realizadas no Laboratório de Imunologia. Felipe, muito obrigada pela disposição e atenção concedida durante todas as leituras realizadas;

A Profa. Ana Marisa Fusco Almeida e a pós-doutoranda Janaína Sardi que desde o primeiro momento me incentivaram e me auxiliaram com todo material necessário para a seleção do doutorado. Jana, muito obrigada por estar disposta a me ajudar em tudo;

Ao Prof. André Gonzaga dos Santos pela atenção concedida às discussões e sugestões referentes ao projeto de Doutorado;

A Coordenadora da Pós-graduação e amiga Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro pela amizade e incentivos;

A secretária do Departamento de Ciências Biológicas, Margarete Rossi, que com uma simples gargalhada sempre conseguia contagiar a todos e aliviar os momentos difíceis e cansativos ao longo do dia... Sua alegria é inspiradora;

As técnicas Marisa, Néia, Débora, Sílvia e Nathália por todo apoio técnico e por sempre estarem dispostas a ajudar e dividir conosco seus anos de experiência no laboratório;

A toda equipe do laboratório de Fisiologia de Microrganismos: Patrícia Bento, Matheus Ramos, Mariana Rozatto, Kamila Negri, Leonardo Gorla, Marcelo Gonzaga, Natália Mathias, Victor Lucena, Isadora, Aymê, Malu, Raquel (Ruge) e Thaís Jovenazzo, por me auxiliarem nos experimentos;

Um agradecimento especial à minha amiga Patrícia Bento, que em tão pouco tempo conquistou todo meu carinho, respeito e admiração, e já se tornou uma amiga que quero ter para sempre... Obrigada pela confiança, carinho, amizade, conselhos, ombro amigo... Juro que nem sei como te agradecer... E também ao Matheus Ramos, agradeço também por tudo que escrevi acima, além de toda sua dedicação nos ensaios in vivo, nos proporcionando tantas risadas e animando nosso laboratório com suas imitações até mesmo durante as madrugadas. Amo vocês meus queridos!

A Tais Melo (Maloca) por nos ajudar inúmeras vezes no preparo das microemulsões e por ser sempre tão dedicada;

Aos amigos do laboratório de Micobacteriologia: Leonardo Marino, Érica de Oliveira Lopes, Paula Souza, Helô e Mini, pela amizade, companheirismo e pelas tardes descontraídas ao lado de vocês;

Aos alunos do laboratório de Controle Biológico de Fármacos e Medicamentos, Patrícia Aléssio, Lucas Chierentin, Carol Kogawa, Thaísa Pedroso, Eliane Gandolpho, Flávia Fiorentino, Lucélia Magalhães, Cris Laignier, Josi Corrêa, Andressa Figueiredo, Jan Frommelt e Lenita Tomita, que de uma forma ou outra me ajudaram e me acolheram na minha chegada em Araraquara;

Aos amigos de outros laboratórios e disciplinas, Lívia Espanha, Vânia Ortega, Fabíola Garavello, Kelly Pestana, Helen Balдан (Berê), Juliana Uruguay, Felipe Guioti, Flávia Resende, Cláudia Rocha, Cate Nogueira, Ana Claudia Depaoli e Rafael Freire;

As amigas Caroline Cândido e Jéssica Bernegossi por estarem comigo desde o primeiro dia em Araraquara, me dar forças e me apoiarem em todos os momentos durante esses anos;

As amigas e mais novas companheiras de casa Bruna Chiari, Maria Gabriela Almeida, Carol Kogawa e Tathiê Ignácio, por me receberem tão bem desde o primeiro dia de moradia;

A minha companheira de carona Kamila Rotofo... Com você, minhas idas e vindas de Araraquara são muito mais divertidas;

A Thiana e Olívia (da portaria) por serem sempre tão simpáticas e estarem sempre bem dispostas a ajudar;

A minha querida teacher e amiga Wally Martins (in memoriam) que se tornou mais que uma professora em todos esses anos de aulas de inglês. Obrigada por todos os finais de semana que passamos juntas e também pelos conselhos de uma grande amiga. Thank you for everything!!!

Ao meu namorado Diego, que mesmo de longe, vivenciou meu dia a dia e sempre esteve disposto a me aconselhar da melhor maneira possível. Obrigada também por entender minha ausência em todo esse período e que mesmo assim esteve sempre ao meu lado... Amo você;

As funcionárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Claudinha, Daniela, Joyce, Flávia e Márcia (que agora faz parte da Seção de Graduação) pela atenção, cordialidade e amizade;

A Irani e demais funcionárias da Biblioteca da FCFar, por toda prestatividade e correção das referências deste trabalho;

Ao projeto Biota, da FAPESP;

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara.

RESUMO

Os fitoterápicos têm apresentado resultados surpreendentes no tratamento de doenças crônicas, principalmente do trato digestório (úlceras gástricas e duodenais, colite ulcerativa e doença de *Crohn*), diabetes e câncer. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF (Ministério da Saúde - MS) propõe o estudo de diversas espécies vegetais, dentre estas, plantas do gênero *Astronium* (Anacardiaceae), que reúne espécies como *Astronium fraxinifolium*, *Astronium graveolens* e *Astronium urundeuva*, com propriedades anti-inflamatória, antiulcerogênica, cicatrizante e antimicrobiana. Nesse contexto, a inclusão da tecnologia no aprimoramento de plantas medicinais deve ser estimulada já que a estratégia de incorporação de extratos vegetais em sistemas nanoestruturados tem otimizado suas propriedades. A atividade antimicrobiana dos extratos incorporados ou não em sistemas nanoestruturados foi avaliada pela técnica de microdiluição frente aos micro-organismos *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella setubal* (ATCC 19196), *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) e *Candida albicans* (ATCC 18804). Os extratos vegetais foram testados nas concentrações de 1000 a 7,81 µg/mL e como controle foram utilizados a amoxicilina (100 µg/mL) para *H. pylori*; a ampicilina (50 µg/mL) para as demais bactérias, e a anfotericina B (32 µg/mL) e fluconazol (256 µg/mL) para *C. albicans*. Após incubação a 37 °C/72 horas sob condição de microaerofilia para *H. pylori*; 37 °C/24 horas para as demais bactérias e 37 °C/48 horas para a levedura, foram realizadas as leituras espectrofotométrica e visual, com os reveladores resazurina 0,01% (bactérias), e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 2% - TTC (levedura) para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A incorporação foi feita em um sistema nanoestruturado constituído por 10% de fase oleosa (colesterol), 10% de tensoativo [polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58®) e fosfatidilcolina de soja] e 80% de fase aquosa (tampão fosfato pH=7,4) e preparado por sonicação (amplitude de 15%; potência 700 watts). Além disso, o extrato de *Astronium* sp que apresentou melhor atividade antimicrobiana e maior índice de seletividade (IS), calculado através dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade (IC₅₀), foi submetido a um modelo experimental *in vivo* de candidíase vulvovaginal (CVV). Dos extratos não incorporados, somente duas espécies apresentaram atividade antimicrobiana: o da folha de *A. graveolens* (CIM 250 µg/mL) apenas frente a *S. aureus*, e o da folha de *A. urundeuva* contra *S. aureus* e *C. albicans*, com CIMs de 125 µg/mL. Após incorporação, apenas os extratos do caule e das folhas da espécie *A. fraxinifolium*, que não haviam apresentado atividade (CIM>1000 µg/mL) modificaram sua atividade frente a *S. aureus* com CIMs de 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Os extratos testados contra as demais bactérias não foram ativos mesmo após sua incorporação no sistema nanoestruturado. Em relação à *C. albicans*, os extratos de caule e folha de todas as espécies de *Astronium* sp, que também não haviam apresentado atividade (CIM>1000 µg/mL), tiveram sua atividade potencializada: os do caule das três espécies passaram a apresentar CIMs de 62,5 µg/mL; os das folhas de *A. fraxinifolium* e *A. graveolens*, passaram a apresentar CIMs de 250 e 125 µg/mL, respectivamente; e o da folha de *A. urundeuva*, que já havia apresentado CIM de 125 µg/mL, teve sua atividade ainda mais potencializada para 15,62 µg/mL. Em geral, os extratos incorporados mostraram maior seletividade em relação aos não incorporados, especialmente para o extrato incorporado (IS=64,02) das folhas de *A. urundeuva* (AUF), que foi aproximadamente 15 vezes mais seletivo em relação ao extrato não incorporado (IS=4,28) para *C. albicans*. Os resultados do ensaio *in vivo* mostraram que AUF incorporado foi mais efetivo do que AUF não incorporado e até mesmo do que o controle positivo (anfotericina B). Os resultados demonstram que a incorporação dos extratos de *Astronium* sp no sistema nanoestruturado desenvolvido foi capaz de potencializar mais a atividade antifúngica do que antibacteriana e que tais extratos, principalmente o das folhas de *A. urundeuva*, podem futuramente ser candidatos antifúngicos promissores carreados via microemulsão (ME), promovendo o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica eficaz com doses menores e mais efetivas.

Palavras-chave: Anacardiaceae, *Astronium* sp, atividade antimicrobiana, microdiluição, sistema lipídico nanoestruturado.

ABSTRACT

Herbal medicines have shown amazing results for the treatment of chronic diseases, especially the ones of the digestive tract (gastric and duodenal ulcers, ulcerative colitis and *Crohn's* disease), diabetes and cancer. The National Policy of Medicinal Plants and Herbal Medicines (Ministry of Health) proposes the study of several plant species, including plants containing the genus *Astronium* (Anacardiaceae) that includes species such as *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* and *A. urundeuva*, which comprise anti-inflammatory, anti-ulcerogenic, healing and antimicrobial properties. In this context, the inclusion of technology in the improvement of medicinal plants should be encouraged since the strategy to incorporate plant extracts in nanostructured systems has optimized their properties. The antimicrobial activity of the extracts, which were incorporated or not into nanostructured systems, was evaluated by microdilution technique for the microorganisms *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella setubal* (ATCC 19196), *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) and *Candida albicans* (ATCC 18804). The plant extracts were tested at concentrations from 1000 to 7.81 µg/mL, and the following medications were used to check in order to see if they will work with each type of microorganisms: amoxicillin (100 µg/mL) for *H. pylori*; ampicillin (50 µg/mL) for the other bacteria, amphotericin B (32 µg/mL) and fluconazole (256 µg/mL) for *C. albicans*. After the incubation at 37 °C/72 hours under microaerophilic condition for *H. pylori*; 37 °C/24 hours for the other bacteria and 37 °C/48 hours for the yeast, spectrophotometric and visual readings were performed, with the developers 0.01% resazurin (bacteria) and 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The incorporation was prepared into a nanostructured system comprising 10% oil phase (cholesterol), 10% surfactant [polyoxyethylene 20-cetyl ether (Brij 58®), soya phosphatidylcholine] and 80% aqueous phase (phosphate buffered saline pH=7.4) and prepared by sonication (amplitude of 15%, power 700 watts). In addition, the *Astronium* sp extract that showed the best antimicrobial activity and the highest selectivity index (SI), which was obtained by the cytotoxicity assay (IC₅₀), was submitted to an *in vivo* experimental model of vulvovaginal candidiasis (VVC). From the extracts unincorporated, only two species showed antimicrobial activity: one from the leaves of *A. graveolens* (MIC 250 µg/mL) against *S. aureus* only; and the leaves of *A. urundeuva* against *S. aureus* and *C. albicans*, with MICs of 125 µg/mL. After the incorporation, only the stalk and leaves extracts of *A. fraxinifolium* that were not active (MIC>1000 µg/mL), changed their activity against *S. aureus* to 500 and 1000 µg/mL, respectively. The other extracts tested against other bacteria were not effective even after their incorporation into nanostructured system. Regarding the yeast *C. albicans*, stalk and leaf extracts from all species of *Astronium* sp, which also were not active (MIC>1000 µg/mL), had their activity enhanced: the stalk of the three ones showed MICs of 62.5 µg/mL; the leaves of *A. fraxinifolium* and *A. graveolens* respectively showed MICs of 250 e 125 µg/mL; and the leaves of *A. urundeuva*, that had already showed MIC of 125 µg/mL, had the activity even more enhanced to 15.62 µg/mL. In general, incorporated extracts also showed a higher selectivity than the unincorporated ones, especially for the incorporated extract (SI=64.02) of *A. urundeuva* leaves that was around 15 times more selective than the extract alone (SI=4.28) against *C. albicans*. *In vivo* assays dates showed that the nanostructure incorporated extract of *A. urundeuva* leaves was more effective than both the unincorporated extract and the antifungal positive control (amphotericin B). These results prove that the incorporation of extracts of *Astronium* sp into this nanostructured system was more effective against the yeast than the bacteria, and these extracts, especially the one from the leaves of *A. urundeuva*, can be further promising antifungal candidates when carried by microemulsion, encouraging the development of an effective therapeutic alternative with lower and more effective doses.

Key-words: Anacardiaceae, *Astronium* sp, antimicrobial activity, microdilution, nanostructured lipid system.

Lista de Figuras

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> ampliado 4000 vezes.....	18
Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de <i>S. aureus</i> ampliado 4000 vezes.	20
Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Salmonella enteritidis</i> ampliado 6350 vezes.....	23
Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de <i>H. pylori</i> no estômago ampliado 3100 vezes.....	25
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de <i>C. albicans</i> ampliado 8500 vezes.....	28
Figura 6. Fotografia de <i>A. fraxinifolium</i>	34
Figura 7. Fotografia de <i>A. graveolens</i>	35
Figura 8. Fotografia de <i>A. urundeuva</i>	36
Figura 9. Representação esquemática da organização das microemulsões.	42
Figura 10. Microemulsão do tipo O/A com fármaco incorporado.	43
Figura 11. Representação da microplaca para determinação da CIM.	49
Figura 12. Reação de oxirredução da resazurina.	50
Figura 13. Reação de oxirredução do TTC.	52
Figura 14. Esquema e fotos do preparo da formulação.	54
Figura 15. Esquema do tratamento do ensaio anti-CVV <i>in vivo</i>	58
Figura 16. Foto do ensaio de microdiluição com bactérias revelado com resazurina (0,01%).	60
Figura 17. Foto do ensaio de microdiluição com levedura revelado com TTC (2%).	60
Figura 18. Diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema.	61
Figura 19. Sistema nanoestruturado: base e extratos incorporados (2000 µg/mL).	62
Figura 20. Inibição do crescimento dos micro-organismos pelo extrato hidroetanólico de caule e folha de <i>A. fraxinifolium</i> incorporados ou não no sistema nanoestruturado.	65
Figura 21. Inibição do crescimento dos micro-organismos pelo extrato hidroetanólico de caule e folha de <i>A. graveolens</i> incorporados ou não no sistema nanoestruturado.....	67
Figura 22. Inibição do crescimento dos micro-organismos pelo extrato hidroetanólico de caule e folha de <i>A. urundeuva</i> incorporados ou não no sistema nanoestruturado.	69
Figura 23. Presença evidenciada de células epiteliais anucleadas e cornificadas características da fase estro.	73

Lista de Tabelas

Tabela 1. CIM dos extratos hidroetanólicos de caule e folhas das espécies de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado através da revelação com resazurina (0,01%) e TTC (2%).....59

Tabela 2. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e IPD para a microemulsão (base) e para os extratos incorporados na microemulsão após o preparo (tempo 0) e três meses depois (tempo 3).....62

Tabela 3. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *E. coli*.....71

Tabela 4. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *S. aureus*.71

Tabela 5. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *S. setubal*.....72

Tabela 6. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *H. pylori*.72

Tabela 7. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *C. albicans*.....72

Tabela 8. Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica obtidos nos animais.74

A/O – Água em óleo
Abs – Absorbância
AF – *Astronium fraxinifolium*
AFC – Caule de *Astronium fraxinifolium*
AFF – Folha de *Astronium fraxinifolium*
AG – *Astronium graveolens*
AGC – Caule de *Astronium graveolens*
AGF – Folha de *Astronium graveolens*
AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
AMH – Agar Müller-Hinton
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS – Agar Sangue
ASD – Agar Sabouraud Dextrose
ATCC – *American Type Culture Collection*
AU – *Astronium urundeuva*
AUC – Caule de *Astronium urundeuva*
AUF – Folha de *Astronium urundeuva*
CBM – Concentração Bactericida Mínima
CFM – Concentração Fungicida Mínima
CIM – Concentração Inibitória Mínima (Sigla em inglês: MIC)
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMH – Caldo Müller Hinton
CPA – Ciclofosfamida
CSD – Caldo Sabouraud Dextrose
CVV – Candidíase vulvovaginal (Sigla em inglês: VVC)
DMSO – Dimetilsulfóxido
DST – Doença Sexualmente Transmissível
Estr. – Estradiol
FA – Fase Aquosa
FO – Fase Oleosa
FS – Fosfatidilcolina de Soja
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*
IC₅₀ – Índice de Citotoxicidade
INCA – Instituto Nacional do Câncer

Infec. – Infecção
IPD – Índice de Polidispersidade
IS – Índice de Seletividade (Sigla em inglês: SI)
Lav. – Lavagem
ME – Microemulsão
MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*
MOPS – Ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
MS – Ministério da Saúde
O/A – Óleo em água
OMS – Organização Mundial da Saúde (Sigla em inglês: WHO)
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato de Sódio)
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SF – Separação de Fases
SA-11 – rotavírus símio
SFB – Soro Fetal Bovino
SI – *Selectivity Index*
SLT – Sistema Líquido Transparente
SUS – Sistema Único de Saúde
SVO – Sistema Viscoso Opaco
SVST – Sistema Viscoso Semi-Transparente
SVT – Sistema Viscoso Transparente
T – Tensoativo
TTC – Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
VISA – *Vancomycin Intermediate S. aureus*
VVC – *Vulvovaginal candidiasis*
WHO – *World Health Organization*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Doenças infecciosas.....	17
1.2. Micro-organismos.....	17
1.2.1. Bactérias.....	17
1.2.1.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	17
1.2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).....	19
1.2.1.3. <i>Salmonella</i> sp.....	22
1.2.1.4. <i>Helicobater pylori</i> (<i>H. pylori</i>).....	24
1.2.2. Levedura.....	27
1.2.2.1. <i>Candida albicans</i> (<i>C. albicans</i>).....	27
1.3. Antimicrobianos.....	29
1.4. Plantas medicinais e Fitoterápicos.....	30
1.5. <i>Astronium</i> sp.....	32
1.5.1. <i>Astronium fraxinifolium</i> (<i>A. fraxinifolium</i>).....	34
1.5.2. <i>Astronium graveolens</i> (<i>A. graveolens</i>).....	35
1.5.3. <i>Astronium urundeuva</i> (<i>A. urundeuva</i>).....	35
1.6. Atividade antimicrobiana.....	38
1.7. Nanotecnologia: uma nova abordagem na busca por novos antimicrobianos.....	39
1.7.1. Microemulsão (ME).....	41
2. OBJETIVOS	44
2.1. Geral.....	44
2.2. Específicos.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. Material.....	45
3.2. Equipamentos.....	46
3.3. Extratos vegetais.....	46
3.3.1. Obtenção e procedência.....	46

3.3.2.	Preparo das soluções dos extratos	47
3.3.3.	Espectro de absorção	47
3.4.	Cepas microbianas.....	48
3.4.1.	Estocagem e manutenção	48
3.5.	Avaliação da atividade antibacteriana	48
3.5.1.	Padronização da suspensão bacteriana	48
3.5.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	49
3.5.2.1.	Realização do teste.....	49
3.5.2.2.	Leitura espectrofotométrica.....	50
3.5.2.3.	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	50
3.5.2.4.	Leitura com revelador	50
3.6.	Avaliação da atividade antifúngica	51
3.6.1.	Padronização da suspensão fúngica	51
3.6.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	51
3.6.2.1.	Realização do teste.....	51
3.6.2.2.	Leitura espectrofotométrica.....	51
3.6.2.3.	Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	51
3.6.2.4.	Leitura com revelador	52
3.7.	Cálculo da viabilidade microbiana	52
3.8.	Desenvolvimento do sistema nanoestruturado.....	53
3.8.1.	Composição da Formulação	53
3.8.2.	Preparo do sistema tensoativo.....	53
3.8.3.	Preparo da formulação.....	53
3.8.4.	Incorporação dos extratos na microemulsão lipídica	54
3.9.	Desenvolvimento dos sistemas	54
3.9.1.	Caracterização estrutural dos sistemas	54
3.9.1.1.	Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico).....	54
3.10.	Testes citológicos para determinação do Índice de Citotoxicidade e Seletividade ..	55
3.10.1.	Citotoxicidade (IC ₅₀).....	55
3.10.2.	Índice de seletividade (IS).....	56
3.11.	Ensaio <i>in vivo</i> para CVV.....	56

4. RESULTADOS	59
4.1. Determinação da CIM dos extratos vegetais	59
4.2. Incorporação dos extratos no sistema nanoestruturado	61
4.2.1. Desenvolvimento do sistema	61
4.2.2. Caracterização estrutural do sistema	62
4.2.2.1. Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)	62
4.3. Determinação da CIM dos extratos vegetais incorporados no sistema nanoestruturado	63
4.4. Determinação da CBM e CFM	63
4.5. Determinação do IC ₅₀ e IS	71
4.6. Atividade anti-CVV <i>in vivo</i>	73
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças infecciosas

Doenças infecciosas são as causadas por micro-organismos patogênicos ou oportunistas, como bactérias, vírus, parasitas ou fungos e que podem ser transmitidas direta ou indiretamente de uma pessoa para outra (WHO, 2013a). As infecções classificam-se na atualidade como um problema de saúde pública, desencadeando uma série de manifestações clínicas patogênicas que causam diversos efeitos deletérios a saúde do homem e levando muitas vezes ao óbito do paciente (BATISTA et al., 2010).

Em todo o mundo, a morte por doenças infecciosas chega a quase nove milhões de pessoas por ano, atingindo principalmente crianças menores de cinco anos (WHO, 2013b). Em diversos países de baixa renda, as mortes por doenças infecciosas, incluindo infecções respiratórias, *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS), doenças diarreicas, malária e tuberculose, são predominantes e responsáveis por quase um terço de todas as mortes (WHO, 2013c). Atualmente, em diversos países, incluindo até mesmo os mais desenvolvidos, a morte por doenças infecciosas ainda é motivo de preocupação mundial, principalmente quando se diz respeito ao crescente número de cepas microbianas resistentes a diversos fármacos (BIBI et al., 2011).

O alto índice de emergência de diversos patógenos e sua rápida propagação tem causado um impacto extremamente significativo na saúde bem como na economia global (JONES et al., 2008). Diante do dinâmico processo evolucionário dos agentes patogênicos, a lista de doenças infecciosas está sempre se renovando e crescendo (FAUCI e MORENS, 2012).

1.2. Micro-organismos

1.2.1. Bactérias

1.2.1.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

A bactéria *E. coli* (Enterobacteriaceae) é um bacilo gram-negativo de tamanho médio (0,5 µm de diâmetro e 1,0 - 3,0 µm de comprimento), móveis com flagelos peritricos e não formadores de esporos, Figura 1 (TORTORA et al., 2012). Poucas horas após o nascimento, a *E. coli* já coloniza o trato gastrointestinal de seres humanos (KAPER et al., 2004).

Considerado o micro-organismo anaeróbio facultativo mais abundante no cólon e nas fezes dos seres humanos e outros animais de sangue quente, a *E. coli* é a mais comum e importante dentre as sete espécies que compõe o gênero *Escherichia*, diferentemente dos outros dois principais patógenos

intestinais, a *Salmonella* e a *Shigella*, essa bactéria é fermentadora de lactose. Além disso, a *E. coli* apresenta três antígenos essenciais no seu processo de identificação: o O (de parede celular); o H (flagelar); e o K (capsular). Uma vez que existem mais de 150 antígenos O, 50 H, 90 K, as várias combinações resultam em mais de 1000 tipos antigênicos de *E. coli* (LENVINSON, 2010).

Embora alguns sorotipos de *E. coli* sejam considerados comensais para humanos e animais, ou seja, capazes de colonizar sem que ocorra o desenvolvimento de alguma doença, outros estão associados a diversas patologias, podendo ocasionar casos clínicos severos, desde meningite até infecções do trato urinário e diarreia (LAW et al., 2013; SHARIFF et al., 2013). Esses sorotipos considerados altamente adaptados adquiriram fatores de virulência específicos, os quais conferem uma melhor habilidade de adaptação de novos locais, permitindo ampliar ainda mais o espectro de doenças causadas por este micro-organismo (KAPER et al., 2004).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de *E. coli* ampliado 4000 vezes.



Fonte: Science Photo Library, 2013a.

Considerada a causa mais comum de infecção do trato urinário e sépsis associada a bacilos gram-negativos, esta bactéria também é uma das duas principais causas de meningite neonatal e da diarreia do viajante, uma diarreia aquosa adquirida pela ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes humanas. A meningite neonatal é adquirida durante o nascimento através do canal do parto materno. Determinadas cepas causam infecção intestinal por diferentes mecanismos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (RASKO et al., 2011; LENVINSON, 2010; FREMAUX et al., 2008).

Incluindo tanto humanos quanto animais em seu reservatório, essa bactéria possui diversos fatores de virulência, dentre eles: os *pili*, endotoxina, e exotoxinas (enterotoxinas), causadoras de diarreia aquosa e diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica-urêmica (FREMAUX et al., 2008).

A infecção do trato intestinal primeiramente ocorre através da projeção dos *pili* da superfície bacteriana a fim de garantir a adesão do organismo às células do jejuno e íleo. Depois de aderidas, as bactérias passam a sintetizar enterotoxinas (exotoxinas atuantes no trato intestinal), que agem sobre as células do jejuno e íleo e causam diarreia. As linhagens produtoras de enterotoxina não invadem a mucosa intestinal, não causam inflamação e causam diarreia aquosa não sanguinolenta. Entretanto, outras linhagens de *E. coli* são enteropatogênicas (enteroinvasivas) e causam doença não pela formação de enterotoxina, mas sim através da invasão do epitélio do intestino grosso, podendo levar a diarreia sanguinolenta (disenteria) acompanhada por células inflamatórias (neutrófilos) nas fezes (CROXEN e FINLAY, 2012). Determinadas linhagens enterohemorrágicas de *E. coli* (O157:H7) também causam diarreia sanguinolenta por produzirem uma exotoxina denominada verotoxina, assim denominada por ser tóxica às células VERO em cultura e também às células de revestimento do cólon. A EPEC é considerada a principal causa de diarreia aquosa e potencialmente fatal em crianças, enquanto que a EHEC causa diarreia ainda mais grave, provocando uma variedade de sintomas que variam desde gastroenterite aguda como até mesmo síndrome hemolítica-urêmica (LAW et al., 2013).

O trato urinário está entre os lugares mais comuns de infecção bacteriana, sendo a *E. coli* uropatogênica considerada o maior responsável por infecções neste local (KAPER et al., 2004). As linhagens uropatogênicas causam preferencialmente infecções do trato urinário e caracterizam-se pela presença de proteínas adesinas nos *pili* que se ligam a receptores específicos do epitélio do trato urinário. A motilidade apresentada por este patógeno é essencial em sua ascensão até a bexiga através da uretra, bem como até o rim através do ureter (JACOBSEN et al., 2008).

O tratamento de infecções por esta bactéria depende do local atingido e do grau de resistência do isolado específico. Alguns antibióticos como, sulfonamidas, trimetoprim, ampicilina e cloranfenicol frequentemente apresentam um maior grau de resistência em relação à ciprofloxacina. Embora a administração de trimetoprim-sulfametoxazol ou loperamida possa diminuir a duração dos sintomas, a terapia antibiótica usualmente não é indicada para doenças diarreicas causadas por *E. coli*, sendo mais tipicamente indicado apenas a reidratação (ROGERS et al., 2011).

1.2.1.2. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

O gênero *Staphylococcus* (Micrococcae) possui 33 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Faz parte da microbiota normal da pele humana e de outros sítios anatômicos. Ao contrário dos estreptococos, os estafilococos são produtores de catalase, considerada

um importante fator de virulência e essencial no processo de identificação, uma vez que transforma o peróxido de oxigênio (H_2O_2) em água e oxigênio inofensivos. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, é o *S. aureus*. São cocos gram-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. Podem ser microscopicamente encontrados na forma isolada, aos pares, em cadeias curtas ou até mesmo em agrupamentos irregulares, semelhante a um cacho de uvas (Figura 2). As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH=7, à temperatura ótima de 37 °C, e formam colônias arredondadas, lisas e brilhantes após 24 horas de incubação, desde acinzentadas até amarelas ouro. A capacidade hemolítica possibilita o desenvolvimento de um halo de hemólise ao redor das colônias formadas em placas de ágar sangue (AS), enquanto que a capacidade de fermentar o manitol garante a produção do ácido lático, observada no ágar manitol-sal, um meio seletivo e essencial no processo de identificação dessa espécie. *S. aureus* se distingue das demais espécies principalmente pela produção de coagulase, enzima que provoca a coagulação do plasma por ativar a protrombina, originando a trombina, que catalisa a ativação de fibrinogênio e origina o coágulo de fibrina (BASTOS et al., 2013).

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de *S. aureus* ampliado 4000 vezes.



Fonte: Science Photo Library, 2013b.

Sendo o homem considerado seu principal reservatório, está presente em diversas partes do corpo, tais como fossas nasais, garganta, intestinos e pele, sendo as narinas consideradas o maior sítio de colonização, com prevalência de aproximadamente 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais (GRUNDMANN et al., 2010). Apesar da diversidade de quadros clínicos, três tipos são principais: as infecções superficiais, como abscessos cutâneos e feridas; as infecções sistêmicas, como bacteremia, endocardite, osteomielite, artrite, miosite tropical e pneumonia, e os

quadros tóxicos, como síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e a intoxicação alimentar (DAVID e DAUM, 2010).

A produção de toxinas e indução da inflamação pirogênica é essencial no processo de patogênese, sendo o abscesso cutâneo a lesão típica de infecção causada pelo *S. aureus*. Normalmente, os abscessos sofrem necrose central e depois drenam para o exterior, como por exemplo, na forma de furúnculos, mas em alguns casos também podem ser disseminados na corrente sanguínea. Além disso, corpos estranhos, como suturas e cateteres intravenosos, são importantes fatores predisponentes à infecção por *S. aureus*. Dentre as várias toxinas e enzimas produzidas por essa bactéria, três exotoxinas clinicamente importantes são: a enterotoxina, a toxina da síndrome do choque tóxico e a esfoliatina (LEVINSON, 2010; TRABULSI e ALTHERTHUM, 2008).

Considerado o principal causador de infecções de feridas cirúrgicas em pacientes imunocomprometidos e com algum tipo de ferida com algum corpo estranho, o *S. aureus* é uma das causas mais frequentes de bacteremias em pacientes internados e geralmente em uso de cateteres intravenosos. A bacteremia, um processo secundário a infecções cutâneas ou de outros locais, pode originar diferentes tipos de infecções, como endocardites, osteomielites e abscessos metastáticos em vários órgãos, podendo até mesmo evoluir para sepse, que apresenta alta taxa de mortalidade, aproximadamente de 11 a 43% (VAN HAL et al., 2012).

Essa bactéria é responsável por aproximadamente 25 a 35% de todos os casos de endocardite, doença pós-operatória considerada uma ameaça constante para pacientes cirúrgicos hospitalizados. Indivíduos usuários de drogas ilícitas adquirem a infecção por meio de injeção intravenosa, enquanto que os não usuários, através da disseminação a partir de uma infecção local ou de cateteres intravenosos colonizados, e apresenta uma alta taxa de mortalidade (SELTON-SUTY et al., 2012).

A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* é uma das mais frequentes e ocorre através da ingestão de enterotoxinas pré-formadas em alimentos contaminados através do manuseio de indivíduos, portadores assintomáticos ou que apresentam algum tipo de infecção, geralmente cutânea. A termoestabilidade das enterotoxinas impede que estas sejam destruídas pelo cozimento dos alimentos. Se contaminado e armazenado em condições inadequadas, a bactéria irá prontamente se desenvolver. As manifestações clínicas, como náuseas, vômitos, diarreias e dores abdominais acontecem cerca de quatro horas após a ingestão do alimento e duram em média 12 horas (ARGUDÍN et al., 2010).

Antes da introdução dos antibióticos na década de 1940, a taxa de mortalidade da infecção por *S. aureus* foi de aproximadamente 90%. Apesar da aparente suscetibilidade em relação a vários fármacos contra bactérias gram-positivas (penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos,

tetraciclina e cloranfenicol), a capacidade de desenvolver resistência também é alta, principalmente quando se trata de amostras isoladas de pacientes hospitalizados (BASTOS et al., 2013).

A penicilina, fármaco de escolha em casos de suscetibilidade, atualmente teve seu efeito significativamente reduzido através da ampla disseminação de amostras resistentes, principalmente pela produção de β -lactamases. O surgimento e a disseminação progressiva da resistência à meticilina e outras penicilinas semissintéticas (oxacilina, nafcilina e cloxacilina) impulsionaram ainda mais as pesquisas direcionadas à epidemiologia, tratamento e controle das infecções causadas por esta bactéria. Em caso de infecções estafilocócicas graves, especialmente por cepas resistentes a meticilina (penicilina resistente a β -lactamase), a vancomicina é considerada o fármaco de escolha. Entretanto, o surgimento recente de cepas com suscetibilidade diminuída a esse fármaco, conhecidas como *Vancomycin Intermediate S. aureus* (VISA), incentiva ainda mais a busca de novos antimicrobianos eficazes no tratamento e controle das infecções causadas pelos estafilococos, em especial pelo *S. aureus* (HOWDEN, et al., 2010; CHAMBERS e DELEO, 2009).

1.2.1.3. *Salmonella* sp

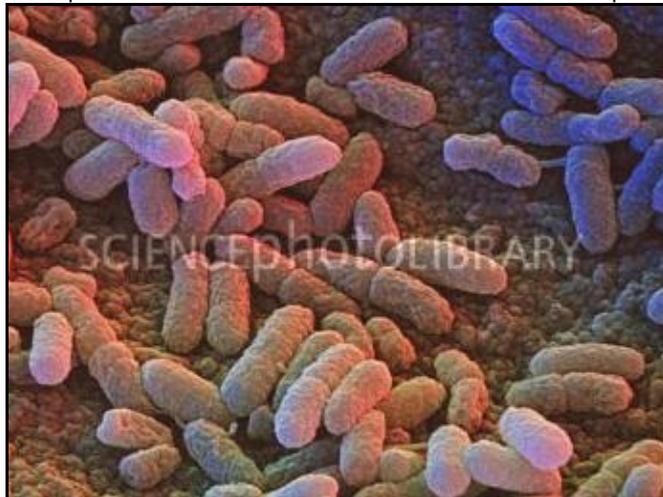
O gênero *Salmonella* (Enterobacteriaceae) compreende micro-organismos patogênicos para o homem e animais. A nomenclatura deste gênero é bastante incomum e difere da normal, já que em vez de espécies reconhecidas, existem diversos sorovares ou sorotipos para uma única espécie. A *Salmonella enterica*, infecciosa para animais de sangue quente, abrange mais de 2400 sorovares, ou seja, variedades sorológicas. Por exemplo, um sorovar como a *Salmonella typhimurium* pertence à espécie *enterica*, sendo mais corretamente denominada como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. De acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças, a atual convenção baseia-se no nome completo apenas na sua primeira menção e depois abreviá-lo, como se o sorovar fosse uma espécie. Os flagelos, cápsulas e paredes celulares das salmonelas funcionam como antígenos, pois permitem a produção de anticorpos específicos. Uma taxonomia mais recente acrescenta outra espécie, a *Salmonella bongori*, recentemente isolada de um lagarto, que reside em animais de sangue frio e raramente é encontrada em humanos (JARVIK et al., 2010).

As bactérias do gênero são bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e não fermentadores de lactose (Figura 3). Formam colônias negras no ágar *Salmonella Shigella* devido à produção de H_2S formando um precipitado negro com o ferro contido no ágar. O trato intestinal dos seres humanos e muitos animais é considerado seu habitat normal e todas as bactérias do gênero são consideradas patogênicas em algum grau. A forma de transmissão geralmente ocorre através da ingestão de alimentos contaminados de origem animal, principalmente

carne, aves domésticas, ovos e leite. São clinicamente divididas em salmonela tifoide e salmonela não tifoide (TORTORA et al., 2012).

A salmonelose, doença gastrointestinal menos grave causada por outras salmonelas (não tifoide), é considerada uma das formas mais comuns de infecção de origem alimentar. A estimativa é de que em 1,4 milhões de casos, cerca de 400 óbitos são relatados. Ao invadir a mucosa intestinal, a bactéria se multiplica, e a fim de penetrar nos sistemas linfático e cardiovascular e até mesmo invadir outros órgãos, dirige passagem através da mucosa intestinal, nas células M. Já dentro dos macrófagos, se replicam rapidamente, e dentro de 12 a 36 horas, produzem sintomas como febre moderada, acompanhada de náuseas, dor abdominal, cólicas e diarreia (KNODLER et al., 2010).

Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura de *Salmonella enteritidis* ampliado 6350 vezes.



Fonte: Science Photo Library, 2013c.

Apesar da taxa de mortalidade ser menor que 1%, lactentes e idosos apresentam uma maior susceptibilidade devido à morte por choque séptico. A completa recuperação ocorre dentro de alguns dias, mas muitos pacientes podem disseminar o patógeno em suas fezes por até seis meses, podendo infectar um novo indivíduo. Na salmonelose, bem como em outras doenças diarreicas, a antibioticoterapia é pouco útil, sendo a reidratação oral a melhor forma de tratamento. Alguns estudos mostraram que a ingestão de bactérias produtoras do ácido lático pode aliviar a diarreia e prevenir a colonização por *Salmonella enterica* durante a antibioticoterapia, pois ao colonizarem o intestino grosso, produzem ácido lático e bacteriocinas, capazes de inibir o crescimento de certos patógenos (TORTORA et al., 2012).

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. typhi*), causadora da febre tifoide, é considerada a doença mais grave causada por membros do gênero e também uma ameaça à vida humana. Resultando em aproximadamente mais de 200.000 mortes anuais, a febre tifoide continua a ser um problema de saúde global, principalmente em crianças nos países em desenvolvimento. Ao contrário

de outros sorovares de *Salmonella enterica*, como *S. typhimurium* ou *S. enteritidis*, associados com gastroenterite e que infectam uma grande variedade de hospedeiros, *S. typhi* é um agente patogênico humano exclusivo, sendo disseminado somente nas fezes de outros seres humanos (SONG et al., 2010). Apesar de sua baixa incidência, em alguns países deficientes de controle sanitário, a febre tifoide ainda é uma causa frequente de morte, com uma estimativa de meio milhão de mortes por ano (DEVI et al., 2010).

Ao se multiplicar dentro das células fagocíticas, *S. typhi* tem a capacidade de disseminar em outros órgãos, como baço e fígado. As células fagocíticas sofrem lise e finalmente liberam o patógeno na corrente sanguínea. Após cerca de 2 a 3 semanas, surgem os sintomas como cefaleia contínua e febre alta, que tende a declinar apenas na segunda ou terceira semana juntamente com o surgimento da diarreia. Nos casos mais graves da infecção, podem ocorrer ulceração e perfuração da parede intestinal. Aproximadamente 1 a 3% dos pacientes recuperados ainda abrigam o patógeno na vesícula biliar e continuam a disseminá-lo por vários meses; comumente chamados de portadores crônicos (MADIGAN et al., 2010).

Somente a partir de 1948, quando o cloranfenicol foi introduzido no mercado, é que a febre tifoide tornou-se uma doença tratável. Apesar de ainda ser utilizado mundialmente em áreas endêmicas, foi substituído por outros agentes mais seguros, embora mais caros. O tratamento mais efetivo é feito com quinolonas ou cefalosporinas de terceira geração, mas o problema de resistência ainda ocorre com frequência. A prevenção da doença se dá por meio de boas medidas de saneamento para deter a contaminação e de refrigeração correta para impedir o aumento do número de bactérias (TORTORA et al., 2012).

1.2.1.4. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

Identificado na Austrália em 1982, pelos pesquisadores Barry Marshall e J. Robin Warren, o *H. pylori* foi isolado a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes que apresentavam gastrite crônica e úlcera péptica. A capacidade de comprovar que esse patógeno era realmente o grande causador de gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico foi difícil, até que para convencer seus companheiros e todo o público, Barry Marshall tomou uma suspensão do patógeno e confirmou através dos postulados de Koch, que o *H. pylori* realmente era o grande causador das patologias gástricas citadas (COGO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2007).

Atingindo mais da metade da população mundial, o *H. pylori*, Figura 4, é classificado como uma bactéria Gram-negativa, espiralada e microaerófila que coloniza especificamente a mucosa gástrica. Na maioria dos casos é adquirido na infância e, quando não tratado, geralmente persiste até a vida adulta. Sua forma helicoidal favorece a movimentação impulsionada pelos flagelos, causando um rompimento

na proteção da mucosa estomacal, que em associação com a liberação de citocinas e ao processo inflamatório crônico, pode evoluir para patologias mais sérias e agudas, tais como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico (FIORENTINO et al., 2013; DANDLEN et al., 2011).

Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de *H. pylori* no estômago ampliado 3100 vezes.



Fonte: Science Photo Library, 2013d.

Por ser considerada uma das causas mais comuns de infecção a nível global e ter a capacidade de induzir a carcinogênese sem a administração de co-carcinógenos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o patógeno como carcinógeno Classe I para o câncer gástrico com base nos resultados de estudos epidemiológicos (FUKASE et al., 2008; FOCK et al., 2009; FIORENTINO et al., 2013). Além disso, o *H. pylori* rapidamente passou a ser alvo de diversos estudos nas mais diversas áreas da saúde, variando desde microbiológicos, como até mesmo histológicos, epidemiológicos, imunológicos, ecológicos, entre outros (SIQUEIRA et al., 2007).

Acredita-se que durante a infecção causada por este patógeno, ocorra um aumento da acidez gástrica e da secreção de gastrina, relação que tem atraído a atenção de diversos pesquisadores de diversas áreas científicas, a fim de buscar alternativas terapêuticas que possam se comportar favoravelmente frente a todos os fatores envolvidos. Sendo a mucosa gástrica considerada seu principal habitat, é de extrema importância sua sobrevivência em meio ácido, garantida por meio da enzima urease, capaz de hidrolisar, em meio ácido, a ureia presente em condições fisiológicas no suco gástrico. Através dessa hidrólise, ocorre a produção de amônia, que atua como um receptor de íons H^+ e por consequência gera um pH neutro no meio intracelular. A urease e a amônia promovem desestabilização da camada de muco e conseqüentemente levam a formação de lesões sobre as células de revestimento. Além disso, a urease também pode estar envolvida na ativação de neutrófilos, monócitos e do sistema imune, gerando uma lesão inflamatória local (WROBLEWSKI et al., 2010).

O *H. pylori* é considerado agente etiológico de diversos tipos de patologias gástricas, frequentemente envolvida em processos de gastrite crônica, dispepsia funcional, úlcera duodenal ou péptica, e câncer ou linfomas gástricos. Por apresentar perfil de sobrevivência em ambientes ácidos, mantêm-se íntegro em ambiente estomacal e promove a destruição da mucosa gástrica tornando o órgão sensível e vulnerável ao desencadeamento de lesões ulcerativas, além de bloquear o processo de esterilização dos alimentos gerando falhas no processo de digestão. Pacientes que apresentam quadros de gastrite crônica encontram-se em alto patamar de risco para o desenvolvimento de úlcera péptica e carcinomas, com mais severidade no desenvolvimento do câncer. Entre as pessoas mais idosas e que passaram por gastrectomia parcial, destacam-se os indivíduos portadores de gastrite crônica atrófica multifocal, um tipo de patologia autoimune, na qual anticorpos passam a atacar o revestimento estomacal, tornando-o mais delgado e causando perda de muitas ou todas as células produtoras de ácido e de enzimas. Por interferir na absorção de vitamina B12 presente nos alimentos, a gastrite atrófica pode até mesmo provocar anemia perniciosa, uma redução nos glóbulos vermelhos que ocorre quando o intestino não é capaz de absorver adequadamente a vitamina B12. No geral, os sintomas da gastrite envolvem queimação, dor abdominal, perda do apetite, náusea, vômito, sensação de saciedade e sangramento digestivo. A dificuldade na absorção de alguns elementos e vitaminas podem causar também quadros de fraqueza e diarreia (BURNETT-HARTMAN et al., 2008; BANERJEE et al., 2008; NDIP et al., 2008).

Dentre todas as afecções causadas por este patógeno, maior foco é dado ao desenvolvimento do câncer do estômago. Classificado na quarta posição no ranking mundial de neoplasias, este tipo de patologia encontra-se diretamente relacionada ao progresso da ação maligna do micro-organismo e pré-disposições genéticas. Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer, realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostraram que 20.090 novos casos de câncer gástrico causados pelo *H. pylori* estavam previstos para 2012 no Brasil, sendo 63% encontrados em homens. Aproximadamente 65% dos pacientes diagnosticados com câncer gástrico possuem mais de 50 anos, sendo o pico de incidência por volta dos 70 (INCA, 2013).

Diversos produtos naturais têm demonstrado atividade antimicrobiana contra o *H. pylori* e durante séculos, uma ampla variedade de plantas e substâncias derivadas de fontes alternativas tem sido utilizada no tratamento de doenças gastrointestinais, principalmente quando se diz respeito ao elevado grau de resistência que esta bactéria vem apresentando (COGO, 2010). Dados apresentados pela literatura mundial demonstram resultados expressivos obtidos por meio de extratos vegetais contra o *H. pylori*, gerando contribuições significativas para o aumento do arsenal terapêutico utilizado em casos infecciosos.

1.2.2. Levedura

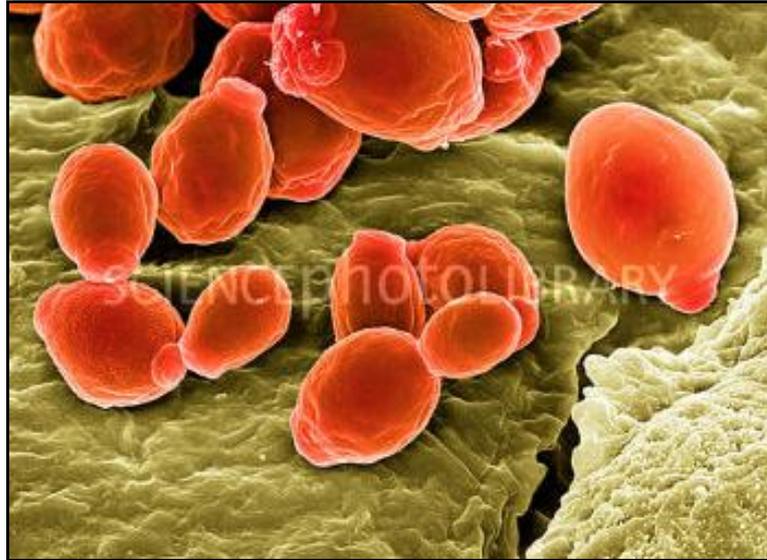
1.2.2.1. *Candida albicans* (*C. albicans*)

Diante da imunossupressão causada em pacientes por diversas doenças, principalmente aqueles infectados com o *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), maior atenção tem sido dada as doenças causadas por fungos, já que a redução de linfócitos CD4+ predispõe o paciente a diversas infecções fúngicas, principalmente aquelas causadas pelo gênero *Candida* (BARBEDO e SGARBI, 2010).

Cerca de 200 espécies de leveduras (Figura 5) que compõe este gênero estão presentes nos mais diversos ambientes corporais, entre eles a cavidade bucal, orofaringe, secreções brônquicas, dobras da pele, fezes, urina e vagina. Algumas espécies se limitam a determinadas regiões, enquanto outras, como a *C. albicans* distribuem-se amplamente, além de ser considerada a espécie com maior relevância no que se diz respeito à taxa de prevalência em condições de normalidade e doença (ÁLVARES et al., 2007). Cerca de 60% dos isolados de amostras clínicas mostram infecções causadas por esta espécie (BARBEDO e SGARBI, 2010). É no decorrer ou pouco depois do nascimento que as leveduras deste gênero iniciam seu processo de colonização nas mucosas de todos os seres humanos, como pele, trato gastrointestinal e reprodutivo (ACHKAR e FRIES, 2010). São consideradas leveduras comensais, pois são capazes de se adaptarem rapidamente ao corpo humano e colonizá-lo sem que ocorra o desenvolvimento de alguma doença, mesmo em condições fisiológicas normais. A candidíase, assim conhecida as doenças causadas por espécies deste gênero, somente ocorrem quando há um desequilíbrio entre o hospedeiro e este micro-organismo (ÁLVARES et al., 2007). Quando não oriundas da microbiota, as candidíases são consideradas exógenas, como uma doença sexualmente transmissível (DST) (BARBEDO e SGARBI, 2010).

Dependendo do lugar atingido, a candidíase pode ser cutânea, mucosa, cutaneomucosa ou visceral. Por preferir ambientes quentes e úmidos, a cavidade oral e a vagina são consideradas os locais preferidos por este patógeno. A candidíase cutaneomucosa crônica geralmente acontece quando a resposta imune mediada por células está debilitada, enquanto que a candidíase vaginal crônica é desencadeada por fatores exógenos, como o uso de determinados medicamentos, principalmente antibióticos e contraceptivos orais, gestação, atividade sexual, que causa traumas de mucosa, e uso contínuo de roupas apertadas (ÁLVARES et al., 2007; BARBEDO e SGARBI, 2010).

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* ampliado 8500 vezes.



Fonte: Science Photo Library, 2013e.

A candidíase cutaneomucosa pode especialmente ser dividida em não genital ou geniturinária. Entre as não genitais, a candidíase oral constitui a infecção fúngica mais frequente entre os pacientes imunocomprometidos, principalmente os infectados com HIV (ACHKAR e FRIES, 2010). Cerca de 90% dos indivíduos soropositivos apresentarão casos de candidíase orofaríngea pelo menos uma vez na vida (BARBEDO e SGARBI, 2010). Entre as geniturinárias, a candidíase vulvovaginal (CVV) é a mais comum, acometendo cerca de 75% das mulheres adultas pelo menos uma vez durante a vida (ARAÚJO et al., 2013), podendo ou não apresentar episódios de recorrência, enquanto que a candidúria, apesar de poder atingir ambos os sexos, são mais frequentes em pacientes imunocomprometidos e neonatos. A CVV pode ser definida como os sinais e sintomas inflamatórios na presença evidenciada desse patógeno e é a segunda causa mais frequente de infecção genital, perdendo apenas para a vaginose bacteriana (BARBOSA et al., 2012). Quando esse quadro ocorre por pelo menos quatro vezes durante o período de 1 ano, considera-se a mesma como recorrente, sendo mais frequentemente causada por outras espécies, ditas não-*albicans* (ACHKAR e FRIES, 2010).

O tratamento da CVV geralmente é feito com derivados azólicos administrados por via oral ou tópica, contudo a exclusão dos fatores predisponentes e o tratamento ao parceiro, quando transmitida sexualmente, tornam-se indispensáveis. Em alguns países, como Estados Unidos da América, o diagnóstico e tratamento da CVV geram custos anuais na ordem dos mil milhões de dólares (BARBOSA et al., 2012).

Apesar de todos os avanços científicos na terapia medicamentosa, a resistência adquirida por algumas cepas fúngicas também é crescente e preocupante. Recentemente, diversos isolados genitais de *Candida* tem apresentado índice considerado de resistência em casos de candidíases recorrentes.

Diante do crescente número de casos relacionados à infecção por diversas espécies de *Candida* sp, é importante a busca de novos agentes antifúngicos que possam ser eficazes até mesmo contra cepas que tem apresentado elevado grau de resistência aos antifúngicos convencionais, além da redução dos impactos negativos sociais e ambientais causados pelos resíduos químicos dos medicamentos sintéticos (ARAÚJO et al., 2013).

1.3. Antimicrobianos

Os antimicrobianos são fármacos utilizados no tratamento de infecções microbianas na medicina humana e veterinária (ARIAS e CARRILHO, 2012). Podem ser representados por compostos naturais ou sintéticos que tem a capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias, podendo ser classificados como fungostáticos/bacteriostáticos ou fungicidas/bactericidas, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2010).

Os antimicrobianos sintéticos apresentam algumas limitações, como o desencadeamento de efeitos colaterais tóxicos e o alto grau de resistência adquirida por diversos micro-organismos. A resistência microbiana pode ser definida como uma resposta do micro-organismo, o qual cria estratégias para driblar os diversos mecanismos medicamentosos (BOLIVAR et al., 2011; ARIAS e CARRILHO, 2012). As mutações ocorridas nos genes de expressão relacionados à resistência são frequentemente apresentadas quando determinado agente antimicrobiano é usado esporadicamente (ARENDRUP et al., 2010). Além disso, os quadros de infecções com cepas resistentes nas unidades de terapia intensiva (UTIs) levam a um aumento do custo e mortalidade (BARAI et al., 2010).

Diante desse contexto, o uso excessivo e irracional dos antimicrobianos se tornou motivo de preocupação mundial, já que o surgimento dessas cepas microbianas cada vez menos sensíveis aumenta a chance de falha na terapia medicamentosa, esgotando as possibilidades de tratamento e até mesmo elevando o índice de mortalidade (BOLIVAR et al., 2011; ARIAS e CARRILHO, 2012). Com a resistência aos antibióticos atingindo o ponto de crise em inúmeros centros médicos e científicos de todo o mundo e tão quanto o crescente índice de resistência afetando as comunidades em geral, houve uma necessidade urgente de reposição do arsenal de agentes antimicrobianos (TIM CUSHNIE, 2011).

O agravamento desse quadro incentivou a investigação de produtos naturais com tal atividade, e tem se tornado um item relevante na caracterização biológica de extratos vegetais, devido as mais diversas substâncias com potencial antimicrobiano que são produzidas pelas plantas (DAS et al, 2010).

1.4. Plantas medicinais e Fitoterápicos

O domínio do conhecimento do uso de plantas e ervas medicinais pela população se deu ao longo do processo evolutivo, quando o homem foi aprendendo a selecionar as plantas para garantir sua alimentação e aliviar seus males e doenças. Até hoje, algumas pessoas ainda fazem uso dessa medicina tradicional, seja por opção ou até mesmo por falta de acesso ao medicamento industrializado (FERREIRA e PINTO, 2010).

A fim de garantir sua sobrevivência e evolução, as plantas competem entre si por espaço e se defendem do ataque de herbívoros, já que por trás da beleza da natureza, esconde-se uma guerra surda pela sobrevivência dos mais aptos. É nesse contexto que a complexidade de sua constituição química se destaca, principalmente na biossíntese de substâncias atuantes em alvos específicos moleculares de seus predadores. Além disso, a produção de metabólitos secundários de plantas e micro-organismos, com o objetivo de modular seus próprios metabolismos, pode conseqüentemente alcançar determinados alvos terapêuticos de doenças humanas (FERREIRA e PINTO, 2010; CSEKE et al., 2006).

Possuindo cerca de 25% da flora mundial, o Brasil situa-se em uma posição privilegiada por apresentar uma das mais ricas biodiversidades (CASTILHO et al., 2007), contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Cerca de 7% da superfície da terra correspondem a regiões priorizadas por alguns programas de conservação. Ocupando a quinta posição no cenário mundial em termos de biodiversidade, destaca-se o rico bioma Mata Atlântica, considerado uma das florestas mais ameaçadas do mundo (MARTINS-RAMOS et al., 2010). Juntamente com a vasta biodiversidade, os conhecimentos populares foram imprescindíveis na busca de novos agentes terapêuticos de origem natural (OLIVEIRA et al., 2011).

Pode-se dizer que as plantas medicinais foram, durante muito tempo, o único e principal recurso terapêutico no tratamento de doenças. Os avanços cada vez mais modernos no meio técnico-científico, principalmente nos países mais desenvolvidos, resultaram em tratamentos feitos com medicamentos alopáticos industrializados, gradativamente introduzidos no cotidiano da população por meio de propagandas que prometiam a cura das mais diversas doenças em um curto período (BADKE et al., 2011).

Apesar de todo marketing e incentivo da indústria farmacêutica na aquisição de medicamentos alopáticos, em alguns países, principalmente no Brasil, uma grande parte da população ainda depende das práticas complementares para cuidar de sua saúde, principalmente das plantas medicinais, muitas vezes utilizadas para aliviar ou até mesmo curar uma série de enfermidades (YUNES e CECHINEL FILHO, 2012; BADKE et al., 2011). A OMS estima que mais de 80% das necessidades em cuidados da

saúde nos países em desenvolvimento são atendidas através de práticas tradicionais de cuidados da saúde (WHO, 2013d). Diante desse quadro de mudanças econômicas, políticas e sociais, o uso terapêutico desses recursos naturais, que antes se destinava apenas as pessoas incapazes de adquirir um medicamento industrializado, hoje tenta inserir-se no meio dominado pelas práticas alopáticas (BADKE et al., 2011).

O interesse da comunidade científica pelas plantas medicinais e pela fitoterapia é cada vez mais evidente, já que potenciais terapêuticos e econômicos têm sido descobertos, especialmente, pela indústria farmacêutica, a qual realiza a prospecção de produtos cada vez mais inovadores, com menos efeitos indesejáveis do que os fármacos já existentes (COSTA et al., 2010). Além disso, a enorme diversidade de estruturas e propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos naturais encontrados na natureza tem impressionado de forma significativa os pesquisadores da área, embora seja pequena a porcentagem de plantas avaliadas quanto ao seu potencial medicinal, segundo dados disponíveis na literatura (BRESOLIN e FILHO, 2010).

Os conhecimentos populares e as pesquisas científicas sobre o uso medicinal de plantas acabou de certa forma beneficiando as indústrias farmacêuticas. Cerca de 50% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006 são de certa forma, direta ou indiretamente, derivados de produtos naturais (FERREIRA E PINTO, 2010).

O crescente interesse na descoberta das atividades biológicas apresentadas por plantas possibilitou o surgimento de diversas estratégias tecnológicas que variam desde o *screening* biológico, isolamento, até as triagens clínicas, métodos considerados essenciais na descoberta de valores terapêuticos de uma ampla variedade de plantas (BIBI et al., 2011). Diversos podem ser os potenciais terapêuticos apresentados por determinados extratos vegetais, destacando-se a atividade antimicrobiana contra uma série de agentes infecciosos. Uma série de plantas tem apresentado marcante atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, justificando dessa maneira a intensa busca na medicina tradicional direcionada na caracterização antimicrobiana das plantas (DIAZ et al., 2010).

A atividade biológica de plantas medicinais, provindas de diversas regiões do mundo, vem sendo estudada por vários grupos de pesquisadores que se baseiam no uso popular de suas espécies. Uma série de estudos relata a presença de diversas substâncias, incluindo extratos e óleos vegetais que são eficazes no controle do crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos, desde fungos filamentosos, até mesmo bactérias e leveduras (KLUCZYNIK et al., 2010).

No Brasil, a criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), instituída pela Portaria no Ministério da Saúde (MS) nº 971, de 03 de maio de 2006, permitiu que os usuários do SUS tivessem maior facilidade no acesso as opções terapêuticas, garantindo o acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à

fitoterapia, de forma segura, eficaz e com qualidade, e dessa maneira possibilitando a integralidade da atenção à saúde (BADKE et al., 2011).

Desde 2007 dois medicamentos fitoterápicos passaram a ser fornecidos pelo SUS: espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) - para gastrites e úlceras gástricas - e guaco (*Mikania glomerata*) - para tosses e gripes, em apresentações na forma de cápsula, comprimido e xarope, entre outras. Na busca de oferecer mais opções terapêuticas a base de plantas medicinais para a população, instituiu-se o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Atualmente, o SUS vem utilizando cerca de 71 plantas medicinais presentes na lista divulgada pelo MS em 2009. A escolha foi feita com enfoque nas doenças que mais afetam a saúde da população, como diabetes, dores, artrites, úlceras, hipertensão, inflamações, dentre outras doenças crônicas. Em 2010, diversos medicamentos produzidos a base de alcachofra, aroeira, cáscara sagrada, garra do diabo, isoflavona da soja e unha de gato aumentaram a lista de fitoterápicos de dois para oito e passaram a ser oferecidos pelos postos de saúde, indicados para problemas de prisão do ventre, inflamações, artrite reumatoide, e sintomas do climatério. É importante ressaltar que tais fitoterápicos foram extraídos de espécies da flora brasileira não ameaçadas de extinção, garantindo dessa maneira o uso sustentável da biodiversidade nacional. Ainda assim, as espécies vegetais da lista ainda são consideradas insuficientes para suprir as necessidades de planos governamentais de saúde, inclusive dentro da PNPMF (ANVISA, 2012).

As ações decorrentes dessa política são imprescindíveis para garantir à população uma série de benefícios em relação às práticas tradicionais de saúde, como facilitar o acesso aos medicamentos, bem como a inclusão social e regional, ao desenvolvimento industrial e tecnológico. O uso sustentável da biodiversidade e a valorização e preservação do conhecimento tradicional das comunidades tradicionais e indígenas são considerados fatores essenciais para a melhoria dessa prática (ANVISA, 2012). Apesar disso, diversas etapas consideradas essenciais para assegurar a eficácia e segurança dos fitoterápicos ainda são deficientes. Estas incluem a correta caracterização química das matérias-primas vegetais, bem como a avaliação das atividades farmacológicas e toxicológicas (SILVA et al., 2011). Dentre as espécies vegetais listadas pelo Ministério da Saúde e relacionadas como plantas medicinais encontra-se o *Astronium* sp.

1.5. *Astronium* sp

Juntamente com o aumento da expectativa de vida, surgem também as doenças crônicas apresentadas pela população. Nesse contexto, enfatiza-se a demanda por medicamentos úteis no tratamento dessas doenças, especialmente aquelas do trato digestório (úlceras gástricas e duodenais, colite ulcerativa e doença de *Crohn*), diabetes, câncer e demais doenças inflamatórias. O uso de

fitoterápicos padronizados com eficácia e segurança determinadas é essencial e vem apresentando recentemente resultados significantes. A fim de padronizar novos fitoterápicos para o tratamento de doenças crônicas na população brasileira, um grupo de pesquisadores incluindo botânicos, químicos, farmacêuticos e biológicos estão constituindo seus estudos em um projeto temático intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas”, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, com suporte financeiro da FAPESP (Projeto Biota – processo nº 09/52237-9). Todos os extratos devem ser preparados de acordo com as normas farmacopeias e devidamente avaliados quanto seus aspectos farmacológicos e toxicológicos. Esse projeto é constituído de estudos envolvendo plantas incluídas na lista proposta pelo SUS com atividade em doenças crônicas, em especial as utilizadas no combate a doenças do trato gastrointestinal como *Astronium* sp (Anacardiaceae). Dessa maneira, confirma-se a importância de uma equipe multidisciplinar e interinstitucional a fim de favorecer a disseminação do conhecimento e completo estudo integrado da planta medicinal, além da otimização dos recursos financeiros o qual contribui para os avanços tecnológicos e científicos do país.

A família Anacardiaceae é composta de árvores, arbustos, trepadeiras lenhosas ou meio-arbustos, geralmente com dutos de resina bem desenvolvidas. Sua diversidade é estimada em cerca de 73 gêneros e de 600 a 850 espécies. A maioria das espécies são tropicais e subtropicais, enquanto que algumas podem ser encontradas em regiões temperadas (SAWANGCHOTE et al., 2009). Além disso, a família Anacardiaceae é bastante reconhecida por seus representantes alimentícios, como por exemplo, a manga (*Mangifera indica* L.), o caju (*Anacardium occidentale* L.), a seriguela (*Spondias mombin* L.) e o pistache (*Pistacia vera* L.) (JUDD et al., 2007; LORENZI, 2008), enquanto que outros gêneros são mais reconhecidos por sua importância biológica, como por exemplo, o *Astronium* sp (LUNA, 2012).

O gênero *Astronium* (Anacardiaceae) é constituído por 13 espécies e oito variedades, distribuídas desde o México até a Argentina, incluindo as ilhas de Trinidad e Tobago. De acordo com a literatura, 12 espécies são encontradas do Norte ao Sul do Brasil, ocupando vários habitats, como as áreas do Cerrado nos pantanais do Mato Grosso, florestas caatingas e áreas circundantes, floresta amazônica e Mata Atlântica (AGUIAR et al., 2003). Trata-se de um gênero de grande importância econômica para a produção de taninos e resinas, bem como de alguns frutos comestíveis. Algumas espécies são cultivadas como plantas ornamentais (LUNA, 2012). Até recentemente, este apresentava alguns problemas em relação a sua taxonomia. Em 1968, o gênero *Astronium* era constituído de dois subgêneros, entre eles o *Myracrodruon*. Tal conceituação foi aceita até que em 1991, Santin e Leitão-Filho retiraram este subgênero do gênero *Astronium* e restabeleceram-no como um gênero a parte

(CARMELLO-GUERREIRO e PAOLI, 2000); apesar disso, diversos estudos literários ainda consideram as duas taxonomias.

1.5.1. *Astronium fraxinifolium* (*A. fraxinifolium*)

Dentre as espécies deste gênero, o *A. fraxinifolium* (Gonçalo-Alves) é considerada uma das espécies com maior distribuição no Brasil. Trata-se de uma espécie arbórea de cerrado extremamente densa (1,09 g/cm³), Figura 6, compacta, rígida e resistente ao apodrecimento quando em contato com o solo por longos períodos, fato que pode ser explicado pelo alto teor de taninos. É muito utilizada nas construções civil e naval, na marcenaria, para confecção de dormentes a portas de fino acabamento, além de ser uma opção para o paisagismo por seu porte médio e beleza da copa (FEITOSA et al., 2011; AGUIAR et al., 2003). As folhas desta espécie são popularmente utilizadas para diarreias, hemorroidas e na forma de chá/banho como antisséptico para úlceras da pele (MACEDO e FERREIRA, 2004).

Figura 6. Fotografia de *A. fraxinifolium*.



Fonte: Câmara dos Deputados, 2014; Embrapa, 2013a.

Pinto et al. (2010) estudaram a atividade *in vitro* e *in vivo* de extratos metanólicos do caule, folha e flores de diversas espécies, entre elas o *A. fraxinifolium* frente ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, principal agente causador da antracnose. Dentre os 300 extratos de plantas testadas no ensaio *in vitro*, apenas 13 apresentaram atividade antifúngica, entre elas o *A. fraxinifolium*, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 1,45 mg/mL.

1.5.2. *Astronium graveolens* (*A. graveolens*)

A. graveolens Jacq. (guaritá) é uma espécie arbórea comum de floresta semidecídua, de grande variedade desde o México até a América do Sul. Mede cerca de 15 a 25 metros de altura e tronco entre 40 a 60 cm de diâmetro. Apresentam folhas compostas de 4 a 7 pares de folíolos dotados de cheiro característico, com tamanhos desiguais variando entre 6 a 8 cm e os menores de 4 a 5 cm (Figura 7). As frutas apresentam entre 1-1,5 cm de comprimento e contem uma única semente de 9-10 mm de comprimento (SILVA et al., 2010a; VILLASEÑOR-SÁNCHEZ et al., 2010). Alguns estudos demonstraram que esta espécie apresenta atividade repelente a insetos, que pode ser justificada pela presença de diversos componentes voláteis (CHEN et al., 1984).

Figura 7. Fotografia de *A. graveolens*.



Fonte: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2014; Smithsonian Tropical Research Institute, 2013.

Uma série de plantas possui a capacidade de causar, direta ou indiretamente, algum efeito sobre outro organismo através da produção e liberação de metabólitos, conhecido como potencial alelopático. Silva et al. (2010) verificaram tal potencial no extrato etanólico da folha de *A. graveolens* pela capacidade de interferir diretamente na germinabilidade, velocidade média e no tempo de germinação durante o bioensaio com *Brassica chinensis* (couve-da-malásia) e *Lactuca sativa* (alface). É importante mencionar que essa capacidade de atuação ocorre somente na presença de uma concentração mínima dessas substâncias aleloquímicas no ambiente.

1.5.3. *Astronium urundeuva* (*A. urundeuva*)

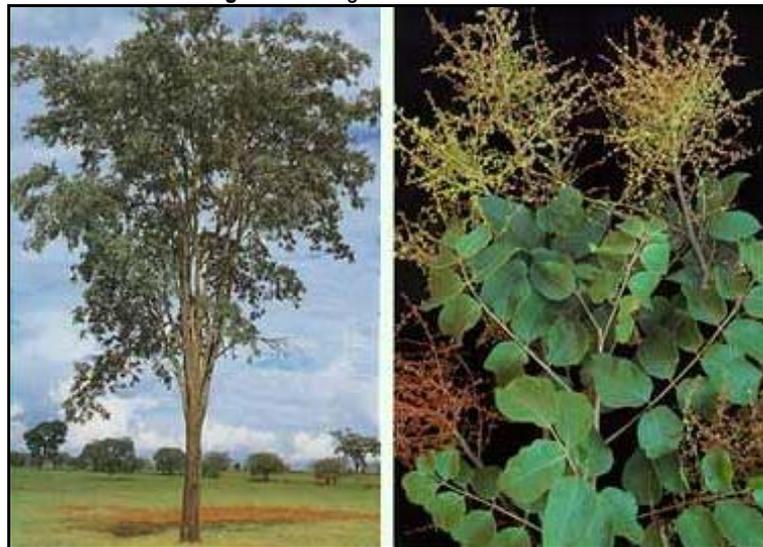
A. urundeuva (Allemão) Engl., Figura 8, é popularmente conhecida como aroeira-preta ou aroeira-do-sertão. Sua distribuição se limita a América do Sul, nas regiões nordeste, sudeste e centro-oeste e se associa a ambientes secos do cerrado, savanas e caatingas, sendo polinizada pelo vento e

apresenta uma pequena flor (GAINO et al., 2010). O porte da aroeira varia conforme a região de ocorrência, mas geralmente apresenta 30 metros de altura, com inflorescência entre julho e setembro e maturação dos frutos de setembro a outubro, compostos por uma única semente (NUNES et al., 2008).

É uma das principais plantas utilizada na medicina tradicional nordestina para o tratamento de várias doenças (CUNHA et al., 2009). O extrato do caule é bastante utilizado sob a forma de semicúpio (“banho-de-assento”) após o parto. Além disso, é indicada também no tratamento de gastrites, úlceras gástricas, cervicites, vaginites, hemorroidas (LORENZI, 2008) e como anti-inflamatório e cicatrizante natural (PINHO et al., 2012).

Apresenta como principais constituintes fitoquímicos óleos essenciais, taninos hidrolisáveis e condensados, considerados os principais responsáveis pelas atividades terapêuticas apresentadas (CUNHA et al., 2009). Foram identificados cerca de 16 constituintes voláteis nas folhas de *A. urundeuva*, como por exemplo o β -cariofileno, considerado o principal constituinte extraído do óleo essencial das folhas. Dessa forma, a presença de óleos voláteis justifica o aroma típico encontrado nas folhas (VIANA et al., 1995; SÁ, 2008).

Figura 8. Fotografia de *A. urundeuva*.



Fonte: Lorenzi, 2008.

Em 1987, Rao et al. (1987) comprovaram a atividade antiulcerogênica *in vitro* do extrato aquoso de *A. urundeuva* em lesões gástricas de ratos, induzidas por ácido acetilsalicílico. Mais recentemente, Carlini et al. (2010) observaram os efeitos antiulcerogênicos de extratos etanólicos e aquosos das raízes de *A. urundeuva* contra úlceras experimentais em ratos, e outros estudos ainda têm demonstrado efeitos antioxidantes, antidiarreicos, anti-inflamatórios e analgésicos.

Monteiro et al. (2005), apontaram o *A. urundeuva* como uma planta valiosa no combate a diversas doenças incluindo de lesões de pele e subcutâneas, tosse, neoplasias, inflamações em

diversos sistemas (urogenital, respiratório, digestivo e circulatório) e verificaram que o caule desta espécie é a parte mais utilizada pela comunidade científica, pois apresenta uma maior quantidade de compostos fenólicos. A elevada quantidade desse constituinte permite sua classificação como muito rica em metabólitos secundários, os quais podem ou não estar associados com a lignina, e provavelmente são responsáveis pela pronunciada resistência natural frente à degradação química e biológica (QUEIROZ et al., 2002).

Além de discreta atividade antibacteriana contra *S. aureus*, Desmachelier e colaboradores (1999) verificaram as atividades antioxidante e antirradicais livres de extratos metanólicos do caule de diversas espécies da caatinga e, dentre todas, a melhor atividade foi atribuída ao extrato de *A. urundeuva*.

O processo de degradação de madeiras geralmente acontece na presença de fungos ou insetos, e representa um dos fatores mais limitantes para sua utilização. Diversos estudos demonstraram o potencial biológico do *A. urundeuva* contra *Nasutitermes corniger* (Sá et al., 2008), *Aedes aegypti* larvae (Sá et al., 2009a) e *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium fusarioides*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Fusarium verticiloides* (Sá et al., 2009b). Sá et al. (2009c) também realizaram a análise fitoquímica de extratos metanólicos e salinos do cerne de *A. urundeuva* e verificaram que seu potencial antioxidante, antifúngico e termiticida está diretamente relacionado com a marcante resistência e durabilidade natural apresentada por esta espécie.

Cecílio et al. (2012) investigaram a atividade antiviral *in vitro* de extratos das folhas de 14 plantas medicinais tradicionalmente utilizadas para o tratamento da diarreia contra o rotavírus símio SA-11. Os resultados mostraram que dentre todas as espécies, apenas quatro, com destaque para o *A. urundeuva*, exibiram as melhores atividades contra o rotavírus.

Pinho et al. (2012) a fim de investigar o potencial fitoterápico de espécies da Mata Atlântica e Cerrado brasileiro e incentivar o uso renovável desses recursos, realizaram o rastreamento fitoquímico de metabólitos secundários e testaram o potencial antimicrobiano de extratos hidroetanólicos de folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), aroeira-do-sertão (*A. urundeuva*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e da casca do fruto de pequi (*Caryocar brasiliense*) frente a *S. aureus* e *E. coli*, ambos agentes de elevada prevalência na etiologia dos processos infecciosos bacterianos, através da técnica de difusão em ágar. A análise fitoquímica revelou componentes como flavonoides (flavanonas, flavanonóis), saponinas e taninos com propriedades antimicrobianas em todos os extratos. Os extratos das folhas de aroeira-do-sertão (200 mg/mL), barbatimão (300 mg/mL) e erva baleeira (400 mg/mL) inibiram o crescimento de *S. aureus*, mas não de

E. coli. O extrato hidroetanólico da aroeira evidenciou atividade bacteriostática crescente de 200 a 400 mg/mL.

Napoleão et al. (2012) estudaram a atividade larvicida da lectina extraída das folhas de *A. urundeuva* contra *Aedes aegypti*, principal vetor responsável pela transmissão do vírus causador da dengue. Os resultados mostraram diversas alterações metabólicas do *A. aegypti* causadas pela lectina, podendo torná-la um novo agente larvicida biodegradável no controle da dengue.

Costa et al. (2010), avaliaram a ação antimicrobiana de extratos etanólicos da aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi), aroeira-do-sertão (*A. urundeuva* [Fr. All.] Engl.), ameixa-do-mato (*Ximenia americana* L.), quixabeira (*Syderoxylum obtusifolium* [Roem et Schult.]) e hipoclorito de sódio (NaOCl 2,5%), contra *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) através do método de difusão em ágar e utilizando-se a clorexidina a 0,12% como controle positivo. Os resultados mostraram halos de inibição da aroeira-do-sertão e aroeira-da-praia superiores aos outros extratos vegetais e ao NaOCl (2,5%), com diferença estatisticamente significativa (teste t, $p \leq 0,05$).

Jandú et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica do extrato metanólico do caule de *A. urundeuva* e identificou seus componentes fenólicos majoritários. O extrato apresentou atividade contra *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus*, e foi capaz de potencializar o efeito da eritromicina contra algumas cepas de *S. aureus* isoladas clinicamente. Além disso, *A. urundeuva* também apresentou efeito antioxidante.

As propriedades fitoquímicas e biológicas do *Astronium* sp estimularam uma maior investigação sobre os compostos biologicamente ativos, com aplicabilidades nas áreas de tratamento de diversas doenças crônicas. Diversos estudos apontam uma série de atividades terapêuticas apresentadas pelas espécies *A. fraxinifolium* e *A. urundeuva* devido ao alto teor de metabólitos secundários, principalmente de óleos essenciais, os quais apresentam características bastante promissoras para utilização como agentes antimicrobianos (MONTANARI, 2010). O uso das folhas e cascas dessas espécies vegetais pode constituir-se numa alternativa sustentável, viável e acessível para tratamento antimicrobiano.

1.6. Atividade antimicrobiana

Uma das principais etapas para se medir o potencial biológico dos produtos naturais é a atividade antimicrobiana, a qual pode ser avaliada por diversos métodos laboratoriais que variam desde os mais simples, como a macrodiluição, a microdiluição, a difusão em ágar ou até mesmo os mais modernos e automatizados. Possuem a capacidade de medir a sensibilidade e/ou atividade *in vitro* dos

micro-organismos em relação às biomoléculas, além de orientar a escolha da terapia antimicrobiana mais adequada e até mesmo representar uma importante ferramenta no monitoramento da evolução da resistência bacteriana. Dentre estes, destaca-se a técnica de microdiluição, que apresenta como principal objetivo demonstrar a concentração mínima da substância a ser testada necessária para inibir o crescimento microbiano (CIM). Além de possibilitar a utilização de mais de uma substância-teste, bem como de diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio, é possível que este seja realizado em microplacas, exigindo pequenos volumes de amostras e reagentes, fato extremamente vantajoso quando se trabalha com produtos naturais, que na grande maioria das vezes são obtidos em pequenas quantidades (COWAN, 1999; ALVES et al., 2008; YUNES e CALIXTO, 2001; DAS et al., 2010; ANVISA, 2013). Neste contexto, a incorporação da tecnologia para aprimorar o emprego de plantas medicinais e fitoterápicos deve ser estimulada juntamente com o desenvolvimento de mecanismos de monitoramento e avaliação de sua atividade biológica (ANVISA, 2012).

1.7. Nanotecnologia: uma nova abordagem na busca por novos antimicrobianos

A complexidade química dos extratos é extremamente relevante no sucesso de uma formulação, pois também desempenham um papel fundamental na liberação do ativo. Para isso, os veículos de liberação devem, ao mesmo tempo, ser capaz de aprimorar a solubilização do fármaco, minimizar o processo de degradação, reduzir a toxicidade, mascarar o sabor, controlar a absorção do ativo bem como a resposta biológica (KESARWANI e GUPTA, 2013; HOLMBERG, 2002).

Como mencionado, as ciências fitoquímica e fitofarmacológica estabeleceram a composição e atividade biológica de numerosos produtos de plantas medicinais. A maioria dos constituintes biologicamente ativos dos extratos, como por exemplo, os flavonoides, taninos, terpenoides, são altamente hidrossolúveis, mas apresentam baixa absorção, ou por serem incapazes de atravessar a membrana lipídica das células ou por apresentarem tamanho molecular elevado, dificultando sua absorção, gerando perda de biodisponibilidade e conseqüentemente da eficácia. É por esse e outros motivos que uma série de plantas medicinais e fitoterápicos apresenta potencial *in vitro* extraordinário, mas demonstra pouca ou nenhuma ação *in vivo*. Além disso, algumas substâncias consideradas essenciais à formulação acabam muitas vezes não sendo utilizadas simplesmente por apresentar-se incompatível juntamente com os demais componentes da formulação ou até mesmo por apresentar propriedades indesejáveis (AJAZUDDIN, 2010; MAINARDES et al., 2006).

Diversas estratégias tecnológicas vêm derrubando essa barreira, pois são capazes de compartimentalizar de maneira eficiente, diversos grupos de ativos ou até mesmo alterar suas propriedades e comportamento em meio biológico, permitindo dessa forma, a veiculação de tais substâncias. As recentes descobertas da tecnologia com o intuito de aprimorar as propriedades dos ativos tem produzido uma mudança revolucionária na maneira como os medicamentos vêm sendo administrados. Os novos sistemas de liberação de fármacos têm a capacidade não só de aumentar a eficácia de diversas substâncias, mas também reintroduzir outros ativos ou componentes que antes eram descartados por apresentar tais incompatibilidades. Além disso, o aprimoramento de novas substâncias, antes que sejam efetivamente lançadas no mercado ou utilizadas terapêuticamente, o aumento da seletividade e eficácia dos ativos, a proteção contra degradação térmica ou fotodegradação, a redução dos efeitos colaterais indesejados e o controle da liberação do ativo tornam esse método nanotecnológico ainda mais atrativo (GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009; CHORILLI, 2007; MAINARDES et al., 2006).

Juntamente com os avanços relacionados à vetorização de fármacos, durante as últimas décadas, surgiu a necessidade urgente da nanociência e nanotecnologia com a utilização de materiais em escala nanométrica, os quais eram aplicados em sua grande maioria apenas na área cosmética até pouco tempo atrás. Os avanços nanocientíficos têm a capacidade de revolucionar e garantir respostas a uma série de desafios que surgem no preparo de uma formulação (BAILEY e BERKLAND, 2009). Além de melhorar a solubilidade e estabilidade dos ativos, proporcionar ação prolongada e possibilitar a veiculação de substâncias ativas com diferentes graus de hidrofilia/lipofilia na mesma formulação, outro ponto a ser destacado é a vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos específicos. Nesse contexto, a incorporação da nanotecnologia no aprimoramento de plantas medicinais e fitoterápicos vem ganhando espaço significativo na literatura e comunidade científica (CHEN et al., 2009; PESTANA et al., 2008; CUNHA-JÚNIOR et al., 2003; SINTOV e SHAPIRO, 2004).

A indústria farmacêutica, em particular, tem se interessado cada vez mais pelos avanços nanotecnológicos, principalmente quando se diz respeito às vantagens relacionadas aos novos sistemas de liberação modificada bem como na possibilidade de desenvolvimento de novas formulações até então impossíveis (LEE et al., 2010).

O uso da nanotecnologia na encapsulação de extratos medicinais tem aberto caminho para uma melhor atividade e sustentado a liberação de nanopartículas. Desde então, a estratégia de aplicação da nanotecnologia em extratos vegetais, em especial, vem sendo bastante citada na literatura uma vez que os sistemas nanoestruturados demonstram ser capazes de potencializar a ação de extratos de plantas, reduzindo a dose necessária e os efeitos colaterais, e melhorando sua atividade biológica (GHOSH et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2013).

Bonifácio et al. (2014) e Kesarwani e Gupta (2013) publicaram um artigo de revisão no qual mencionam uma série de trabalhos empregando sistemas nanoestruturados para otimizar as propriedades de extratos vegetais. Bhattacharya e Ghosh (2009) utilizaram sistemas baseados em lipídios para incorporação de extrato de chá verde e ginseng, com o objetivo de aumentar a absorção dos componentes do extrato. Su et al. (2008) desenvolveram nanopartículas contendo extrato da raiz de *Radix salvia* e observaram significativa melhora da biodisponibilidade do extrato. Sinico et al. (2005) desenvolveram lipossomas contendo óleo essencial de *Artemisia arborescens* e notaram que estes sistemas propiciaram aumento da penetração dos componentes ativos desta planta na barreira citoplasmática viral. Rajendran et al. (2013) obtiveram nanopartículas contendo de extrato metanólico de *Ocimum sanctum* e observaram melhor ação antimicrobiana para o extrato encapsulado do que na forma livre quando testado contra *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*.

A efetividade de qualquer espécie de planta medicinal ou fitoterápico é dependente do fornecimento de quantidades suficientes dos compostos ativos. Para isso, os novos carreadores devem entregar o ativo em uma concentração suficiente durante todo o período de tratamento, bem como direcioná-lo para o sítio de ação desejado, requisitos não completamente atendidos pelas formas convencionais de tratamento. Perda parcial ou total de uma atividade específica pode ser observada quando o extrato recebe tratamentos do tipo isolamento ou purificação dos constituintes. Além disso, alguns componentes são altamente sensíveis ao pH ácido do estômago, promovendo sua destruição e posterior perda do efeito desejado. Alguns extratos não são utilizados clinicamente justamente pelo fato de apresentarem perda da atividade terapêutica, simplesmente por apresentarem empecilhos como estes (AJAZUDDIN, 2010).

O uso de diferentes sistemas de liberação de fármacos baseados na nanotecnologia representa uma interessante opção para aprimorar as propriedades mais desejadas (KESARWANI e GUPTA, 2013; SANTOS et al., 2013). Além disso, o tamanho nano das partículas presentes nos novos sistemas apresentam um futuro promissor na garantia da atividade e superação dos problemas associados ao uso de plantas medicinais (AJAZUDDIN, 2010).

1.7.1. Microemulsão (ME)

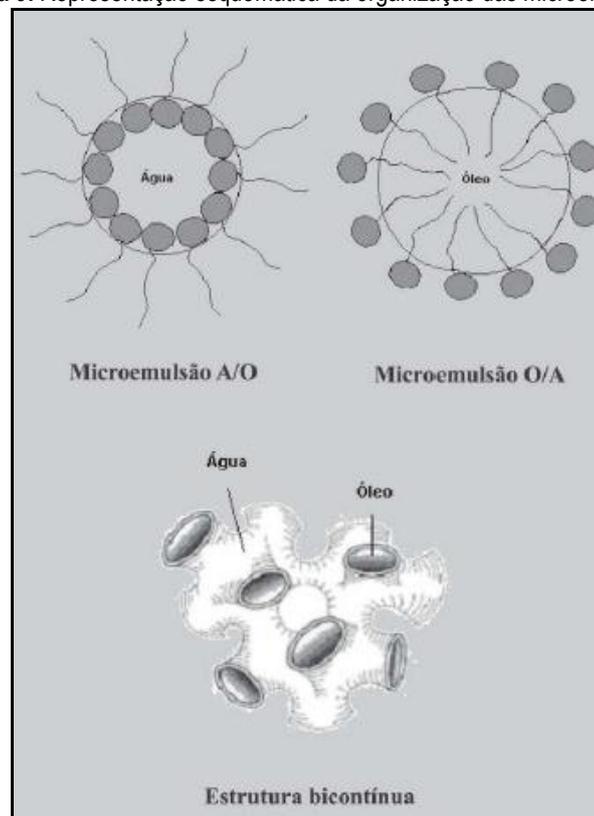
A fim de definir um sistema fluido e semitransparente obtido pela titulação até o ponto de clarificação de uma emulsão simples com um álcool de cadeia média, como o hexanol ou o pentanol, Hoar e Schulman, em 1943, introduziram pela primeira vez o termo microemulsão (ME).

Através da microscopia eletrônica, os pesquisadores observaram que essas dispersões transparentes eram formadas de microgotículas de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), circundadas por um filme interfacial misto de tensoativo e co-tensoativo (álcool) (Figura 9). O aspecto

transparente da ME foi explicado pelo tamanho das gotículas, que variava de 100 a 600 nm, significativamente menores que o da emulsão simples inicial (LAWRENCE e REES, 2012).

Dentre os sistemas nanoestruturados, as ME estão sendo amplamente utilizadas. As microemulsões podem ser definidas como emulsões transparentes, nas quais um óleo é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável e apresentando gotículas da fase interna na ordem de nanômetros (nm). As substâncias ativas podem ser veiculadas nas microemulsões quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (OLIVEIRA e SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2002; FORMARIZ et al., 2008).

Figura 9. Representação esquemática da organização das microemulsões.

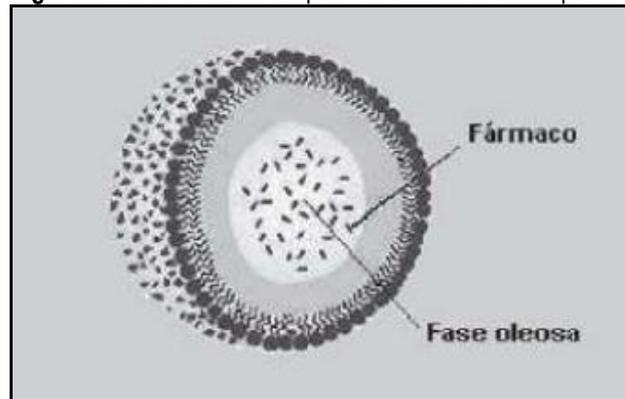


Fonte: Raman, 2003.

As MEs são consideradas sistemas reservatórios, uma vez que o fármaco se encontra separado do meio de dissolução através de uma membrana ou interface, Figura 10, a qual deve ser transposta para que haja sua liberação para o meio. Estes sistemas proporcionam um ambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, capazes de ligar ou associar moléculas de diferentes grupos de fármacos, com o objetivo de solubilizar, modular estabilidade ou melhorar o perfil de biodisponibilidade (OLIVEIRA e SCARPA, 2001; FORMARIZ et al., 2010).

Na década de 1980, Maranhão et al. (1986) introduziram o termo ME lipídica, a fim de definir um sistema microemulsionado rico em colesterol obtido pela técnica de sonicação até o ponto de clarificação de uma ME comum. Além de apresentarem colesterol em sua formulação, tais sistemas possuem a capacidade de se direcionarem para o interior das células, minimizando dessa maneira, os efeitos tóxicos apresentados pela maioria dos fármacos convencionais.

Figura 10. Microemulsão do tipo O/A com fármaco incorporado.



Fonte: Oliveira, 2004.

Outro ponto a ser destacado é a capacidade dos sistemas nanoestruturados melhorarem a solubilidade e estabilidade dos fármacos, além de proporcionarem ação prolongada, vetorização diferenciada para determinados tecidos ou órgãos do organismo e poderem veicular substâncias ativas com diferentes graus de hidrofília/lipofília na mesma formulação (CUNHA-JÚNIOR et al., 2003; SINTOV e SHAPIRO, 2004; PESTANA et al., 2008).

A presença de tensoativos aumenta a permeabilidade da membrana celular, o que facilita a absorção do fármaco e possibilita maior biodisponibilidade. Estes sistemas espontaneamente formados possuem propriedades físico-químicas específicas como transparência e estabilidade termodinâmica, fatores que os tornam atrativos do ponto de vista da produção farmacêutica com o desenvolvimento de uma alternativa terapêutica eficaz, com doses menores e efeitos colaterais reduzidos (SINTOV e SHAPIRO, 2004; FORMARIZ et al., 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Como parte de um projeto temático, contribuir com a avaliação do potencial farmacobiológico do Bioma-Cerrado.

2.2. Específicos

- ✓ Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroetanólicos do caule e folhas de *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva* frente aos micro-organismos *E. coli*, *S. aureus*, *S. setubal*, *C. albicans*, com destaque ao *H. pylori*;
- ✓ Incorporar os extratos vegetais em sistemas nanoestruturados;
- ✓ Testar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos vegetais incorporados no sistema nanoestruturado;
- ✓ Avaliar a estabilidade do sistema desenvolvido após o período de três meses;
- ✓ Determinar o índice de citotoxicidade (IC₅₀) e de seletividade (IS) dos extratos incorporados ou não no sistema nanoestruturado, utilizando células epiteliais VERO;
- ✓ Avaliar a atividade do extrato que apresentar melhor atividade e seletividade frente a um modelo experimental *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

- 17- β estradiol - Sigma Aldrich®
- ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico (MOPS) - Sigma-Aldrich®
- agar Müeller-Hinton (AMH) - Difco®
- agar Sabouraud Dextrose (ASD) - Difco®
- agar Müeller Hinton + 5% de sangue de carneiro (AS) - Biomérieux®
- amoxicilina - União Química®
- ampicilina - Sigma-Aldrich®
- anfotericina B - Sigma-Aldrich®
- caldo Müeller-Hinton (CMH) - Difco®
- caldo Sabouraud Dextrose (CSD) - Difco®
- ciclofosfamida (CPA) - Sigma®
- cloranfenicol - Sigma®
- cloreto de sódio - J.T.Baker®
- cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) - Sigma®
- colesterol 94% - Sigma®
- dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma Aldrich®
- fosfatidilcolina de soja (FS) - Epikuron®
- fosfato de sódio dibásico - J.T.Baker®
- fosfato de sódio monobásico - Reagen®
- fluconazol - Sigma-Aldrich®
- gentamicina - Sigma-Aldrich®
- glicerol - Sigma-Aldrich®
- glicose - Reagen®
- hidróxido de sódio - Atena®
- leitor de microplacas SpectraFluor Plus - TECAN®
- meio RPMI-1640 - Sigma-Aldrich®
- meio DMEM - Vitrocell®
- polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58®) - Sigma®
- resazurina - Sigma-Aldrich®
- soro fetal bovino (SFB) - Vitrocell®

- tripsina/EDTA - Vitrocell®

3.2. Equipamentos

- autoclave vertical - Phoenix®
- balança analítica - Shimadzu®
- banho-maria 100 - Fanem®
- bomba de vácuo - Millipore®
- câmara de fluxo laminar - Veco®
- câmara de Neubauer - Boeco® Germany
- centrífuga Excelsa 206BL - Fanem®
- espectrofotômetro de microplacas Epoch - Biotek®
- estufa incubadora com atmosfera de CO₂ (3110 Forma Series II water Jacketed CO₂ Incubator) - Thermo Electron Corporation®
- estufa de incubação bacteriológica - Fanem®
- estufa de incubação bacteriológica com CO₂ - Forma Scientific®
- microscópio invertido TS100 - Nikon Eclipse®
- microscópio ótico comum - Olympus CH20®
- peagômetro - Marconi®
- purificador de água destilada - Millipore®
- purificador de água mili-Q - Millipore®
- sonicador de haste Q700 - QSonica®
- ultrassom - Thornton®
- vortex mixer SA8 - Stuart®
- Zetasizer Nano NS - Malvern Instruments®

3.3. Extratos vegetais

3.3.1. Obtenção e procedência

Os extratos hidroetanólicos utilizados foram obtidos pelo doutorando Leonardo Perez de Souza, do projeto BIOTA-FAPESP e cedidos pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Campus Experimental do Litoral Paulista - UNESP - São Vicente.

As folhas e caules de *A. fraxinifolium* foram coletados em dezembro de 2007 no município de Porto Nacional (TO) pelo Prof. Dr. Cristiano B. Pereira. Exsiccatas foram depositadas no Herbário da

Universidade de Tocantins em Palmas (TO) sendo identificadas pelo Prof. Dr. Eduardo R. dos Santos, obtendo o número de registro 333.

As folhas e caules de *A. graveolens* foram coletados em outubro de 2007 em viagens de campo no Bosque dos Jequitibás no município de Campinas (SP) pela pós-graduanda Eliana Ramos do Instituto Agronômico de Campinas (Campinas). Exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas, sendo identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro do Instituto de Biologia (UNICAMP) obtendo o número de registro 148133.

As folhas e caules de *A. urundeuva* foram coletados em novembro de 2007 em viagens de campo nos municípios paulistas de Bálsamo e Votuporanga pelo pós-graduando Leonardo Perez de Souza. Exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas sendo identificadas pelo Prof. Dr. Jorge Tamashiro obtendo o número de registro 1446.

Os extratos foram obtidos pelo método de extração exaustiva de percolação simples segundo a Farmacopeia Brasileira (2010). O processo teve início com o intumescimento prévio de uma quantidade do pó com etanol 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolado. Após esse período, o percolado foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%). O empacotamento foi feito de uma forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção de 5:1 (cada 5 referente ao percolador, 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolado ficou em 1,0 a 2,0 mL/min/Kg de droga vegetal comum tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm.

Após a extração, os percolados foram rotaevaporados sob pressão reduzida, em temperatura 50 °C. Os extratos foram transferidos para vidros tarados e deixados em capela até completa eliminação do solvente. Quando necessário, os extratos foram liofilizados para completa remoção da água.

3.3.2. Preparo das soluções dos extratos

Os extratos foram diluídos na concentração de 2000 µg/mL em dimetilsulfóxido - DMSO (20%) e caldo Müeller Hinton - CMH (80%), como solução-estoque até o início dos experimentos.

3.3.3. Espectro de absorção

Os extratos vegetais adequadamente dissolvidos foram submetidos à leitura em espectrofotômetro (absorvância - Abs) num intervalo de leitura de 400 a 700 nm, para a determinação do comprimento de onda de absorção dos mesmos.

A partir dessas análises, foi possível avaliar o comprimento de onda máximo de absorção dos extratos vegetais e verificar a possível interferência da coloração nas leituras de absorbância para determinar o comprimento de onda na determinação dos CIMs dos extratos.

3.4. Cepas microbianas

Foram utilizadas as cepas padrão: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. setubal* ATCC 19196, *H. pylori* ATCC 43504 e *C. albicans* ATCC 18804.

3.4.1. Estocagem e manutenção

As cepas bacterianas, com exceção do *H. pylori*, foram mantidas em CMH acrescido de 20% de glicerol e mantido a -20 °C. Para uso, as cepas foram repicadas em CMH (2 mL), incubados por 24 horas a 37 °C.

A cepa de *H. pylori* foi mantida em CMH contendo 50% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20 °C. Para o uso, o *H. pylori* foi repicado em CMH acrescido de 50% de SFB e incubado a 37 °C, por 72 horas em 10% de CO₂ e umidade.

A levedura foi mantida em caldo Sabouraud Dextrose (CSD) acrescido de 20% de glicerol e mantida a -20 °C. Para o uso, foi repicada em 2 mL de CSD e incubada a 37 °C por 48 horas.

3.5. Avaliação da atividade antibacteriana

3.5.1. Padronização da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, para as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, adicionando-se PBS pH=7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006a).

Para *H. pylori*, a suspensão foi padronizada a partir de uma cultura em AS de 72 horas com 10% de CO₂, adicionando-se CMH acrescido de 50% de SFB até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala McFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 570 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH acrescido de 50% de SFB, obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006b).

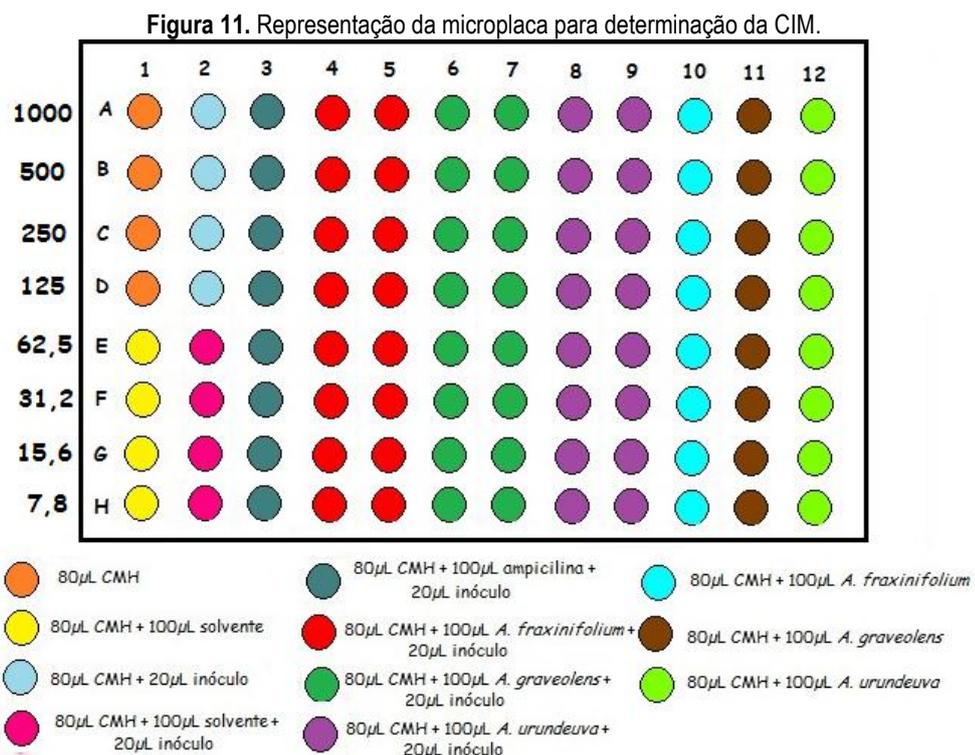
3.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.5.2.1. Realização do teste

A técnica de diluição em microplacas (96 poços) foi utilizada para a determinação da CIM, seguindo-se a norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006a) para as bactérias aeróbicas e adaptado para as fastidiosas, seguindo suplemento M100-S16 do CLSI (2006b).

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH para *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, e 80 µL de CMH acrescido de 50% de SFB para *H. pylori*. Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções dos extratos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a amoxicilina (100 µg/mL) para *H. pylori* e a ampicilina (50 µg/mL) para as demais bactérias. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extratos vegetais e o controle negativo (solventes).

Procedeu-se a incubação das microplacas a 37 °C durante 24 horas para *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, e a 37 °C por 72 horas sob condição de microaerofilia para *H. pylori*. Em cada microplaca foram testados três extratos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicata. A Figura 11 mostra esquematicamente a organização dos testes nas microplacas.



Fonte: Autora

3.5.2.2. Leitura espectrofotométrica

Após a incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas, obtendo-se valores a partir dos quais foram construídos gráficos que expressam a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com Gudiña et al. (2010).

A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada determinada a CIM a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008; HAWSER e ISLAM, 1999).

3.5.2.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

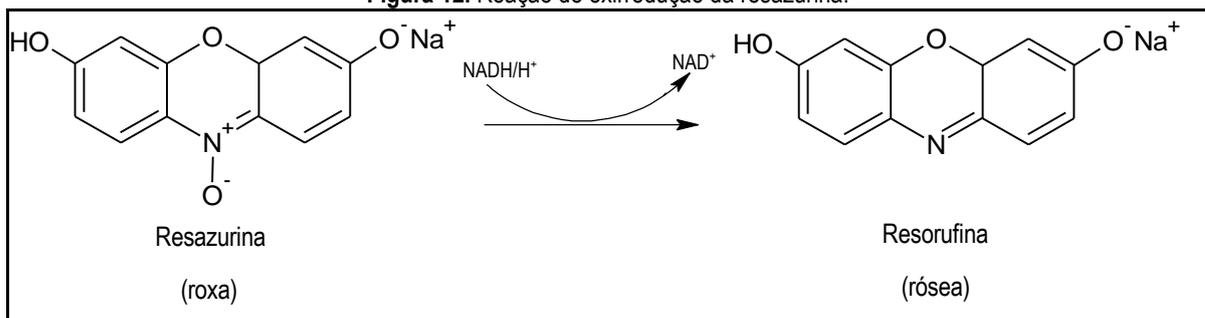
Após a leitura espectrofotométrica, foram realizadas as determinações da CBM. Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de AS para *H. pylori* e agar Müeller-Hinton (AMH) para as demais bactérias. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, e a 37 °C por 72 horas sob condição de microaerofilia para *H. pylori*. Após incubação as placas foram analisadas para o crescimento ou não das bactérias.

3.5.2.4. Leitura com revelador

Foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100 µg/mL) do qual 30 µL foi adicionado em cada orifício das microplacas nos testes com bactérias. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea) (Figura 12). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Figura 12. Reação de oxirredução da resazurina.



Fonte: Autora

3.6. Avaliação da atividade antifúngica

3.6.1. Padronização da suspensão fúngica

A suspensão fúngica foi padronizada a partir de uma cultura de 48 horas, em CSD, adicionando-se PBS pH=7,2 estéril até turvação correspondente a 5×10^6 UFC/mL (escala 0,5 de McFarland). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica a 530 nm para confirmação da concentração das leveduras. Posteriormente, a suspensão fúngica foi diluída 1:100, seguida de outra diluição 1:20 em PBS, obtendo-se uma suspensão de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, para utilização nos ensaios (CLSI, 2008).

3.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.6.2.1. Realização do teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com as metodologias descritas segundo a norma M27-A3 do CLSI (2008) e Duarte et al. (2005), com modificações. Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 μ L de RPMI-1640 (tamponado com MOP's). Em seguida foram acrescentados 100 μ L das soluções dos extratos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 μ g/mL. Adicionalmente, foram distribuídos 100 μ L da suspensão de levedura em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a anfotericina B (32 μ g/mL) e o fluconazol (256 μ g/mL). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extratos vegetais e o controle negativo (solventes). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas. Em cada microplaca foram testados três extratos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicatas.

3.6.2.2. Leitura espectrofotométrica

Após a incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorvância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas, obtendo-se valores dos quais foram construídos gráficos que expressam a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com Gudiña et al. (2010).

3.6.2.3. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a leitura espectrofotométrica, foram realizadas as determinações da CFM. Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de ASD. As

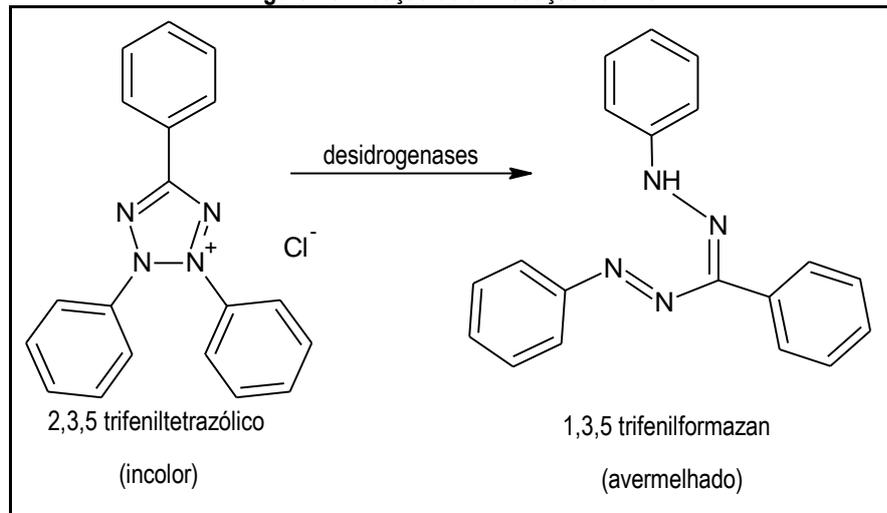
placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e após incubação as placas foram observadas pelo crescimento ou não das leveduras.

3.6.2.4. Leitura com revelador

Foram realizadas leituras com o revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 2 %, do qual 20 µL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano coram de vermelho (DUARTE et al., 2005)

O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos, principalmente viabilidade celular. O mecanismo baseia-se na redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada) (Figura 13), em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

Figura 13. Reação de oxirredução do TTC.



Fonte: Autora

3.7. Cálculo da viabilidade microbiana

A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a viabilidade microbiana para cada micro-organismo, que foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias testadas (extratos livres e incorporados), para cada micro-organismo de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1 - (A_c/A_0)] \times 100$$

onde: A_c representa a média das absorvâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorvância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo e A_0 a média das absorvâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010). O resultado final representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir.

3.8. Desenvolvimento do sistema nanoestruturado

Para o desenvolvimento do sistema nanoestruturado foi utilizada metodologia baseada no trabalho de Formariz (2010), com adaptações. Os experimentos de formulação da ME lípidica e incorporação dos extratos de *Astronium* sp foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marlus Chorilli (Departamento de Fármacos e Medicamentos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

3.8.1. Composição da Formulação

A ME lípidica é composta de:

- colesterol (fase oleosa) – 10%
- tampão fosfato pH=7,4 – 80%
- sistema tensoativo – 10%, sendo deste, 66,7% de polioxietileno 20-cetil éter (Brij 58®) e 33,3% de fosfatidilcolina de soja (FS - Epikuron® 200).

3.8.2. Preparo do sistema tensoativo

Cerca de 66,7% de Brij 58® foi adicionado no gral e macerado; em seguida, acrescentou-se 33,3% de FS misturando-se adequadamente para garantir uma completa homogeneização. A mistura obtida foi armazenada sob refrigeração.

3.8.3. Preparo da formulação

A formulação foi preparada da seguinte forma: em um frasco transparente foram transferidas quantidades de colesterol, que funcionou como fase oleosa (FO), e de Brij 58® e FS como sistema tensoativo (T), na proporção de 2:1. Foi construído um diagrama de fases, fixando-se a proporção de tensoativo e fase oleosa, e procedendo a titulação com a fase aquosa - FA (tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹

pH=7,4). A mistura foi sonicada usando sonicador de haste (Q700 da QSonica®) (Figura 14) utilizando as seguintes condições: potência de 700 watts, amplitude de 15%, modo descontínuo, por 10 minutos com intervalo de 30 segundos a cada dois minutos, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação. Após sonicação, as MEs foram centrifugadas a 11.180 (x g) por 15 minutos, para eliminar os resíduos de titânio liberados pela haste do sonicador. Todas as regiões dos sistemas foram classificadas visualmente como sistemas viscosos ou líquidos opticamente transparentes, translúcidos ou opacos, viscosos semitransparentes ou ainda separação de fases. Desse modo, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases. A partir desses dados, foram selecionadas as regiões dos sistemas para a incorporação das frações do extrato.

Figura 14. Esquema e fotos do preparo da formulação.



Fonte: Autora

3.8.4. Incorporação dos extratos na microemulsão lipídica

Após obter a ME, incorporou-se os extratos de *Astronium* sp através do seguinte procedimento experimental: em um frasco adequado, adicionou-se 0,004 g do extrato em 2 mL da ME lipídica e homogeneizou-se a mistura sonicando por 3 minutos, amplitude de 15% em modo descontínuo, com banho de gelo, para que houvesse a incorporação do material na ME lipídica na concentração de 2000 µg/mL.

3.9. Desenvolvimento dos sistemas

3.9.1. Caracterização estrutural dos sistemas

3.9.1.1. Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)

A determinação do diâmetro das gotículas foi realizada pela técnica de correlação de fótons, usando equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser – *Light Scattering* (Zetasizer Nano NS – Malvern Instruments®). Este é particularmente sensível para determinar pequenas mudanças no

diâmetro médio, tais como aquelas devido às camadas adsorvidas na superfície da partícula ou pequenas variações no processo de manufatura. Quando um feixe de luz passa através de uma dispersão coloidal, as partículas ou gotas espalham a luz em todas as direções. É possível, então, observar flutuações tempo-dependentes na intensidade do espalhamento através de um detector que processa os dados e envia a um computador. A partir dessa técnica, calculou-se o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Stokes-Einstein (equação 1):

$$D = KT/6\pi\eta Rh \quad (\text{equação 1})$$

sendo que: D: coeficiente de difusão das partículas; K: constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$); T: temperatura absoluta (293,15 K); π : 3,141592; η : viscosidade ($1,002 \times 10^{-3} \text{ NM}^{-2s}$); Rh: raio hidrodinâmico.

A ME foi analisada em um analisador de gotículas. As amostras foram colocadas na câmara de análise de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 20 °C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração de acordo com o índice observado para cada amostra analisada. Foram realizadas 10 determinações do diâmetro médio e índice de polidispersidade (IPD) das gotículas de cada amostra (n=3), com a duração total de 5 min. Após o período de três meses, as MEs foram novamente avaliadas quanto a sua estabilidade e dessa forma observar possíveis alterações no diâmetro das partículas.

3.10. Testes citológicos para determinação do Índice de Citotoxicidade e Seletividade

3.10.1. Citotoxicidade (IC₅₀)

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e a mestrandia Érica de Oliveira Lopes (Departamento de Ciências Biológicas) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Os ensaios para a determinação do IC₅₀ ou Viabilidade Celular foram realizados *in vitro* frente à linhagem VERO (ATCC CCL-81™). As células foram mantidas a 37 °C, com 5% de CO₂, em garrafas com superfície de 12,5 cm², contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L).

O ensaio de citotoxicidade foi realizado conforme padronizado por Pavan et al. (2010). A técnica consiste em coletar células utilizando uma solução de tripsina/EDTA, centrifugação (2000 rpm por 5 minutos) e contagem do número de células em câmara de Neubauer ajustando para $3,4 \times 10^5$ células/mL em meio DMEM. Desta suspensão, foram depositados 200 µL em cada orifício de uma

microplaca de 96 orifícios obtendo-se uma concentração celular de $6,8 \times 10^4$ células/poço. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ por 24 horas a fim de garantir a aderência celular à microplaca. Em seguida, foram preparadas diluições seriadas dos extratos a serem testados (1000 a 3,9 µg/mL), os quais foram adicionados às células após a retirada do meio, sendo novamente incubadas por 24 horas. A citotoxicidade dos extratos foi determinada pela adição de 30 µL do revelador resazurina e leitura após 6 horas de incubação. A leitura foi realizada no leitor de microplacas SpectraFluor Plus, utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente. O IC₅₀ foi definido como a maior concentração dos extratos capaz de permitir a viabilidade de pelo menos 50% das células.

3.10.2. Índice de seletividade (IS)

O IS é calculado pela divisão dos valores de IC₅₀ pelos valores de CIM. Um IS igual ou superior a 10 indica que os extratos em análise podem ser aplicados na concentração 10 ou mais vezes acima do valor de CIM sem apresentar citotoxicidade (ORME et al., 2001). Quanto maior o valor de IS, mais ativo contra o micro-organismo e menos citotóxico para o hospedeiro o extrato analisado é, sendo assim considerada uma amostra promissora (IS>10).

3.11. Ensaio *in vivo* para CVV

O ensaio de CVV foi realizado de acordo com a metodologia descrita em Araújo (2013), com modificações. Ratas Wistar fêmeas (n=5) com peso médio entre 150 - 200 g e 8 semanas de idade permaneceram durante todo o experimento no biotério do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara). As condições ambientais foram devidamente programadas de forma que a temperatura permanecesse adequada e com 12 horas de ciclo claro/escuro e, sem qualquer restrição de alimento e água (experimento aprovado com protocolo número 34/2013 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ciências Farmacêuticas).

O ensaio foi realizado com diferentes grupos, os quais foram tratados com: o creme vaginal antifúngico (controle positivo de ação antifúngica); DMSO 20% (controle do solvente do extrato não incorporado); o extrato solubilizado em DMSO (tratamento com o extrato não incorporado); ME base (controle da ME sem o extrato) e o extrato incorporado na ME (tratamento com o extrato incorporado). Além disso, foram utilizados animais como controle negativo e positivo de infecção, ou seja, não infectados e infectados e não tratados, respectivamente.

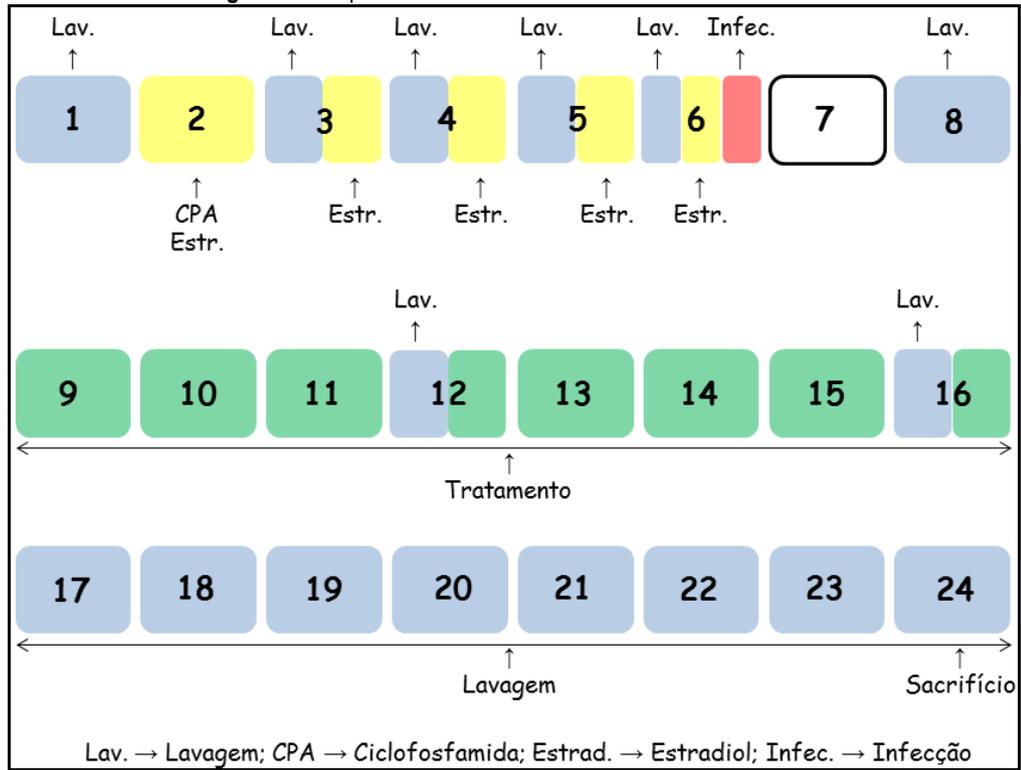
Inicialmente os animais foram imunossuprimidos com a administração intraperitoneal (0,3 mL na concentração de 50 mg/Kg de peso corpóreo – dose única) de ciclofosfamida (CPA). Em seguida,

MATERIAL E MÉTODOS

cada animal recebeu, por via subcutânea, a solução de estradiol (0,1 mL na concentração de 0,2 mg/animal). A administração de CPA foi realizada 1 vez ao dia durante o período necessário para que todos os animais atingissem o estado pseudo-estro (falso-cio), que foi avaliado através da lavagem vaginal com 0,1 mL de PBS estéril. O fluido a fresco foi observado microscopicamente (40x) para que os animais pudessem ser classificados quanto ao ciclo estral.

Após a confirmação da fase pseudo-estro em todos os animais, os mesmos foram infectados com *C. albicans* ATCC 18804, cuja cultura foi inicialmente cultivada em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e após 48 horas padronizada em PBS pH=7,2 estéril. Depois de confirmada a concentração de 5×10^7 UFC/mL, realizada através da contagem em câmara de Neubauer, os animais foram infectados através da administração intravaginal de 0,1 mL da suspensão padronizada. Depois de 2 dias, os animais foram submetidos à lavagem vaginal para monitoramento da infecção, no qual o fluido vaginal foi diluído, e posteriormente semeado em ASD + cloranfenicol. Após incubação a 37 °C durante 48 horas foi realizada a contagem do número de colônias e o sucesso da infecção foi considerado quando o animal apresentasse UFC/mL superior a 100.

O tratamento iniciou-se logo após a confirmação de que todos os animais estavam realmente infectados, e ocorreu da mesma forma para todos os grupos (2 x por dia, durante 8 dias consecutivos) onde 0,1 mL da amostra foi administrada por via intravaginal. A avaliação do tratamento foi realizada através da lavagem vaginal com 0,1 mL de PBS pH=7,2 estéril, e o fluido semeado em meio ASD + cloranfenicol (37 °C por 48 horas) para realização da contagem de colônias. Uma semana após o término do tratamento, os animais passaram por lavagem vaginal diária a fim de verificar a possível recidiva de infecção, sendo no último dia de experimento realizada a eutanásia dos animais.

Figura 15. Esquema do tratamento do ensaio anti-CVV *in vivo*.

Fonte: Autora

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da CIM dos extratos vegetais

A CIM dos extratos hidroetanólicos do caule e folhas de *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva* não incorporados no sistema nanoestruturado estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. CIM dos extratos hidroetanólicos de caule e folhas das espécies de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado através da revelação com resazurina (0,01%) e TTC (2%).

Extratos vegetais		CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
		Micro-organismos				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. setubal</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>
<i>A. fraxinifolium</i>						
AFC	não incorporado	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
	incorporado	> 1000	500	> 1000	> 1000	62,5
AFF	não incorporado	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
	incorporado	> 1000	1000	> 1000	> 1000	250
<i>A. graveolens</i>						
AGC	não incorporado	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
	incorporado	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	62,5
AGF	não incorporado	> 1000	250	> 1000	> 1000	> 1000
	incorporado	> 1000	250	> 1000	> 1000	125
<i>A. urundeuva</i>						
AUC	não incorporado	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
	incorporado	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	62,5
AUF	não incorporado	> 1000	125	> 1000	> 1000	125
	incorporado	> 1000	125	> 1000	> 1000	15,62
Ampicilina		6,25	0,15	2,5	-	-
Amoxicilina		-	-	-	1,56	-
Anfotericina B		-	-	-	-	0,06
Fluconazol		-	-	-	-	8

(-) não testado

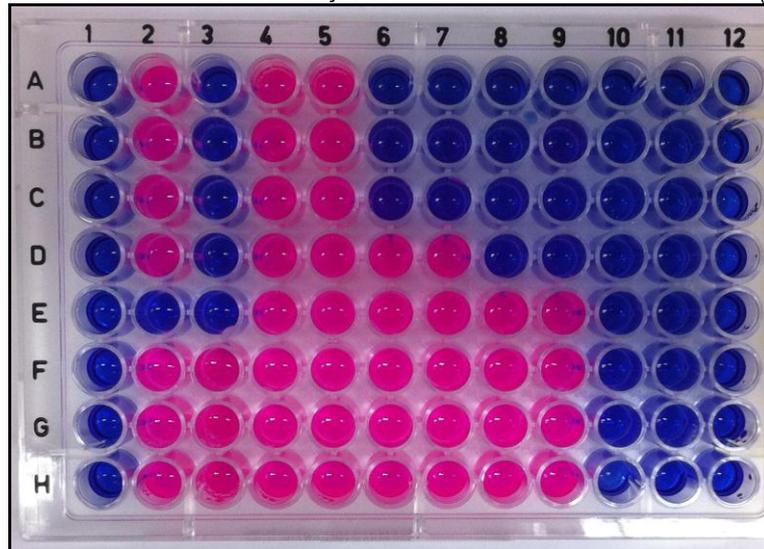
Os extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp estudados não apresentaram atividade contra *E. coli*, *S. setubal* e *H. pylori* nas concentrações testadas. De forma semelhante, os extratos de *A. fraxinifolium* (caule e folhas), e caule de *A. graveolens* e *A. urundeuva* não demonstraram atividade antimicrobiana. O extrato hidroetanólico das folhas de *A. urundeuva* apresentou atividade contra *S.*

RESULTADOS

aureus e *C. albicans* com CIM=125 µg/mL. O extrato hidroetanólico das folhas de *A. graveolens* foi ativo apenas para *S. aureus* (CIM=250 µg/mL). A ampicilina apresentou CIMs de: 6,25; 0,15 e 2,5 µg/mL para *E. coli*, *S. aureus* e *S. setubal*, respectivamente; amoxicilina com CIM de 1,56 µg/mL para *H. pylori*; anfotericina B de 0,06 µg/mL e fluconazol de 8 µg/mL para *C. albicans*.

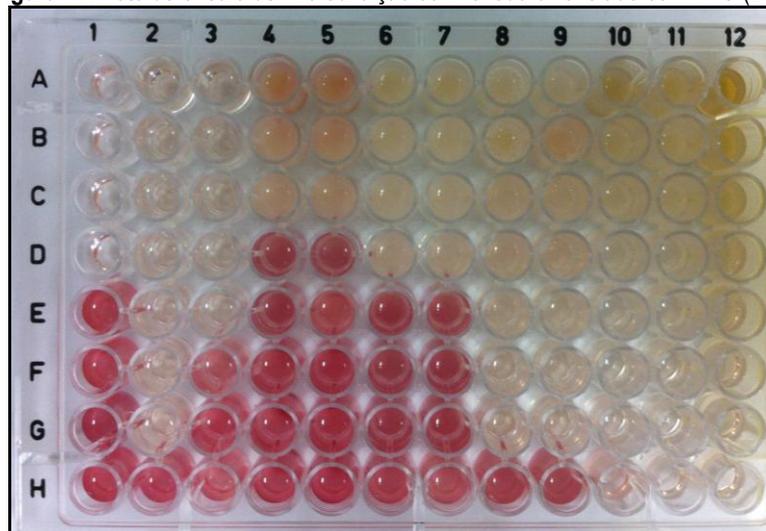
As Figuras 16 e 17 mostram representativamente um ensaio revelado com resazurina 0,01% e TTC 2% para as bactérias e levedura, respectivamente.

Figura 16. Foto do ensaio de microdiluição com bactérias revelado com resazurina (0,01%).



Fonte: Autora

Figura 17. Foto do ensaio de microdiluição com levedura revelado com TTC (2%).



Fonte: Autora

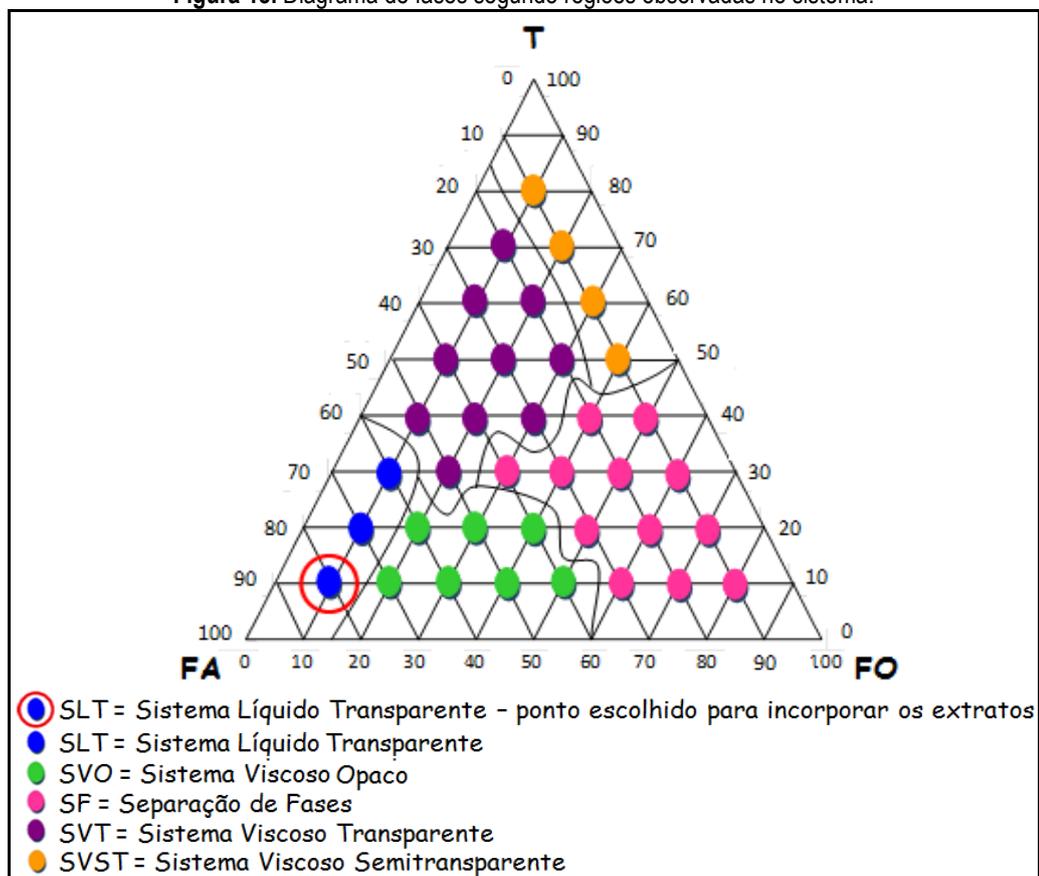
4.2. Incorporação dos extratos no sistema nanoestruturado

4.2.1. Desenvolvimento do sistema

O sistema foi desenvolvido utilizando os componentes: óleo (colesterol), água (tampão fosfato pH=7,4) e a mistura de tensoativo, em diferentes concentrações. Foram obtidos pontos com diferentes características estruturais de acordo com a variação do óleo e água.

O diagrama de fases (Figura 18) mostra as características de pontos com SLT, SVO, SF, SVT e SVST. Observaram-se regiões chamadas SLT (Sistema Líquido Transparente), onde há baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo (10-30%); SVO (Sistema Viscoso Opaco) encontrados na região inferior e central do diagrama com baixa concentração de óleo (20-50%) e tensoativo (10-20%); SF (Separação de Fases) em concentrações baixas de água (10-40%) e tensoativo (10-40%); SVT (Sistema Viscoso Transparente) com a concentração da fase oleosa entre 10 a 30% e de tensoativo entre 30 a 70%; e SVST (Sistema Viscoso Semitransparente) com baixa concentração de água (10%) e altas concentrações de tensoativo (50-80%).

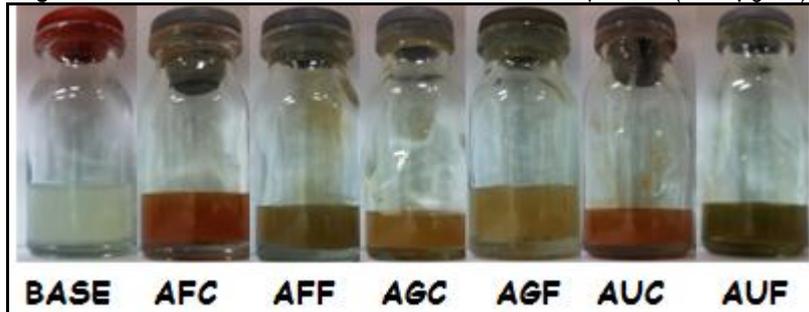
Figura 18. Diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema.



Fonte: Autora

O ponto escolhido para o estudo foi a formulação 1, (destacada com um círculo vermelho) que é composta por 10% de colesterol, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa. Por ter sido considerada a formulação mais líquida e transparente do diagrama de fases, ou seja, a mais adequada para o trabalho, essa formulação foi escolhida para a incorporação dos extratos vegetais. A Figura 19 apresenta o sistema nanoestruturado antes (base) e após a incorporação dos extratos vegetais.

Figura 19. Sistema nanoestruturado: base e extratos incorporados (2000 µg/mL).



Fonte: Autora

4.2.2. Caracterização estrutural do sistema

4.2.2.1. Análise do tamanho das gotículas (espalhamento de luz dinâmico)

A Tabela 2 apresenta os valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e o IPD para o sistema nanoestruturado (base) e para os extratos incorporados na ME. O IPD mede a homogeneidade entre a média dos tamanhos das partículas em relação ao desvio-padrão, onde quanto menor o IPD, maior a uniformidade apresentada pelas partículas (GOYAL et al., 2012). A fim de avaliar o grau de estabilidade desse sistema, a análise foi realizada logo após o preparo da microemulsão e incorporação dos extratos (tempo 0), bem como após o período de três meses (tempo 3).

Tabela 2. Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e IPD para a microemulsão (base) e para os extratos incorporados na microemulsão após o preparo (tempo 0) e três meses depois (tempo 3).

Formulação	Tamanho das Partículas (nm)		Índice de Polidispersidade	
	Tempo 0	Tempo 3	Tempo 0	Tempo 3
Base	117,2 ± 1,966	123,1 ± 0,8386	0,245 ± 0,006	0,243 ± 0,008
AFC	123,6 ± 0,2517	146,0 ± 0,3512	0,222 ± 0,003	0,204 ± 0,006
AFF	133,1 ± 0,5508	148,4 ± 1,210	0,276 ± 0,008	0,198 ± 0,007
AGC	126,7 ± 0,7024	152,4 ± 2,402	0,249 ± 0,007	0,211 ± 0,005
AGF	135,4 ± 0,5508	156,9 ± 3,350	0,237 ± 0,002	0,227 ± 0,004
AUC	141,9 ± 1,137	154,1 ± 0,6557	0,268 ± 0,000	0,232 ± 0,006
AUF	146,7 ± 1,825	184,5 ± 0,8888	0,255 ± 0,010	0,355 ± 0,003

No intervalo de três meses foi possível observar algumas mudanças entre os valores do tamanho das partículas e do IPD tanto na ME base quanto na ME contendo os extratos de *Astronium* sp. De uma maneira geral, após o período de três meses, as partículas do sistema desenvolvido sofreram um aumento em seu diâmetro que variou de 5,9 nm (ME base) a 37,8 nm (AUF).

4.3. Determinação da CIM dos extratos vegetais incorporados no sistema nanoestruturado

A CIM dos extratos hidroetanólicos do caule e folhas das espécies de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado estão apresentadas na Tabela 1. Após a incorporação no sistema nanoestruturado desenvolvido, os resultados demonstram que apenas alguns extratos de *Astronium* sp tiveram sua atividade potencializada. Os extratos testados contra *E. coli*, *S. setubal* e *H. pylori* não foram ativos contra estes micro-organismos mesmo após sua incorporação. Em relação ao *S. aureus* apenas os extratos hidroetanólico do caule (CIM=500 µg/mL) e das folhas (CIM=1000 µg/mL) da espécie *A. fraxinifolium* modificaram sua atividade após incorporação.

Ressaltamos os resultados obtidos com *C. albicans*, nos quais os extratos de caule e folha de todas as espécies de *Astronium* sp tiveram sua atividade potencializada. Os extratos do caule das três espécies, que antes da incorporação não haviam apresentado atividade (CIM>1000 µg/mL), passaram a apresentar CIMs de 62,5 µg/mL. Em relação aos extratos das folhas de *A. fraxinifolium* e *A. graveolens*, que também não haviam apresentado atividade (CIM>1000 µg/mL), passaram a apresentar CIMs de 250 e 125 µg/mL, respectivamente. Em relação ao extrato da folha de *A. urundeuva*, que já havia apresentado CIM de 125 µg/mL antes da incorporação, teve sua atividade potencializada ao apresentar CIM ainda menor, de 15,62 µg/mL.

As Figuras de 20 a 22 apresentam os resultados de inibição de crescimento microbiano nas concentrações de 1000 a 7,81 µg/mL frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. setubal*, *H. pylori* e *C. albicans*, que foram realizados através da leitura espectrofotométrica.

4.4. Determinação da CBM e CFM

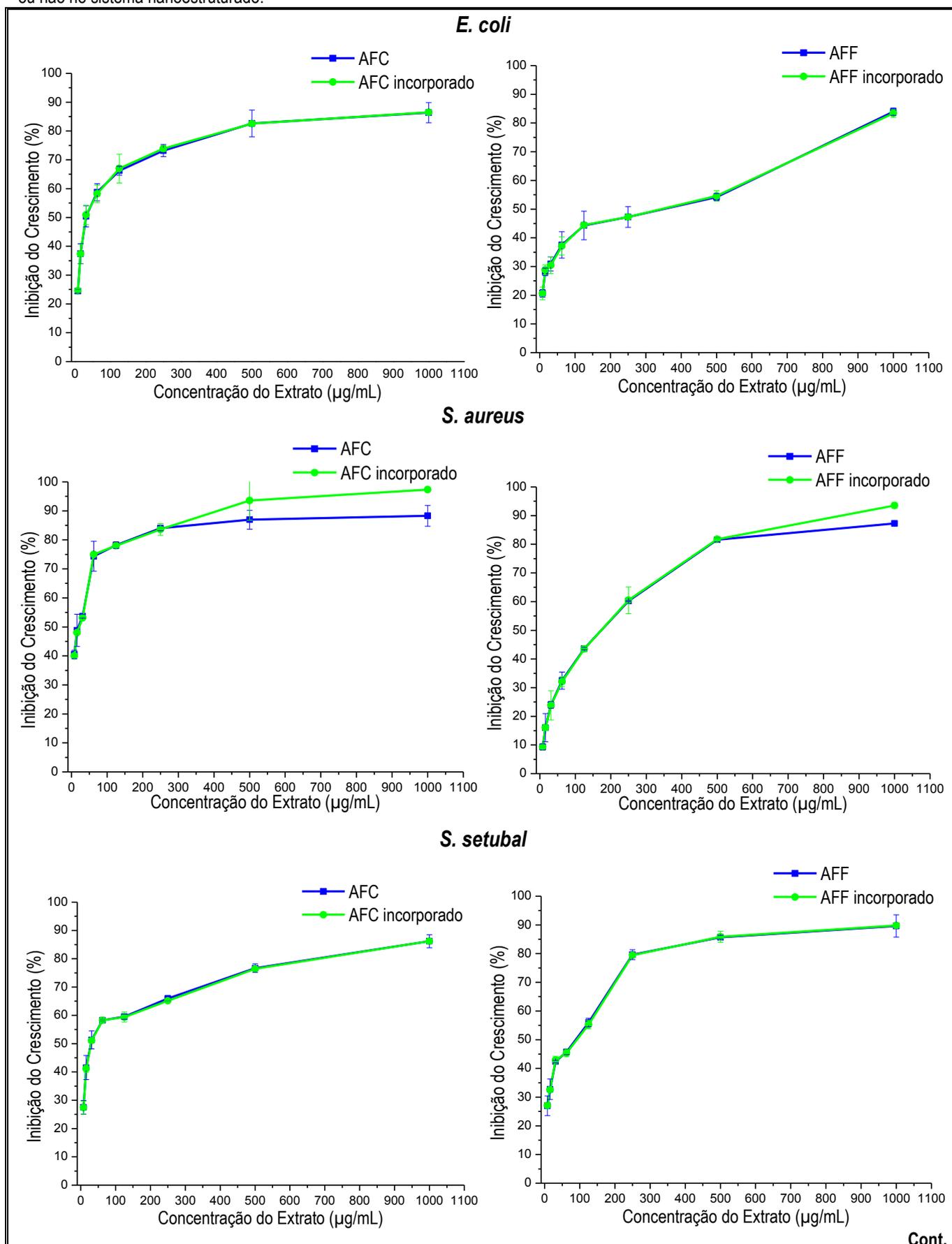
As CBM e CFM foram realizadas para os extratos que apresentaram atividade frente a pelo menos um dos micro-organismos. Os poços das microplacas que apresentaram ausência de crescimento e, portanto atividade do extrato foram plaqueadas e posteriormente analisadas pelo crescimento de micro-organismos. Em comparação ao CIM pode-se observar que os valores de CBM e

RESULTADOS

CFM encontrados coincidem com seus respectivos valores de CIM, mostrando dessa maneira que as amostras testadas apresentaram efeitos bactericida e fungicida.

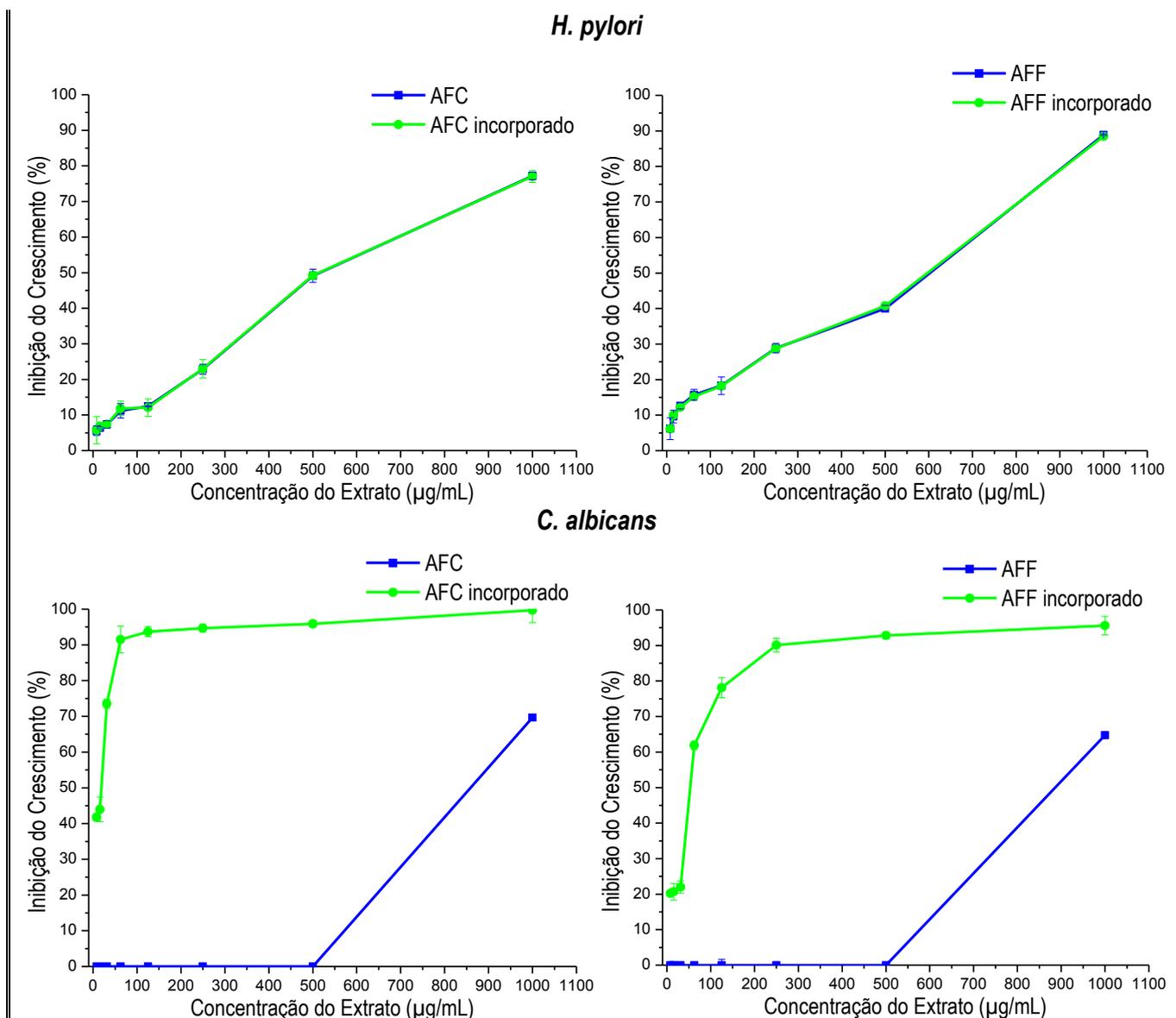
RESULTADOS

Figura 20. Inibição do crescimento dos micro-organismos pelo extrato hidroetanólico de caule e folha de *A. fraxinifolium* incorporados ou não no sistema nanoestruturado.



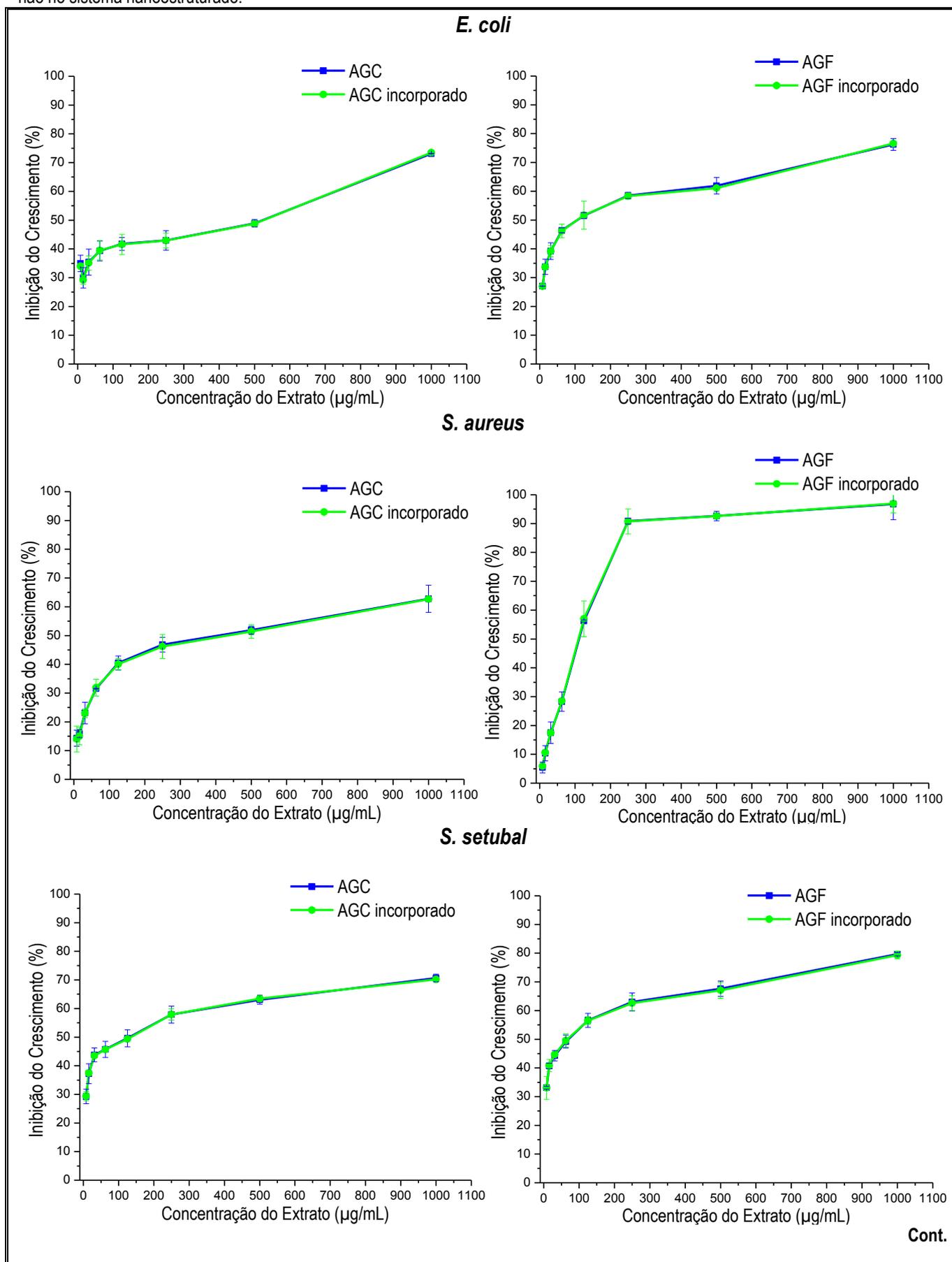
Cont.

RESULTADOS



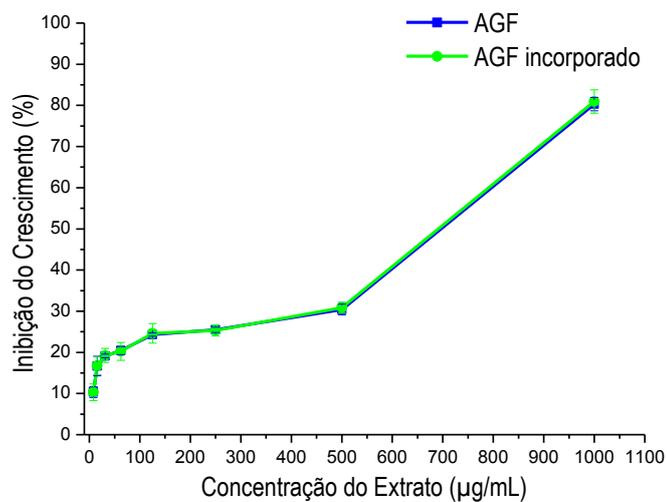
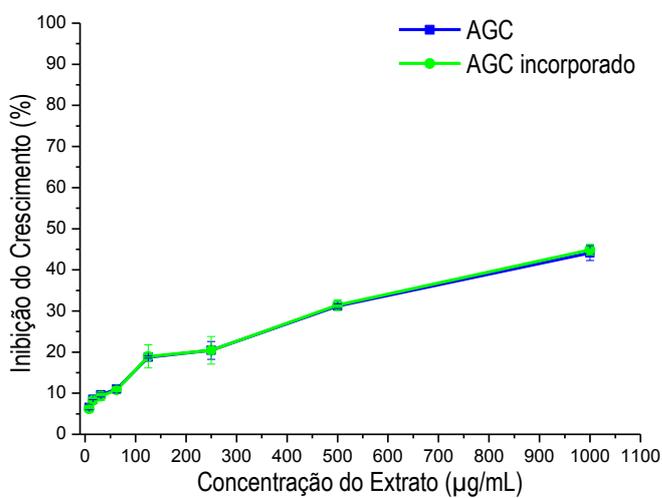
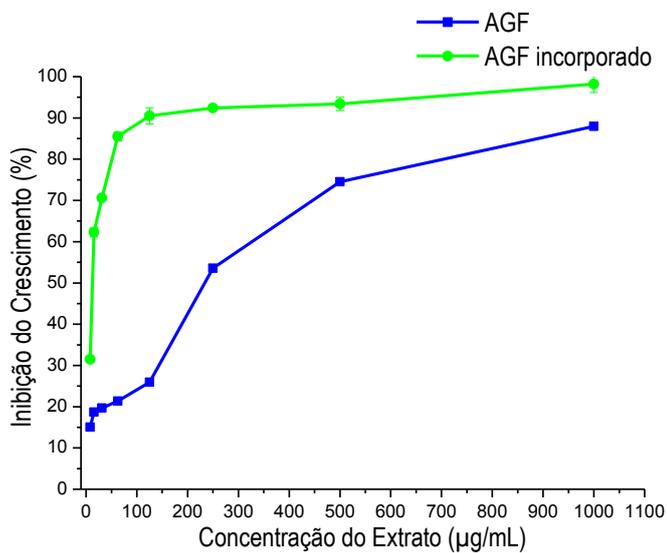
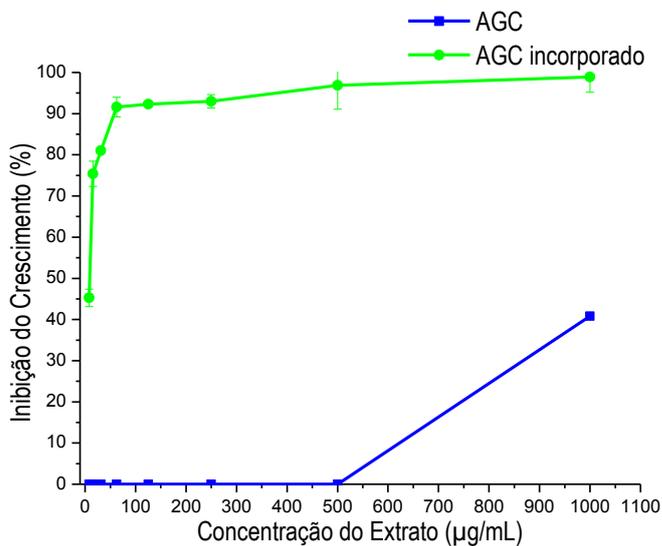
RESULTADOS

Figura 21. Inibição do crescimento dos micro-organismos pelo extrato hidroetanólico de caule e folha de *A. graveolens* incorporados ou não no sistema nanoestruturado.



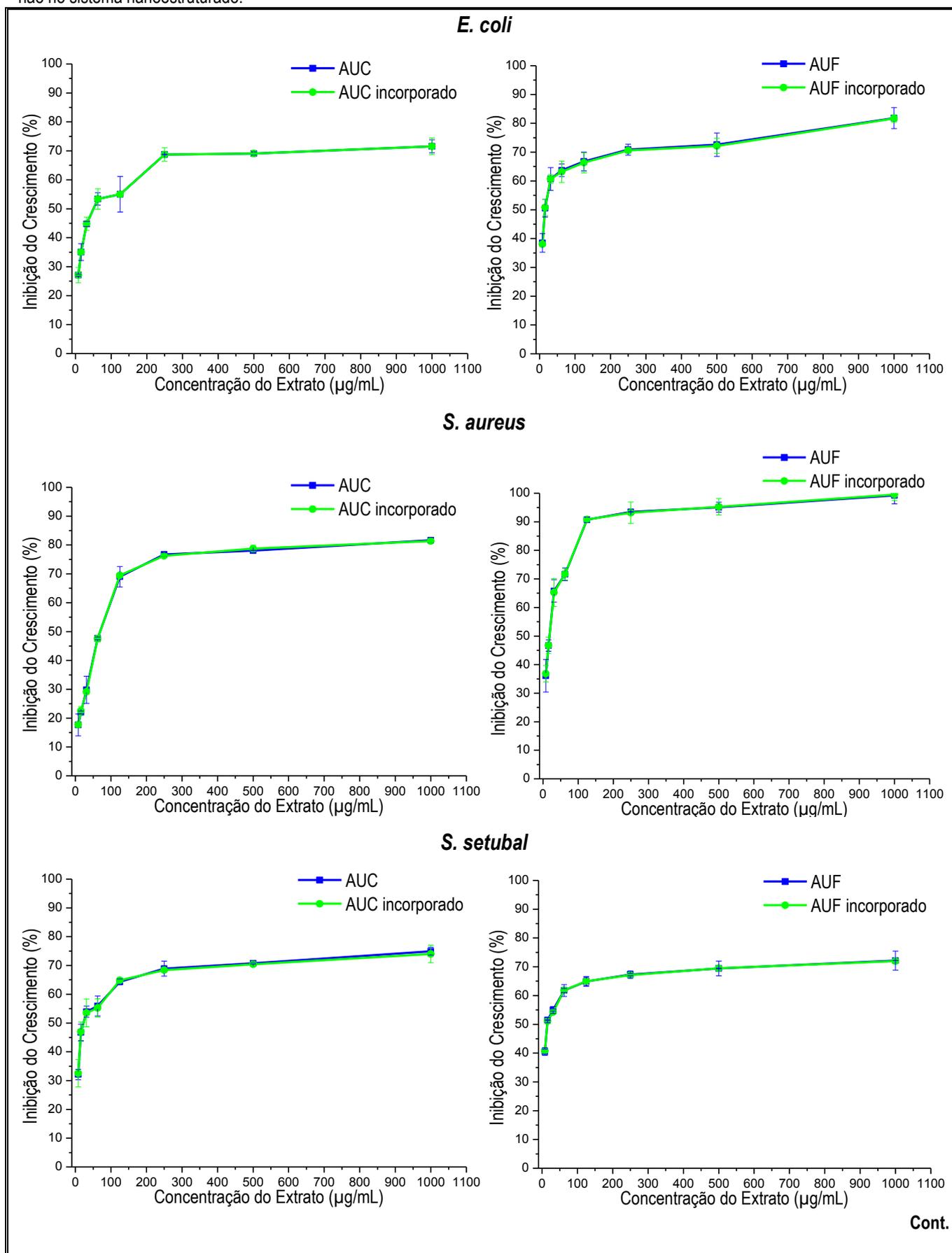
Cont.

RESULTADOS

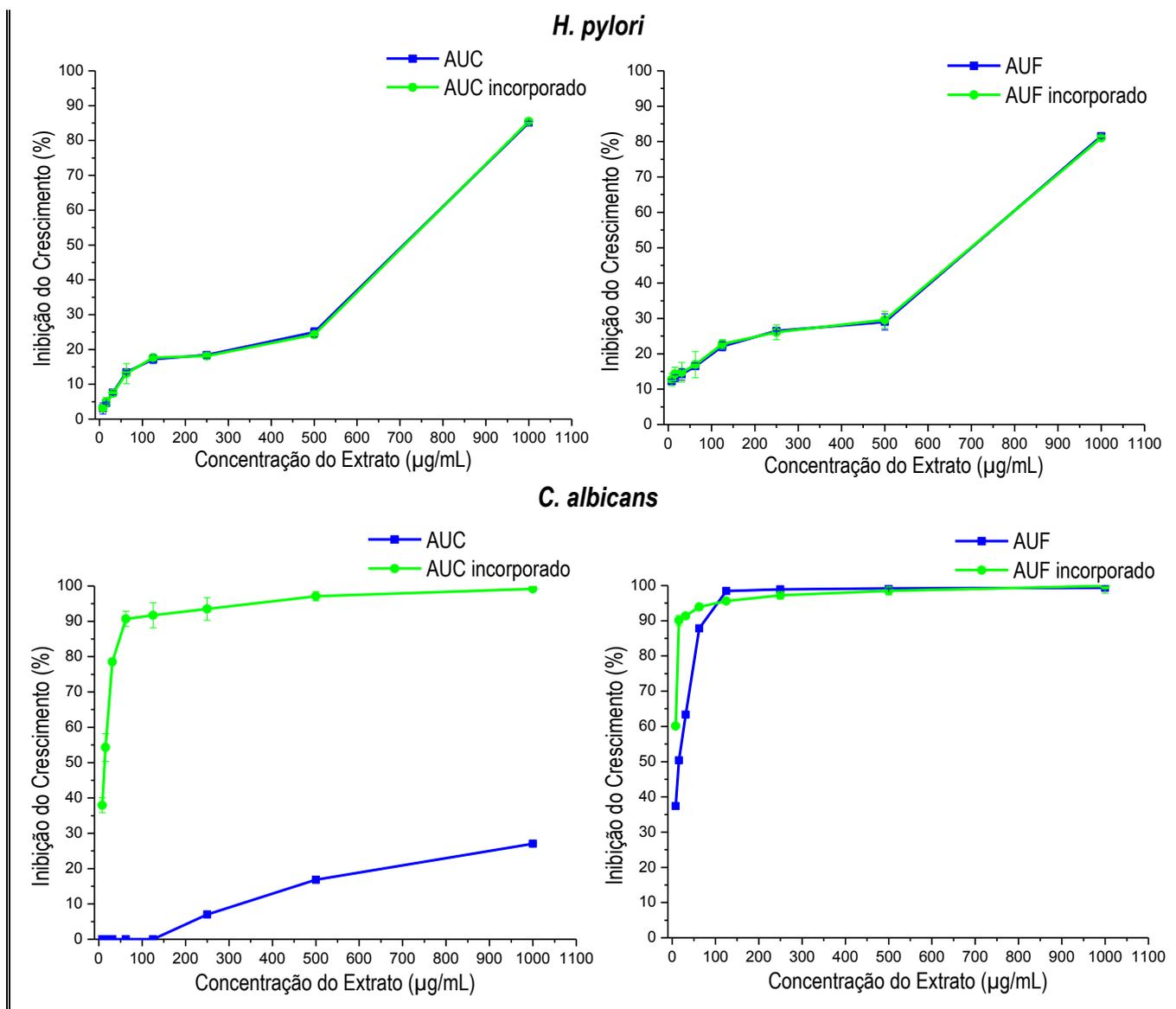
H. pylori*C. albicans*

RESULTADOS

Figura 22. Inibição do crescimento dos micro-organismos pelo extrato hidroetanólico de caule e folha de *A. urundeuva* incorporados ou não no sistema nanoestruturado.



RESULTADOS



Os resultados obtidos com a leitura espectrofotométrica foram interpretados de acordo com a porcentagem de inibição do crescimento microbiano em relação à concentração do extrato vegetal livre (linha azul) e incorporado no sistema nanoestruturado desenvolvido (linha verde). Como observado, a grande maioria dos extratos de caule e folha de *Astronium* sp não apresentaram atividade antibacteriana antes e nem mesmo após sua incorporação, resultando em gráficos cujas linhas do extrato não incorporado e incorporado estão praticamente sobrepostas entre si. Uma pequena diferença de atividade pode ser observada com os extratos do caule e folha de *A. fraxinifolium* frente a *S. aureus*, sendo, portanto, considerada a única espécie que teve sua atividade antibacteriana potencializada contra as bactérias testadas após a incorporação. Em relação à atividade antifúngica contra *C. albicans*, uma diferença significativa de atividade pode ser claramente visualizada entre os extratos incorporados ou não no sistema nanoestruturado proposto, uma vez que todos os extratos (caule e folha) de *Astronium* sp tiveram sua atividade antifúngica potencializada.

4.5. Determinação do IC₅₀ e IS

Nas Tabelas 3 a 7 são apresentados os resultados das avaliações biológicas dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para cada micro-organismo.

Tabela 3. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *E. coli*.

Extratos	Parâmetros					
	Não incorporados			Incorporados		
	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS
AFC	767,2	> 1000	< 0,76	>1000	> 1000	NC*
AFF	950	> 1000	< 0,95	>1000	> 1000	NC*
AGC	>1000	> 1000	NC*	>1000	> 1000	NC*
AGF	833	> 1000	< 0,83	>1000	> 1000	NC*
AUC	900	> 1000	< 0,9	>1000	> 1000	NC*
AUF	536,1	> 1000	< 0,53	>1000	> 1000	NC*

* NC - Não Calculado

Tabela 4. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *S. aureus*.

Extratos	Parâmetros					
	Não incorporados			Incorporados		
	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS
AFC	767,2	> 1000	< 0,76	>1000	500	> 2
AFF	950	> 1000	< 0,95	>1000	1000	> 1
AGC	>1000	> 1000	NC*	>1000	> 1000	NC*
AGF	833	250	3,33	>1000	250	> 4
AUC	900	> 1000	< 0,9	>1000	> 1000	NC*
AUF	536,1	125	4,28	>1000	125	> 8

* NC - Não Calculado

RESULTADOS

Tabela 5. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *S. setubal*.

Extratos	Parâmetros					
	Não incorporados			Incorporados		
	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS
AFC	767,2	> 1000	< 0,76	>1000	> 1000	NC*
AFF	950	> 1000	< 0,95	>1000	> 1000	NC*
AGC	>1000	> 1000	NC*	>1000	> 1000	NC*
AGF	833	> 1000	< 0,83	>1000	> 1000	NC*
AUC	900	> 1000	< 0,9	>1000	> 1000	NC*
AUF	536,1	> 1000	< 0,53	>1000	> 1000	NC*

* NC - Não Calculado

Tabela 6. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *H. pylori*.

Extratos	Parâmetros					
	Não incorporados			Incorporados		
	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS
AFC	767,2	> 1000	< 0,76	>1000	> 1000	NC*
AFF	950	> 1000	< 0,95	>1000	> 1000	NC*
AGC	>1000	> 1000	NC*	>1000	> 1000	NC*
AGF	833	> 1000	< 0,83	>1000	> 1000	NC*
AUC	900	> 1000	< 0,9	>1000	> 1000	NC*
AUF	536,1	> 1000	< 0,53	>1000	> 1000	NC*

* NC - Não Calculado

Tabela 7. Resultados das avaliações biológicas (CIM e IC₅₀) e determinação do IS dos extratos de *Astronium* sp incorporados ou não no sistema nanoestruturado para *C. albicans*.

Extratos	Parâmetros					
	Não incorporados			Incorporados		
	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	IS
AFC	767,2	> 1000	< 0,76	>1000	62,5	> 16
AFF	950	> 1000	< 0,95	>1000	250	> 4
AGC	>1000	> 1000	NC*	>1000	62,5	> 16
AGF	833	> 1000	< 0,83	>1000	125	> 8
AUC	900	> 1000	< 0,9	>1000	62,5	> 16
AUF	536,1	125	4,28	>1000	15,62	> 64,02

* NC - Não Calculado

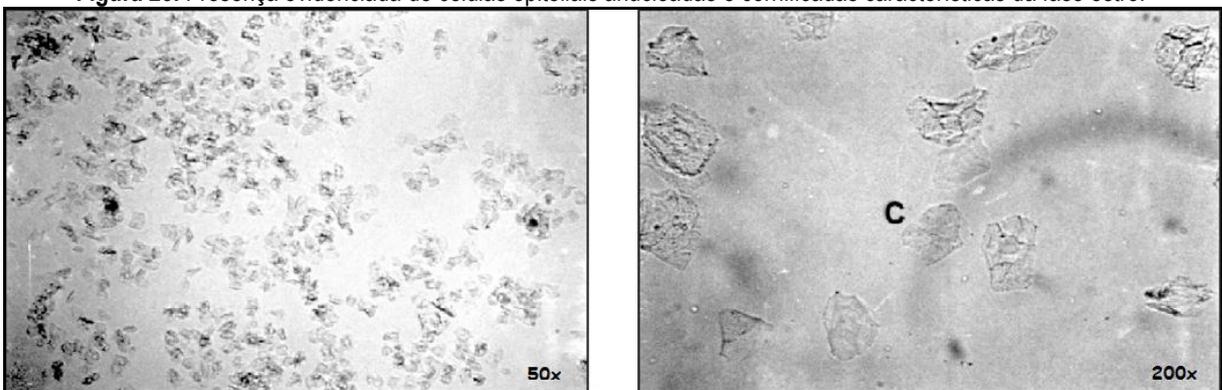
De uma maneira geral, os extratos não incorporados testados mostraram baixa seletividade ($IS < 10$). Ao se calcular o IS pode-se observar que, em relação às bactérias, os extratos não incorporados foram muito pouco seletivos ao apresentarem valores de IS significativamente inferiores ao desejável (> 10). O valor de IS não foi calculado quando ambos os valores de CIM e IC_{50} foram maior que $1000 \mu\text{g/mL}$. Apesar de alguns extratos testados contra *S. aureus* terem elevado seu valor de IS após sua incorporação no sistema nanoestruturado, o grau de seletividade não foi suficientemente modificado ao manterem valores de IS inferiores a 10.

Em relação à levedura *C. albicans*, todos os extratos de *Astronium* sp, antes da incorporação, apresentaram baixa seletividade ($IS < 10$). Dos extratos incorporados, quatro apresentaram $IS > 10$ e, destes, aquele que havia apresentado melhor atividade (folha de *A. urundeuva*) foi considerado o mais seletivo ($IS > 64,02$). Esses resultados mostraram que o sistema nanoestruturado desenvolvido foi capaz de potencializar a atividade desses extratos contra a levedura, além de reduzir sua citotoxicidade, principalmente da folha de *A. urundeuva*, selecionado para o ensaio *in vivo*.

4.6. Atividade anti-CVV *in vivo*

A confirmação do estado pseudo-estro foi realizada através da presença evidenciada de células epiteliais anucleadas, as quais caracterizam o estado pseudo-estro (Figura 23). É importante mencionar que não nenhum animal estava infectado com *C. albicans* antes de ser devidamente infectado; a análise foi realizada através do plaqueamento do fluido vaginal de todos os animais. Quarenta e oito horas após a indução da infecção, a confirmação da infecção foi realizada através da lavagem vaginal com PBS estéril (0,1 mL) com posterior plaqueamento do fluido vaginal, que apresentou carga fúngica suficiente para dar início ao tratamento (mínimo de 100 UFC/mL).

Figura 23. Presença evidenciada de células epiteliais anucleadas e cornificadas características da fase estro.



Fonte: Marcondes, 2002.

RESULTADOS

A Tabela 8 apresenta o número de animais infectados e a média do número de UFC dos grupos de animais nos dias 8, 12 e 16 de experimento.

Tabela 8. Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica obtidos nos animais.

Grupos experimentais		Dia 8 (2 dias após a inoculação)		Dia 12 (4 dias de tratamento)		Dia 16 (8 dias de tratamento)	
		Animais infectados	UFC	Animais infectados	UFC	Animais infectados	UFC
1	C-	0/0	0	0/0	0	0/0	0
2	C+	5/5	>100	5/5	>100	5/5	92,2
3	C+ anfo. B	5/5	>100	5/5	76,8	4/5	11,4
4	DMSO	5/5	>100	5/5	>100	5/5	87,1
5	AUF + DMSO	5/5	>100	5/5	65,6	3/5	3,75
6	ME	5/5	>100	5/5	>100	5/5	69,8
7	AUF + ME	5/5	>100	4/5	24,2	0/0	0

A quantificação da carga fúngica foi avaliada no fluido vaginal dos animais após 4 dias de tratamento, com a qual foi observado que todos os animais dos grupos 2 a 6 ainda encontravam-se infectados (5/5), com exceção do grupo tratado com o extrato incorporado (7), que já havia apresentado redução significativa da infecção de um animal (4/5). Os animais dos grupos controle do solvente do extrato não incorporado - DMSO (4) e do extrato incorporado - ME base (6) ainda apresentavam carga fúngica significativa até último dia de tratamento, garantindo dessa maneira que qualquer atividade manifestada fosse exclusivamente do extrato vegetal (AUF). No 8º dia após o início do tratamento, todos os animais do grupo tratado com o extrato incorporado (7) haviam sido curados, e a média da carga fúngica dos animais do grupo tratado com o extrato não incorporado (5) ainda assim foi relativamente menor em relação ao grupo tratado com creme vaginal de anfotericina B (3).

5. DISCUSSÃO

A família Anacardiaceae é amplamente representada no Brasil por várias espécies de importância econômica e produtoras de frutos e óleos essenciais. Menos de 7% das espécies conhecidas desta família possuem dados na literatura a respeito de estudos fitoquímicos e relatos de atividades biológicas, como antimicrobiana (CORREIA et al., 2006).

Conforme demonstrado no nosso estudo, os extratos de *Astronium* sp apresentaram comportamentos diferentes frente as cepas bacterianas e fúngica. O mecanismo de ação dos extratos vegetais pode ser amplamente influenciado pela presença e quantidade de diversos componentes ativos, que podem ou não apresentar atividades físico-químicas e biológicas responsáveis pelo potencial antimicrobiano. Segundo Silva et al. (2010b) as espécies do gênero *Astronium* sp possuem como principais componentes os flavonoides, as proantocianidinas, como profisetinidina e prorobinetinidina, além do alto teor de polifenóis, tais como as ligninas e os taninos.

Do ponto de vista químico, os taninos são compostos altamente reativos que apresentam uma série de atividades, entre elas a antimicrobiana. Além disso, a ligação às proteínas e adesinas, e inibição de enzimas são capazes de suprimir o substrato microbiano. Estes compostos são facilmente oxidáveis, capazes de se complexar com a parede celular e provocar ruptura da membrana plasmática, além de formar complexos com íons metálicos (COWAN, 1999; ROSSI et al., 2012a).

A revelação com resazurina mostrou que a maioria dos extratos vegetais de *Astronium* sp não apresentou atividade antibacteriana, principalmente frente a *E. coli*, *S. setubal* e *H. pylori*. Conforme observado, a única atividade apresentada foi pelo extrato das folhas de *A. graveolens* (CIM=250 µg/mL), frente a *S. aureus* e *A. urundeuva* (CIM=125 µg/mL) frente a *S. aureus* e *C. albicans*. Ao verificar a porcentagem de inibição dos extratos vegetais através da leitura espectrofotométrica, pode-se observar que, de certa forma, houve algum percentual inibitório do crescimento bacteriano, embora não significativo e suficiente para que o CIM fosse detectado através do revelador. Isso decorre da sensibilidade do agente revelador resazurina (cor azul), que é oxidada na presença de células viáveis formando a resorufina, substância de coloração rósea. No entanto, as nuances de cores entre o azul e o rósea podem ocasionar dúvidas na determinação da CIM (STOPPA et al., 2009), detectada nesse caso somente quando ocorre uma porcentagem de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 90% (HÖRNER et al., 2008; GUDIÑA et al., 2010; HAWSER e ISLAM, 1999). Já a leitura espectrofotométrica fornece leituras (de turvação) que variam de 0 a 100 % de inibição de crescimento, demonstrando, portanto, maior sensibilidade. Apesar disso, neste estudo, os resultados da leitura visual foram condizentes com a leitura espectrofotométrica.

De uma maneira geral, através da análise espectrofotométrica, pode-se observar que o extrato do caule de *A. fraxinifolium* apresentou melhor potencial de inibição frente a *E. coli*, enquanto que o extrato da folha desta mesma espécie apresentou melhor atividade inibitória frente a *S. setubal* e *H. pylori*. Em relação ao *S. aureus* e a *C. albicans*, o extrato que apresentou melhor potencial de inibição frente a essa bactéria foi da folha de *A. urundeuva*.

Segundo Oliveira (2012), as folhas de *A. urundeuva* apresentam forte atividade antibacteriana frente à *S. aureus*. Na avaliação da atividade antifúngica dessa mesma espécie vegetal, Alves (2009) observou que o extrato da aroeira-do-sertão apresenta atividade antifúngica frente às cepas de *C. albicans*, além de *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Tais atividades foram comprovadas em nosso estudo com o extrato das folhas do *A. urundeuva* com CIM de 125 µg/mL para a espécie bacteriana e fúngica analisadas.

Segundo Montanari et al. (2012), que avaliaram a composição química dos óleos essenciais das folhas de cinco espécies da família Anacardiaceae, incluindo *A. fraxinifolium* e *A. urundeuva* e com posterior avaliação da atividade antimicrobiana, observaram segundo a técnica de difusão em ágar que a maioria dos óleos essenciais presentes nessas espécies apresentaram melhores halos de inibição contra as bactérias Gram positivas testadas (*Bacillus cereus* e *S. aureus*). Estes dados são parcialmente coerentes com os resultados apresentados, pois apesar do extrato de *A. urundeuva* ter realmente apresentado melhor atividade contra *S. aureus* (Gram-positiva), o extrato da folha de *A. fraxinifolium* apresentou melhor atividade contra *S. setubal*, uma bactéria Gram-negativa. Algumas controvérsias apresentadas entre os dados da literatura e os resultados obtidos podem ser explicadas pelo processo de extração do material vegetal bem como pelo solvente utilizado no preparo e obtenção dos extratos vegetais e também pela metodologia empregada na análise do potencial biológico.

A obtenção de um composto biologicamente ativo contido no material vegetal depende também da polaridade do solvente escolhido, que vai ser capaz de extrair uma maior quantidade de compostos com polaridade semelhante. Para ser considerado um bom solvente, algumas características são requeridas, tais como baixa toxicidade, facilidade de evaporação a baixa temperatura, absorção fisiológica rápida do extrato, ação conservante e incapacidade de fazer com que o extrato se dissocie ou torne um complexo (DAS et al., 2010).

Além disso, uma série de fatores naturais influencia diretamente no metabolismo e produção de metabólitos secundários, dentre eles a radiação solar, raios ultravioleta, períodos de seca ou chuva, temperatura, solo, nutrientes e estação do ano. Por exemplo, em períodos de chuva, os compostos mais polares são facilmente eliminados da planta por lixiviação. Além disso, outros fatores, considerados artificiais, como os mais diversos poluentes, também possuem a capacidade de interferir

na quantidade de metabólitos secundários produzidos (BECHO et al., 2009; SILVA JÚNIOR et al., 2009).

Outros estudos com *A. urundeuva* comprovaram sua ação antiviral contra SA11 (CECÍLIO et al., 2012), antibacteriana contra o *Enterococcus faecalis* (COSTA et al., 2010) e neuroprotetora da fração enriquecida com chalcona desta espécie (NOBRE-JÚNIOR et al., 2009).

Dados literários não apresentam uma classificação consensual em relação aos valores de CIM. Aligiannis e colaboradores (2001) consideram CIMs com valores iguais ou menores que 500 µg/mL como inibidores potentes; CIMs entre 600 e 1500 µg/mL como inibidores moderados e CIMs acima de 1600 µg/mL como inibidores fracos. Webster e colaboradores (2008) estabeleceram como satisfatório outro valor de CIM (igual ou menor que 1000 µg/mL).

Seguindo a primeira classificação, dentre todos os extratos não incorporados no sistema nanoestruturado, apenas os da folha de *A. graveolens* e *A. urundeuva* foram considerados inibidores potentes ao apresentar CIM de 250 e 125 µg/mL para *S. aureus*, respectivamente, enquanto que para *E. coli*, *S. setubal* e *H. pylori*, tanto os extratos do caule como das folhas de todas as espécies de *Astronium* sp provavelmente foram considerados inibidores fracos ao apresentarem CIM maior que 1000 µg/mL. Em relação a *C. albicans*, os extratos do caule e das folhas de *A. fraxinifolium* e *A. graveolens* e caule de *A. urundeuva* foram considerados inibidores fracos (CIM>1000 µg/mL), visto que apenas o extrato das folhas desta última espécie apresentou um valor de CIM (125=µg/mL) que corresponde a um grau de inibição potente. Caso os extratos fossem classificados de acordo com Webster e colaboradores, a inibição satisfatória também seria aplicada apenas para os extratos das folhas de *A. graveolens* (CIM=250 µg/mL) para *S. aureus*, e *A. urundeuva* (CIM=125 µg/mL) para *S. aureus* e *C. albicans*.

Como já mencionado, a literatura relata a presença de componentes majoritários presentes no extrato de *Astronium* sp, como chalconas, precursoras de flavonoides, óleos essenciais e taninos, os quais normalmente estão relacionados à atividade antimicrobiana (DAS et al., 2010). Testes preliminares mostraram também que a solução hidroetanólica 70% utilizada como extratora possibilita a extração de grande parte dos componentes do *Astronium* sp. Todavia, há grande dificuldade de solubilização de alguns compostos que se precipitam em função do tempo. Isto ocorre em virtude de que os componentes majoritários presentes no extrato, de acordo com a literatura, são óleos essenciais e taninos, que apresentam diferentes graus de hidrofília/lipofília, fato que justifica ainda mais o uso da nanotecnologia direcionada para a incorporação de extratos vegetais.

A incorporação no sistema nanoestruturado não potencializou a atividade antibacteriana de todos os extratos, visto que apenas o caule e folhas de *A. fraxinifolium*, que antes não haviam apresentado atividade (CIMs>1000 µg/mL), passaram a apresentar CIMs de 500 e 1000 µg/mL,

respectivamente. Os extratos das folhas de *A. graveolens* e *A. urundeuva*, que haviam apresentado CIMs de 250 e 125 µg/mL, respectivamente, mantiveram seu potencial de inibição após a incorporação.

Em relação à levedura *C. albicans*, pode-se dizer que o efeito antifúngico de todas as espécies vegetais foi surpreendentemente potencializado após a incorporação no sistema nanoestruturado. Como observado, antes da incorporação, apenas o extrato da folha de *A. urundeuva* havia apresentado atividade antifúngica com CIM de 125 µg/mL. Após a incorporação, os extratos do caule das três espécies (CIM=62,5 µg/mL) e das folhas de *A. fraxinifolium* e *A. graveolens* (CIMs de 250 e 125 µg/mL, respectivamente) passaram também a apresentar atividade antifúngica. Quanto ao extrato das folhas de *A. urundeuva*, seu efeito biológico foi ainda mais potencializado ao apresentar um CIM de 15,62 µg/mL, cerca de oito vezes menor em relação ao anterior.

Levando-se em conta que os valores de CIM da ampicilina, controle positivo utilizado contra *E. coli* (6,25 µg/mL), *S. aureus* (0,15 µg/mL) e *S. setubal* (2,50 µg/mL), e da amoxicilina, controle positivo utilizado contra *H. pylori* (1,56 µg/mL), foram bem inferiores aos apresentados pelos extratos de *Astronium* sp, pode-se inferir que estes não apresentaram resultados tão promissores quanto o esperado.

Ao se comparar o CIM obtido dos controles positivos utilizados para a levedura *C. albicans* - anfotericina B (0,06 µg/mL) e fluconazol (8 µg/mL) - pode-se dizer que o extrato da folha de *A. urundeuva*, único que apresentou atividade antes da incorporação, também não havia sido considerado tão promissor com um CIM de 125 µg/mL, consideravelmente maior em relação aos controles. Essa diferença de valores se tornou relativamente menor, principalmente em relação ao fluconazol, quando o extrato da folha desta mesma espécie apresentou um valor de CIM cerca de oito vezes menor após sua incorporação. A diferença obtida entre os valores de CIM dessa espécie vegetal e dos controles utilizados, principalmente no caso da anfotericina B, pode ser em decorrência de diversos fatores capazes de refletir, direta ou indiretamente, na composição e quantidade de compostos ativos extraídos, como a metodologia empregada e o tipo de solvente utilizado, bem como na atividade biológica, influenciada por vários fatores, como a composição do veículo utilizado como carreador do ativo.

A anfotericina B convencional, produzida pelo *Streptomyces nodosus*, pertence ao grupo de compostos macrolídeos. O mecanismo de ação clássico baseia-se na interação específica com o ergosterol presente na membrana, alterando a permeabilidade celular e formando poros aquosos que favorecem o extravasamento de íons e macromoléculas intracelulares, conduzindo a morte celular. É através da formação desses poros que um aumento da permeabilidade de H⁺/OH⁻ ocorre e resulta em dano na membrana. De uma maneira geral, a hipótese clássica é que a morte celular fúngica resulte da

acidificação intracelular associada com a perda de potássio. A região rica em duplas ligações permite a forte ligação com o ergosterol, enquanto que o lado rico em grupos hidroxílicos se associa as moléculas de água. É através da propriedade anfifílica desse fármaco que a formação de poros aquosos ocorre, com a porção lipofílica direcionada ao lado exterior e a hidrofílica recobrando o lado interior desses. A presença de ergosterol possibilita que baixas concentrações de anfotericina sejam suficientes para causar letalidade à célula fúngica. Na ausência de esterol, seria necessária uma concentração ainda mais elevada de anfotericina para atingir a membrana, permitir a interação com o ergosterol e causar letalidade à célula fúngica (MS, 2010; COHEN, 1998). Diferente da anfotericina B, o mecanismo de ação do fluconazol baseia-se na interferência da biossíntese do ergosterol através da inibição das enzimas fúngicas do citocromo P450 (MS, 2010).

De acordo com o conceito de Overtone sobre permeabilidade celular, a lipofilicidade da membrana celular favorece muito mais a passagem de substâncias lipossolúveis do que hidrossolúveis. Portanto, a lipofilicidade é uma característica importante na busca do desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana, porque favorece a interação da cadeia hidrofóbica com os lipídios da membrana da célula, garantindo dessa forma a penetração do ativo no citoplasma (MISSNER e POHL, 2009).

A redução do CIM do extrato da folha de *A. urundeuva*, quando este foi incorporado no sistema lipídico microemulsionado, pode estar provavelmente relacionada à presença de colesterol em sua composição, que pode ter favorecido a interação com o ergosterol presente na membrana da célula fúngica, liberando o ativo diretamente no alvo específico. Além disso, a composição do sistema formado pode ter facilitado a solubilização de substâncias de diferentes graus de hidrofília/lipofília, como os taninos e óleos essenciais, aumentando de maneira significativa o potencial antimicrobiano. Um dos motivos pelo qual os demais extratos apresentaram atividade antifúngica somente após a incorporação em sistemas lipídicos pode ser justamente a solubilização favorecida de ativos, provavelmente responsáveis pela atividade. Com exceção do extrato das folhas de *A. urundeuva* (CIM=15,62 µg/mL), que apresentou o resultado mais promissor de todos, o caule das três espécies (CIM=62,5 µg/mL) de *Astronium* sp provavelmente possuem uma maior quantidade de componentes com potencial antifúngico, que pode ser demonstrado somente após a incorporação em sistemas nanoestruturados. Segundo Cunha-Júnior (2003), a presença de tensoativos é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana celular, o que facilita a absorção do composto ativo, possibilitando maior biodisponibilidade.

Cabe mencionar que a ME lipídica sintetizada (base), quando submetida ao ensaio frente a todos os micro-organismos (controle do solvente), não apresentou atividade, ou seja, não inibiu o crescimento bacteriano e fúngico, garantindo dessa forma que a atividade apresentada tenha sido

exclusivamente exibida pelo extrato vegetal e não por quaisquer outras interferências, como pelos componentes que formam o sistema nanoestruturado.

Após analisar o diâmetro das partículas, pode-se observar uma possível relação entre o tamanho das gotículas que formam o sistema nanoestruturado e a atividade antifúngica apresentada pelos extratos vegetais após sua incorporação. De acordo com a Tabela 2, o tamanho das partículas da ME foi igual a $117,2 \pm 1,966$ nm. A incorporação dos extratos causou uma pequena variação no tamanho das partículas, sem exceção, variando de $123,6 \pm 0,2517$ a $146,7 \pm 1,825$ nm. Todos os valores obtidos estão na faixa de 10-200 nm (100-2000 Å), intervalo ideal para MEs segundo Formariz et al. (2005). Quando se compara a ME e as formulações contendo os extratos vegetais, observa-se um pequeno aumento no tamanho das partículas, sendo esse um forte indício de que realmente ocorreu a incorporação dos respectivos extratos no sistema lipídico nanoestruturado. O IPD é o índice que mostra a homogeneidade relativa entre os tamanhos das partículas distribuídos na amostra medida. Os valores de IPD variaram entre $0,222 \pm 0,003$ e $0,276 \pm 0,008$ apresentando uma baixa faixa de variação entre a base e as formulações com os extratos incorporados, esses dados permitem inferir que as amostras apresentam homogeneidade.

Após o período de três meses (tempo 3), quando as amostras (ME base e ME + extrato) foram novamente avaliadas, pode-se observar que o tamanho da partícula e o IPD apresentaram valores maiores em relação ao tempo 0. Diversos podem ser os fatores relacionados ao aumento do tamanho das partículas que compõe uma ME, a exemplo do processo de coalescência em função do tempo, no qual duas ou mais gotículas se agregam entre si, formando uma única gotícula de tamanho maior. Esse fenômeno pode ser explicado pelo estreitamento do filme de fase contínua e ruptura do filme das gotículas, levando aproximação entre as microgotículas (TADROS et al., 2009). É importante ressaltar que apesar do tamanho das partículas do sistema nanoestruturado ter variado após o período de três meses, tanto os valores da ME base quanto da ME + extrato ainda se encontravam dentro do intervalo estabelecido e considerado ideal para uma micromeulsão (10-200 nm). Esses dados permitem inferir que o sistema lipídico desenvolvido propiciou uma melhor permeabilidade dos extratos através da membrana da levedura, favorecendo assim um contato mais efetivo com os alvos, e esteja atuando como um carreador altamente eficaz para o extrato das folhas de *A. urundeuva*.

Associado ao uso da anfotericina B convencional, estão relatados inúmeros casos de efeitos colaterais, destacando-se a nefrotoxicidade, diretamente relacionada ao mecanismo de ação. Visto que a capacidade antifúngica desse fármaco está diretamente relacionada à interação com o ergosterol das membranas celulares, e que as células eucarióticas também apresentam colesterol em sua membrana, também é possível, embora com menor afinidade, que a anfotericina exerça seus efeitos tóxicos decorrentes da sua ligação ao colesterol celular. Recentemente, diversos estudos com o uso de

formulações lipídicas de anfotericina B, relatam uma diminuição drástica no número de casos de insuficiência renal (WADE et al., 2013). Diante do risco de efeitos adversos causados pela anfotericina convencional e até mesmo quando associada a sistemas lipídicos, é também de extrema importância avaliar se o extrato das folhas de *A. urundeuva* incorporado no sistema nanoestruturado apresenta toxicidade selecionada às células fúngicas, principalmente pela presença do colesterol na composição da formulação.

Além disso, antes de avaliar qualquer substância em modelos *in vivo*, é amplamente recomendado usar um método alternativo, como por exemplo, uma cultura de célula (VALADARES, 2006). Baseado nessa recomendação, todos os extratos incorporados ou não no sistema nanoestruturado foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade em células VERO, um modelo normal de célula eucariótica.

O IS é um cálculo realizado com o intuito de selecionar as melhores substâncias para dar continuidade a estudos mais aprofundados, a exemplo dos ensaios *in vivo*, uma vez que uma série de amostras, tanto sintéticas quanto naturais não são selecionadas a ensaios futuros justamente por não apresentar considerada seletividade às células de interesse, o que é uma grande desvantagem quando se pretende partir para ensaios clínicos. O índice é obtido através da divisão do IC₅₀ pelo CIM (IC₅₀/CIM), e quando determinada substância apresenta um valor maior que 10, esta pode ser considerada como promissora, pois garante seletividade às células de interesse.

São poucos os relatos observados na literatura sobre uma possível citotoxicidade causada pelas espécies de *Astronium* sp estudadas. Após observar os efeitos antiulcerogênicos de extratos etanólicos e aquosos das raízes de *A. urundeuva* contra úlceras experimentais em ratos, Carlini et al. (2013) investigou sua toxicidade pré-clínica em ratos machos tratados cronicamente por gavagem durante 83 dias. Embora nenhuma alteração anatomopatológica tenha sido observada durante o período de tratamento, os resultados mostraram uma redução significativa nos valores de hematócrito. Os autores concluíram que além de provocar toxicidade moderada, os extratos testados são capazes de induzir a malformações esqueléticas observadas na prole de ratas fêmeas quando tratadas com o extrato durante a gestação.

Quanto à citotoxicidade frente às células saudáveis, o extrato não incorporado das folhas de *A. urundeuva* demonstrou ser mais tóxico do que o extrato incorporado desta mesma espécie, ou seja, provocam a morte de 50% das células saudáveis em concentrações menores do que o extrato incorporado. Além disso, o IS do extrato incorporado (64,02) foi aproximadamente 15 vezes maior em relação ao extrato não incorporado (4,28) para *C. albicans*, o que impulsiona ainda mais a aplicação da nanotecnologia na utilização de extratos vegetais. Em relação às bactérias, os extratos de uma maneira

geral mostraram baixa seletividade, e mesmo após serem incorporados no sistema nanoestruturado, não apresentaram valores de IS desejáveis (≥ 10).

Os resultados obtidos com específica atividade antifúngica contra *C. albicans* e elevada seletividade de AUF, principalmente depois de incorporado, estimularam a realização do estudo *in vivo* em um modelo animal de CVV, baseado em imunossupressão e indução da fase estro com tratamento hormonal, fatores considerados essenciais na obtenção de uma infecção persistente (NAGLIK et al., 2008).

Além da vantagem econômica, a semelhança entre o sistema imunológico e anatomia entre humanos e ratos e camundongos explica a grande utilização destes animais nos ensaios *in vivo* (SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2001; CHAMILOS et al., 2007).

A escolha da dose de estradiol utilizada foi baseada em outros estudos e foi considerada adequada, uma vez que promoveu diversas alterações fisiológicas que foram favoráveis a adesão, colonização e desenvolvimento da levedura. Dentre as diversas alterações, destacam-se o pH mais elevado, maior disponibilidade de glicogênio, além da formação do epitélio escamoso grosso (ARAÚJO et al., 2013; YANO e FIDEL, 2011; ENJALBERT et al., 2009).

Diversos estudos relacionados à colonização fúngica em modelos de CVV *in vivo* mostram que a indução da imunossupressão é considerada essencial, pois caso os animais fossem infectados sem qualquer debilitação prévia do sistema imune, a infecção seria extremamente variável e rapidamente eliminada (ARAÚJO et al., 2013; ROSSI et al., 2012b). A concentração e volume da suspensão de *C. albicans* utilizada no experimento (5×10^7 UFC/mL – 0,1 mL) foram baseados em estudos realizados com animais que foram infectados e mantiveram seu período de infecção durante 3 semanas (CARRARA et al., 2010). Embora seja primeiramente utilizada como agente quimioterápico, a CPA também é escolhida para tratar algumas doenças, como o lúpus eritematoso sistêmico e a psoríase, com o objetivo de imunossuprimir o sistema imune (ARAÚJO et al., 2013; EMADI, JONES e BRODSKY, 2009).

Após a avaliação da atividade terapêutica de AUF incorporado ou não no sistema nanoestruturado em um modelo experimental de CVV, pode-se observar que logo no 4º dia de tratamento a redução da carga fúngica foi observada tanto nos grupos tratados com anfotericina B (3) e com o extrato não incorporado (5) e ainda mais evidente no grupo tratado com o extrato incorporado (7), sendo este o único grupo que apresentou 100% de redução da infecção no 8º dia de tratamento. Apesar de os animais dos grupos controle do solvente do extrato não incorporado – DMSO (4) e do extrato incorporado (6) apresentarem uma pequena redução da carga fúngica no último dia de tratamento, esta ainda era considerada significativa, garantindo assim que a atividade apresentada fosse exclusiva do extrato vegetal (AUF). Tal redução, pode provavelmente ser explicada por uma

possível redução da ação da CPA com o passar do tempo, permitindo aos poucos um início de reação do sistema imune na tentativa de eliminar a infecção. Como esperado, todos os animais do grupo controle positivo de infecção (2) apresentaram carga fúngica significativa até o último dia de tratamento.

Diante dos resultados obtidos pode-se inferir que o sistema nanoestruturado desenvolvido foi capaz de potencializar a atividade antifúngica do extrato das folhas de *A. urundeuva* e, além disso, garantiu maior seletividade às células de interesse, possibilitando dessa forma, a continuidade de estudos mais aprofundados e podendo futuramente vir a se tornar um agente fungicida utilizado no tratamento da CVV.

6. CONCLUSÕES

- Os extratos hidroetanólicos das espécies de *Astronium* sp testados quanto ao seu potencial antimicrobiano *in vitro* foram poucos ativos;
- Os extratos hidroetanólicos do caule e folhas de *A. fraxinifolium*, *A. graveolens* e *A. urundeuva* não apresentaram atividade contra *E. coli*, *S. setubal* e *H. pylori*;
- Apenas os extratos das folhas de *A. graveolens* (250 µg/mL) e *A. urundeuva* (125 µg/mL) apresentaram atividade contra *S. aureus*, e a espécie *A. urundeuva* (125 µg/mL) contra *C. albicans*;
- A incorporação dos extratos de *Astronium* sp no sistema nanoestruturado potencializou a ação dos mesmos apenas para *S. aureus* (caule e folha de *A. fraxinifolium*) e acentuadamente para *C. albicans*;
- O sistema nanoestruturado desenvolvido possivelmente consegue transpor as camadas de contorno das células eucarióticas, a exemplo da atividade potencializada apenas para *C. albicans*;
- O sistema nanoestruturado desenvolvido apresentou estabilidade após o período de três meses;
- Os extratos vegetais incorporados foram mais seletivos do que os extratos livres, principalmente as folhas de *A. urundeuva* frente à *C. albicans*;
- O extrato incorporado das folhas de *A. urundeuva* apresentou redução significativa da carga fúngica em ratas infectadas com candidíase vulvovaginal, sendo inclusive mais promissor que o controle positivo antifúngico comumente utilizado (anfotericina B).

7. REFERÊNCIAS

- ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. SUS financia seis novos fitoterápicos. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10896>. Data de Publicação: 2 de dezembro de 2009. Acesso: 03 fev. 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Interpretação de Dados Microbiológicos**. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm>. Acesso em: 07 abr. 2013.
- AGUIAR, A. V.; BORTOLOZO, F. R.; MORAES, M. L. T.; ANDRADE, J. A. C. Genetic variation in *Astronium fraxinifolium* populations in consortium. **Crop Breed. Appl. Biotechnol**, v. 3, n. 2, p. 95-106, 2003.
- AJAZUDDIN, S. S. Applications of novels drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680-689, 2010.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.
- ANDERSON, D.; BISHOP, J. B.; GARNER, R. C.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; SELBY, P. B. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutat. Res.**, v. 330, n. 1-2, p. 115-181, 1995.
- ARAÚJO, M. G F.; PACÍFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ICELY, P. A.; MIRÓ, M. S.; SCARPA, M. V. C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. Extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Med. Mycol.**, v. 51, n. 7, p. 673-682, 2013.
- ARENDRUP, M. C.; GARCIA-EFFRON, G.; LASS-FLORL, C.; LOPEZ, A. G.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PERLIN, D. S. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 1, p. 426-439, 2010.

- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?. **Semina Ciênc. Agrar.**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas Medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc. Anna Nery Rev. Enferm.**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BAILEY, M. M.; BERKLAND, C. J. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. **Med. Res. Rev.**, v. 29, n. 1, p. 196-212, 2009.
- BANERJEE, D.; MAITY, B.; NAG, S. K.; BANDYOPADHYAY, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Healing Potential of *Picrorhiza kurroa* (Scrofulariaceae) rhizomes against indomethacin-induced gastric ulceration: a mechanistic exploration. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 8, n. 3, p. 1-14, 2008.
- BARAI, L.; FATEMA, K.; HAQ, J. A.; FARUQ, M. O.; AHSAN, A. A.; MORSHED, M. A. H. G.; HOSSAIN, M. B. Bacterial profile and their antimicrobial resistance pattern in an intensive care unit of a tertiary care hospital in Dhaka. **Ibrahim Med. Coll. J.**, v. 4, n. 2, p. 66-69, 2010.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST. J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BARBOSA, C.; FERNANDES, G.; QUINTAS, C.; ESTER TEIXEIRA, M.; PEDRO NEVES, J. Derivados azólicos no tratamento da candidíase vulvovaginal não complicada. **Acta Obstet. Ginecol. Port.**, v. 6, n. 3, p. 118-123, 2012.
- BASTOS, V. M. P.; NORBERG, A. N.; OLIVEIRA, J. T. M.; SANCHES, F. G.; BARRETO JUNIOR, O. S.; SERRA-FREIRE, N. M. Comparação da incidência, da prevalência da colonização, e da resistência de *Staphylococcus aureus* em diferentes populações humanas. **Rev. UNIABEU**. v. 6, n. 13, p. 28-40, 2013.
- BATISTA, M. R.; BORGES, M.; CARVALHO, O.; RODRIGUES, A.; SANTOS, J. Infecção bacteriana hospitalar em pacientes submetidos a transplante hepático em 2008. **Rev. Pesq.: Cuid. Fundam.**, p. 9-11, 2010. Disponível em: <<http://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/view/767>>. Acesso em: 10 out 2013.
- BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutina - estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Rev. Interdisciplin. Estud. Exp.**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.
- BHATTACHARYA, S.; GHOSH, A. K. Phytosomes: the emerging technology for enhancement of bioavailability of botanicals and nutraceuticals. **Internet J. Aesthet. Antiaging Med.**, v. 2, n. 1, 2009.
- BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, F. M.; ZIA, M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 11, p. 52-58, 2011.
- BOLIVAR, P.; CRUZ-PAREDES, C.; HERNÁNDEZ, L. R.; JUÁREZ, Z. N.; SÁNCHEZ-ARREOLA, E.; AV-GAY, Y.; BACH, H. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, p. 141-147, 2011.

- BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines - a review. **Int. J. Nanomedicine (Online)**, v. 9, p. 1-15, 2014.
- BRESOLIN, T.M.B.; FILHO, V.C. **Fármacos e Medicamentos**: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos, 2010. 436 p.
- BURNETT-HARTMAN, A.; NEWCOMB, P. A.; POTTER, J. D. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC Virus, and Human Papillomavirus. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 17, n. 11, p. 2970-2979, 2008.
- CÂMARA DOS DEPUTADOS. **Gonçalo-alves**. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/responsabilidade-social/bosque-dos-constituintes/flora-local/as-20-especies-originais/goncalo-alves-1>>. Acesso em: 17 jan. 2014.
- CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.
- CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; TABACH, R. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão). **Phytother. Res.**, v. 27, n. 5, p. 692-698, 2013.
- CARMELO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. Estudo do pericarpo e da semente de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae) como notas taxonômicas. **Rev. Bras. Bot.**, v. 23, n. 1, p. 87-96, 2000.
- CARRARA, M. A.; BAZOTTE, R. B.; DONATTI, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L.; PATUSSI, E. V.; BATISTA, M. R. Effect of experimental diabetes on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis in female rats. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 200, n. 6, p. 659.e1-4, 2009.
- CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDI, V. Produtos naturais em odontologia. **Rev. Saúde**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2007.
- CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **J. Ethnopharmacol.**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.
- CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 9, p. 629-641, 2009.
- CHAMI, F.; CHAMI, N.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunisupressed rat model. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, n. 5, p. 909-914, 2004.
- CHAMILOS, G.; LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 42-55, 2007.
- CHEN, T. K.; WIEMER, E. D.; HOWARD, J. J. A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. **Naturwissenschaften**, v. 71, p. 97-98, 1984.

CHEN, Y.; LIN, X.; PARK, H.; GREEVER, R. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. **Nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 316-322, 2009.

CHORILLI, M. **Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol**: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. 2007. 196 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2007.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6^a ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 6^a ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006b.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA., 2008.

COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; CUNICO, M. M.; RIBEIRO, M. L.; CAMARGO, E. R.; KUSSEN, G. M. B.; NOGUEIRA, K. S.; COSTA, L. M. D. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p. 304-309, 2010.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **Int. J. Pharm.**, v. 162, n. 1-2, p. 95-106, 1998.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, 2006.

COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S.; ARRUDA, T. A.; OLIVEIRA, P. T.; DAMETTO, F. R.; CARVALHO, R. A.; MELO, M. D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 2006. 611 p.

CUNHA, F. P.; COSTA, L. J. L.; FERNANDES, A. J. D.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 3, p. 647-652, 2009.

CUNHA JÚNIOR, A. S. C.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 66, n. 3, p. 385-391, 2003.

DANDLEN, S. A.; LIMA, A. S.; MENDES, M. D.; MIGUEL, M. G.; FALEIRO, M. L.; SOUSA, M. J.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G.; FIGUEIREDO, A. C. Antimicrobial activity, cytotoxicity and intracellular growth of Portuguese Tymus essential oils. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 6, p. 1012-1024, 2011.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **J. Med. Plants Res.**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 3, p. 616-687, 2010.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CÍCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **J. Ethnopharmacol.**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nat.Rev. Clin. Oncol.**, v. 6, n. 11, p. 638-647, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Base de dados plantas do Pantanal.** Disponível em:

<<http://www.cpap.embrapa.br/plantas/fichanc.php?topbusca=Astronium+fraxinifolium+Schott>>. Acesso em: 26 set 2013a.

ENJALBERT, B.; RACHINI, A.; VEDIYAPPAN, G.; PIETRELLA, D.; SPACCAPELO, R.; VECCHIARELLI, A.; BROWN, A. J. P.; D'ENFERT, C. A multifunctional, synthetic *Gaussia princeps* luciferase reporter for live imaging of *Candida albicans* infections. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 11, p. 4847-4858.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Guarítá.** Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/trilhas/lei/lei02.htm>. Acesso em: 17 jan. 2014.

- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Fiocruz, 2010, v. 1, p. 236-253.
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The perpetual challenge of infectious diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, n. 5, p. 454-461, 2012.
- FEITOSA, D. G.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R.; PAIANO, M. O. Crescimento de mudas de Gonçalves-Alves (*Astronium fraxinifolium*) sob diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Rev. Árvore**, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2011.
- FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.
- FIORENTINO, M.; DING, H.; BLANCHARD, T. G.; CZINN, S. J.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A. *Helicobacter pylori*-Induced Disruption of Monolayer Permeability and Proinflammatory Cytokine Secretion in Polarized Human Gastric Epithelial Cells. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 3, p. 876-883, 2013.
- FOCK, K. M.; KATELARIS, P.; SUGANO, K.; NEG, T. L.; HUNT, R.; TALLEY, N. J.; LAM, S. K.; XIAO, S.; TAN, H. J.; WU, C. Y.; JUNG, H. C.; HOANG, B. H.; KACHINTORN, U.; GOH, K. L.; CHIBA, T.; RANI, A. A. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 24, p. 1587-1600, 2009.
- FOLDVARI, M.; RADHI, J.; YANG, G.; HEL, Z.; RENNIE, R.; WEARLEY, L. Acute vaginal candidosis model in the immunocompromized rat to evaluate delivery systems for antimycotics. **Mycoses**, v. 43, n. 11-12, p. 393-401, 2000.
- FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.
- FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. S.; SANTILLI, C. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 60, p. 28-35, 2007.
- FORMARIZ, T. P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2008. 155 p.
- FORMARIZ, T. P.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; EGITO, E. S. T.; TERRUGI, C. H. B.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; OLIVEIRA, A. G. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v.77, n. 1, p. 47-53, 2010.
- FREMAUX, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; VERNIZY-ROZAND, C. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. **Vet. Microbiol.**, v. 132, n. 1-2, p. 1-18, 2008.
- FUKASE, K.; KATO, M.; KIKUCHI, S.; INOUE, K.; UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; TERAOKA, D.; AMAGAI, K.; HAYASHI, S.; ASAKA, M. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomized controlled trial. **Lancet**, v. 372, n. 392-397, 2008.

- FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.
- GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **J. Microbiol. Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.
- GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conserv. Genet.**, v. 11, n. 5, p. 1631-1643, 2010.
- GHOSH, V.; SARANYA, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152-157, 2013.
- GOYAL, U., ARORA, R., AGGARWAL, G. Formulation design and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system of lovastatin. **Acta Pharm.**, v. 62, n. 3, p. 357-370, 2012.
- GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Pat. Drug Deliv. Formul.**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 2009.
- GRUNDMANN, H.; AANENSEN, D. M.; VAN DEN WIJNGAARD, C. C.; SPRATT, B. G.; HARMSEN, D.; FRIEDRICH, A. W. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. **PloS Med.**, v. 7, n. 1, p. , 2009.
- GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999.
- HOLMBERG, K.; SHAH, D. O.; SCHWAGER, M. J. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**, Goteborg: John Wiley & Sons, 2002. 606 p.
- HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; INGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.
- HOWDEN, B. P.; DAVIES, J. K.; JOHNSON, P. D. R.; STINEAR, T. P.; GRAYSON, M. L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 99-139, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2013**. Disponível em:

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago>>. Acesso em: 18 jun 2013.

JACOBSEN, S. M.; STICKLER, D. J.; MOBLEY, H. L.; SHIRTLIFF, M. E. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 1, p. 26-59, 2008.

JANDÚ, J. J. B.; SILVA, L. C. N.; PEREIRA, A. P. C.; SOUZA, R. M.; SILVA JÚNIOR, C. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. **J. Med. Plants Res.**, v. 7, n. 8, p. 413-418, 2013.

JARVIK, T.; SMILLIE, C.; GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 2, p. 560-567, 2010.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 21, p. 990-993, 2008.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer, 2007. 565 p.

KAPER, J.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KESARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 3, n. 4, p. 253-266, 2013.

KLUCZYNIK, C. E.; SOUZA, J. H.; PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T. A.; MORAIS, M. R.; CATÃO, R. M. R. Perfil de sensibilidade de *Salmonella* sp de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e a extratos hidroetanólicos de plantas medicinais. **RBAC**, v. 42, n. 2, p. 141-144, 2010.

KNODLER, L. A.; VALLANCE, B. A.; CELLI, J.; WINFREE, S.; HANSEN, B.; MONTERO, M.; STEELE-MORTIMER, O. Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 41, p. 17733-17738, 2010.

LAW, R. J.; GUR-ARIE, L.; ROSENSHINE, I.; FINLAY, B. B. *In vitro* and *in vivo* model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 3, n. 3, a009977.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 175-193, 2012. Suppl. S.

LEE, R. W.; SHENOY, D. B.; SHEEL, R. Micellar Nanoparticles: applications for topical and passive transdermal drug delivery. In: KULKARNI, V. S. **Handbook of non-invasive drug delivery systems**, Burlington, MA: Elsevier, 2010. p. 37-58.

- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 664 p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. v. 1, 384 p.
- LUNA, C. V. Distribution and importance of the family Anacardiaceae timber in the gran chaco of Argentina. **Ra Ximhai**, v. 8, n. 3, 2012.
- MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 14, suppl. 0, p. 40-44, 2004.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1128 p.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Curr. Drug Deliv.**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.
- MARANHÃO, R. C.; TERYAC, A. M.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on metabolism of protein-free emulsions models of lipoprotein. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 875, n. 2, p. 247-255, 1986.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.
- MARTINEZ, A.; REGARDERA, J.; JIMENEZ, E.; SANTOS, I.; GARGALLO-VIOLA, D. Antifungal efficacy of GM237354, a sordarin derivate, in experimental oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, b. 4, p. 1008-1013, 2001.
- MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Formulário Terapêutico Nacional 2010**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/FTN.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2013.
- MISSNER, A.; POHL, P. 110 years of the Meyer–Overton rule: predicting membrane permeability of gases and other small compounds. **Chemphyschem.**, v. 10, n. 9-10, p. 1405-1414, 2009.
- MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 173 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; ANDRADE, N. J.; ISMAIL, F. M. D.; BARBOSA, M. C. A. Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9728-9740, 2012.

- MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga. **Rev. Árvore**, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.
- NAGLIK, J. R.; FIDEL JR, P. L.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 283, n. 2, p. 129-139, 2008.
- NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitol. Res.**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.
- NDIP, R. N.; AJONGLEFAC, A. N.; MBULLAH, S. M.; TANIH, N. F.; AKOACHERE, J. F. T. K.; NDIP, L. M.; LUMA, H. N.; WIRMUM, C. NGWA, F.; EFANGE, S. M. N. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lycopodium cernuum* (Linn) Pic. Serm. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 7, n. 22, p. 3989-3994, 2008.
- NOBRE-JÚNIOR, H. V.; OLIVEIRA, R. A.; MAIA, F. D.; NOGUEIRA, M. A. S.; MORAES, M. O.; BANDEIRA, M. A. M.; ANDRADE, G. M.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochem. Res.**, v. 34, n. 6, p. 1066-1075, 2009.
- NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M.; ALMEIDA, H. S.; VELOSO, M. D. M. Aspectos ecológicos da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão – Anacardiaceae): fenologia e germinação de sementes. **Rev. Árvore**, v. 32, n. 2, p. 233-243, 2008.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 1, p. 73-79, 2001.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: aplicações de liberação de fármacos. **Infarma**, v. 14, n. 7-8, p. 76-80, 2002.
- OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.
- OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENÇO, M. C. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011.
- OLIVEIRA, L. M.; CARDOSO, N. S. N.; FERNANDEZ, L. G.; ROQUE, M. R. A.; SANTANA, J. R. F.; PELACANI, C. R.; CASTRO, R. D. The effect of growing conditions on phenolic compounds and antimicrobial activity of *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 11, n. 41, p. 9770-9775, 2012.
- ORME, I. et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.

- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.
- PESTANA, K. C.; FORMARIZ, T. P.; FRANZINI, C. M.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 253-259, 2008.
- PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Cienc. Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.
- PINTO, J. M. A.; SOUZA, E. A.; OLIVEIRA, D. F. Use of plant extracts in the control of common bean anthracnose. **Crop Prot.**, v. 29, n. 8, p. 838-842, 2010.
- QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Rev. Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485-492, 2002.
- RAJENDRAN, R.; RADHAI, R.; KOTRESH, T. M.; CSISZAR, E. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydr. Polym.**, v. 91, n. 2, p. 613-617, 2013.
- RAMAN, I. A.; SUHAIMI, H.; TIDDY, G. J. T. Liquid crystals and microemulsions formed by mixtures of a non-ionic surfactant with palm oil and its derivatives. **Adv Colloid Interface Sci.**, v. 106, p. 109-127, 2003.
- RAO, V. S. N.; VIANA, G. S.; MENEZES, A. M.; GADELHA, M. G. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. aqueous extract. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 6, p. 803-805, 1987.
- RASKO, D. A.; WEBSTER, D. R.; SAHL, J. W.; BASHIR, A.; BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; PAXINOS, E. E.; SEBRA, R.; CHIN, C. S.; ILIOPOULOS, D.; KLAMMER, A.; PELUSO, P.; LEE, L.; KISLYUK, A. O.; BULLARD, J.; KASARSKIS, A.; WANG, S.; EID, J.; RANK, D.; STEYERT, J. C.; FRIMODT-MOLLER, J.; STRUVE, C.; PETERSEN, A. M.; KROGFELT, K. A.; NATARO, J. P.; SCHADT, E. E.; WALDOR, M. K. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, n. 8, p. 709-717, 2011.
- ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 66, n. 1, p. 1-14, 2011.
- ROSSI, T.; BRITO, J. O.; BITTENCOURT, E.; ALMEIDA, R. S. R.; FARIA, P. N.; DIAS, C. T. S. Resíduo efluente de eucalipto como extrato corante para o tingimento têxtil de algodão. **Redige**, v. 3, n. 1, 2012a.

- ROSSI, D. C.; MUÑOZ, J. E.; CARVALHO, D. D.; BELMONTE, R.; FAINTUCH, B.; BORELLI, P.; MIRANDA, A.; TABORDA, C. P.; DAFFRE, S. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesianain* the control of experimental candidiasis. **BMC Microbiol.**, doi: 10.1186/1471-2180-12-28, 2012b.
- SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 62, n. 4, p. 460–464, 2008.
- SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009a.
- SÁ, R. A.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; BIEBER, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Sci. Technol.**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, 2009b.
- SÁ, R. A.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 63, n. 4, p. 470-477, 2009c.
- SÁ, R. A. **Constituintes químicos da madeira de lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos.** 2008. 153 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
- SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 398-429, 2001.
- SANTOS, F. K.; OYAFUSO, M. H.; KIILL, C. P.; DAFLON-GREMIÃO, M. P.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of hyperproliferative skin diseases - a review. **Curr. Nanosci.**, v. 9, n. 1, p. 159-167, 2013.
- SAWANGCHOTE, P.; GROTE, P. J.; DILCHER, D. L. Tertiary leaf fossils of *Mangifera* (Anacardiaceae) from Li Basin, Thailand as examples of the utility of leaf marginal venation characters. **Am. J. Bot.**, v. 96, n. 11, p. 2048-2061, 2009.
- SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Escherichia coli*. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/528934/view>>. Acesso em: 21 set. 2013a.
- SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/12895/view>>. Acesso em: 09 dez. 2013b.
- SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Salmonella enteritidis*. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/11773/view>>. Acesso em: 21 set. 2013c.

- SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Helicobacter pylori*. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/11851/view>>. Acesso em: 09 dez. 2013d.
- SCIENCE PHOTO LIBRARY. *Candida albicans*. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/455438/view>>. Acesso em: 29 jan. 2014e.
- SELTON-SUTY, C.; CÉLARD, M.; LE MOING, V.; DOCO-LECOMPTE, T.; CHIROUZE, C.; IUNG, B.; STRADY, C.; REVEST, M.; VANDENESCH, F.; BOUVET, A.; DELAHAYE, F.; ALLA, F.; DUVAL, X.; HOEN, B. Preeminence of *Staphylococcus aureus* in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, n. 9, p. 1230-1239, 2012.
- SHARIFF, V. A. A. R.; SHENOY, M. S.; YADAV, T.; RADHAKRISHNA, M. The antibiotic susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli*, with special reference to the fluoroquinolones. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 7, n. 6, p. 1027-1030, 2013.
- SILVA, R. M. G.; SARAIVA, T. S.; SILVA, R. B.; GOLÇALVES, L. A.; SILVA, L. P. Potencial alelopático de extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* e *Astronium graveolens*. **Biosci. J.**, v. 26, n. 4, p. 632-637, 2010a.
- SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Sci. Plena**, v. 6, n. 2, 2010b.
- SILVA, L. C. A.; MELO, M. S. F.; VILEGAS, W. Perfil químico de extrato etanólico do pericarpo de *Crotalaria pallida*. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2011.
- SILVA JÚNIOR, I.E.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S.A.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 19, n. 1b, p. 242-248, 2009.
- SINICO, C.; DE LOGU, A.; LAI, F.; VALENTI, D.; MANCONI, M.; LOY, G.; BONSIGNORE, L.; FADDA, A. M. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 59, n. 1, p. 161-168, 2005.
- SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **J. Control. Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.
- SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S. S.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*. **RBAC**, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2007.
- SMITHSONIAN TROPICAL RESEARCH INSTITUTE. *Astronium graveolens*. Disponível em: <<http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/18030>>. Acesso em: 26 set 2013.
- SONG, J.; WILLINGER, T.; RONGVAUX, A.; EYNON, E. E.; STEVENS, S.; MANZ, M. G.; FLAVELL, R. A.; GALÁN, J. E. A mouse model for the human pathogen *Salmonella Typhi*. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 4, p. 369-376, 2010.
- STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; FURTADO, N. A. J. C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

- SU, Y. L.; FU, Z. Y.; ZHANG, J. Y.; WANG, W. M.; WANG, H.; WANG, Y. C. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. **Powder Technol.**, v. 184, n. 1, p. 114-121, 2008.
- TADROS, T. F. Emulsion science and technology: a general introduction. **Emulsion Science and Technology**. Weinheim: WILEY-VCH, 2009. 326 p.
- TIM CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 38, p. 99-107, 2011.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 934 p.
- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.
- VALADARES, M. C. Avaliação da toxicidade aguda: estratégias após a "era do teste DL50". **REF**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.
- VAN HAL, S. J.; JENSEN, S. O.; VASKA, V. L.; ESPEDIDO, B. A.; PATERSON, D. L.; GOSBELL, I. B. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 2, p. 362-386, 2012.
- VENUGOPAL, J.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; DEV, V. R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Curr. Pharm. Des.**, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.
- VIANA, G. S. B; MATOS, F. J. A.; BANDEIRA, M. A. M.; RAO, V. S. N. **Aroeira-do-sertão (Myracrodruon urundeuva Fr. All.) – estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 164 p., 1995.
- VILLASEÑOR-SÁNCHEZ, E. I.; DIRZO, R.; RENTON, K. Importance of the lilac-crowned parrot in pre-dispersal seed predation of *Astronium graveolens* in a Mexican tropical dry forest. **J. Trop. Ecol.** v. 26, p. 227-236, 2010.
- WADE, R. L.; CHAUDHARI, P.; NATOLI, J. L.; TAYLOR, R. J.; NATHANSON, B. H.; HORN. Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 76, n. 3, p. 361-367, 2013.
- WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infectious diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/>. Acesso em: 06 out. 2013a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New ways to fight infectious diseases in poor countries**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/news/2012/figh_diseases/en/>. Acesso em: 06 out. 2013b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death:** the 10 leading causes of death in the World, 2000 and 2011. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>>. Acesso em: 13 set. 2013c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005.** Disponível em:

<http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/who_edm_trm_2002.1.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2013d.

WROBLEWSKI, L. E.; PEEK, R. M.; WILSON, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer factors that modulate disease risk. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 4, p. 713-739, 2010.

YANO, J., FIDEL, Jr., P. L. Protocols for vaginal inoculation and sample collection in the experimental mouse model of *Candida* vaginitis. **J. Vis. Exp.**, v. 58, e3382, doi:10.3791/3382, 2011.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais:** sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001, 500 p.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais:** novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3 ed. Itajaí: Univali, 2012. 384 p.