

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Leiothrix spiralis* Ruhland E
Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland (ERIOCAULACEAE)**

MARCELO GONZAGA DE FREITAS ARAÚJO

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Virgínia Costa Scarpa

Araraquara – SP

2011

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Leiothrix spiralis* Ruhland E
Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland (ERIOCAULACEAE)**

MARCELO GONZAGA DE FREITAS ARAÚJO

Tese 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 para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Virgínia Costa Scarpa

Araraquara – SP

2011

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

A663c Araújo, Marcelo Gonzaga de Freitas
 Caracterização do potencial biológico de *Leiothrix spiralis* Ruhland e
Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae) / Marcelo Gonzaga
de Freitas Araújo . – Araraquara, 2011
 146 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Tais Maria Bauab

Co-orientador: Maria Virginia Costa Scarpa

1. *Leiothrix spiralis*. 2. *Syngonanthus nitens*. 3. Atividade antimicrobiana.
4. Atividade antioxidante. 5. Citotoxicidade. 6. Teste micronúcleo. I. Bauab,
Tais Maria. II. Scarpa, Maria Virginia Costa, orient. III. Título.

CAPES: 40300005

MARCELO GONZAGA DE FREITAS ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Leiothrix spiralis* Ruhland E
Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland (ERIOCAULACEAE)**

Comissão Examinadora da Defesa Pública

Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP

Profa. Dra. Cláudia Elena Sotomayor

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP-SP

Aprovado em 20/05/2011

*“...É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê...”*

(Marcelo Camelo)

Agradeço a Deus por me fazer forte e competente para realizar esse trabalho, e o dedico aos meus pais, pelo apoio, confiança e amor incondicional;

Meu especial agradecimento a minha chefe Tais, a quem eu busquei em um momento de dificuldade, e que me estendeu a mão e se dispôs a enfrentar com coragem qualquer consequência. Além da contribuição na minha formação e no meu crescimento como profissional e como pessoa, sempre me estimulou nos momentos complicados, dando bons conselhos e auxiliando a trilhar essa jornada com tranquilidade. Muito obrigado!

Aos amigos Leonardo Gorla e Danilo Dignani, meus companheiros de trabalho, de conversas, de risadas, de cervejas, de viagens, de problemas... Compartilhar com vocês estes anos de trabalho foi de uma importância indescritível. Estamos juntos, parceiros por toda a vida. Obrigado amigos!

À minha querida amiga Flavia Resende, a sua amizade e seu carinho me fazem muito feliz, obrigado!

À Jack, pela ajuda, pela simplicidade e amizade, e ao Silvio, pelas discussões científicas, analíticas e políticas tão importantes e tão divertidas! A companhia e lealdade de vocês fizeram com que o trabalho fosse mais divertido e agradável!

Aos amigos que ganhei durante esta jornada, Juninho, Marcelo Hiene, Flavia Ribeiro, Flavia Angélica, Eliete Von Zuben, Cris Lagnier, Ana Paula, Andrea Monte, Mariana Galeane, Cassia Regina, Mariana Santoro, Taty Maria, Flavio Politi, Emerson Santos, Flavia Chiva, Hilris, Velma, Priscileila, Gustavo Rossanezi, Joiceana, Flavio Pexe, Priscila, José Ricardo, Leticia, Silviani, poder compartilhar com vocês a ciência, além de festas, viagens, congressos, vão ficar marcados pra sempre. Obrigado por trazerem alegria e descontração nos momentos de desespero! Estamos juntos galera!

À minha querida amiga Fátima, que esteve sempre disposta a ajudar, me fortaleceu e encorajou nos momentos de dificuldade, e esteve sempre presente com muito carinho, você é sensacional!

À Olivia, pelos longos papos no cafezinho da tarde, você não imagina o quanto é importante;

Às minhas primas e amigas Paty e Lele, companheiras e sempre incentivadoras, aos meus tios e primos, e a minha querida amiga Cília, pelo carinho que me preenche de força e alegria!

Profa. Dra. Maria Virginia C. Scarpa, co-orientadora deste trabalho, muito obrigado pelas boas idéias, pela dedicação, e pela amizade e carinho que você tem comigo!

Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos e seus alunos Felipe Hilário e Mariana Pacifico, por fornecer os extratos e compostos objetos deste estudo, e pela disposição em ajudar e oferecer informações quando solicitado;

Prof. Dr. Iguatemy L. Brunetti, pela ajuda no desenvolvimento de experimentos e interpretação dos resultados, e pelos momentos divertidos no Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFAr, e as alunas Vânia Ortega e Vanessa Barbosa (bozena) pela ajuda tão importante e pela amizade;

À Profa. Dra. Adélia E. Almeida e Profa. Dra. Márcia da Silva agradeço pela confiança em ceder um espaço para que eu pudesse participar e auxiliar nas aulas de Química Farmacêutica e pela oportunidade de aprender o ofício da docência;

Prof. Dr. Luis Vitor S. Sacramento, Profa. Dra. Ana Dóris de Castro, Profa. Dra. Hérica R. N. Salgado, Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro, Profa. Dra. Eliana A. Varanda, Prof. Dr. Marcos Correa, muito obrigado pela ajuda, por estarem sempre solícitos a esclarecer dúvidas e dar contribuições!

A Dra. Claudia E. Sotomayor, ademas de la gran profesional de investigación, actuo como abogada, psicóloga, enfermera, economista, agente de turismo, etc!!! Gracias por recibirme en tu laboratório y darme la oportunidad de aprender tanto! No hay palabras suficientes para agradecerle;

Às professoras Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro e Dra. Ana Marisa F. Almeida pelas valiosas contribuições para a qualidade deste trabalho; Aos professores Dra. Elfriede M. Bacchi, Dra. Hérica R. N. Salgado, Dr. Marlus Chorilli e Dra. Claudia E. Sotomayor pelas contribuições na defesa de tese;

À Margarete, secretária do Departamento de Ciências Biológicas, por estar sempre disposta a ajudar, sempre com um sorriso simpático e uma risada inconfundível; A Tirene, secretária do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia e a Queila, secretária do Departamento de Fármacos e Medicamentos;

Às técnicas Marisa e Néia, pelo apoio técnico e pelos momentos divertidos durante essa jornada;

À Cláudia, Sonia e Laura, funcionárias da sessão de Pós-graduação, dei muito trabalho pra elas, e sempre me ajudaram muito! Obrigado!

A los eternos amigos del Laboratorio 104 y demas laboratórios del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, Leo Sanches, Javi Peralta, Luciano Pedrotti, David Nocera, Nico Nuñez, Cristian Falcón, Nico Ponce, Magda, Vico, Maria Sol, Soledad, Laura, Euge, Bibi, Gera, Andrea, Paula, Ceci, y todos los otros!!! Fueron momentos inolvidables, muchas gracias amigos, los quiero mucho!

À CAPES pela bolsa de doutorado, bolsa PDEE e auxílios concedidos.

RESUMO

A família Eriocaulaceae apresenta cerca de 1.200 espécies e 11 gêneros, com distribuição pantropical. Suas espécies são conhecidas popularmente como ‘sempre viva’. *Leiothrix spiralis* Ruhland e *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland são espécies de Eriocaulaceae, e estudos químicos tem mostrado predominantemente a presença de xantonas e flavonas, principalmente *O*-glicosídeos e *C*-glicosídeos derivados da luteolina. Propriedades etnofarmacológicas de Eriocaulaceae são pouco conhecidas. Por esta razão, foi avaliado o potencial biológico dos extratos e compostos isolados das espécies *L. spiralis* e *S. nitens*. Os extratos metanólicos de escapos, capítulos e folhas destas espécies e os compostos fenólicos isolados do extrato metanólico de folhas de *L. spiralis* mostraram significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e leveduras, e a capacidade antioxidante pelo ensaio de redução do ABTS^{•+} pode ser observada. Os extratos foram avaliados quanto à capacidade de inibir a formação de hifas de *C. albicans*, sendo verificado que o extrato de escapos de *S. nitens* foi capaz de inibir a fase de transição para a forma filamentosa. As atividades citotóxica e hemolítica dos extratos foram investigadas e o extrato metanólico de folhas de *L. spiralis* apresentou ação citotóxica sobre as células HeLa. O extrato de escapos de *S. nitens* foi incorporado a um creme vaginal e avaliada a atividade antifúngica e mutagênica em um modelo animal de candidíase vaginal. Os resultados mostraram que o tratamento com este produto foi eficaz neste modelo animal, erradicando a carga fúngica vaginal de ratas infectadas após 8 dias de tratamento. A atividade mutagênica foi avaliada pelo teste do micronúcleo, em tratamento agudo e subagudo, e o produto não apresentou mutagenicidade nessas condições. O presente estudo sugere que estas espécies podem ser uma fonte promissora de compostos para aplicação como antifúngico.

Palavras-chave: *Leiothrix spiralis*, *Syngonanthus nitens*, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, citotoxicidade, teste do micronúcleo.

ABSTRACT

Eriocaulaceae is a pantropical family, comprising around 1200 species in 11 genera. Their species are popularly known as 'sempre viva'. *Leiothrix spiralis* Ruhland and *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland are two species of Eriocaulaceae, and chemical studies of these species showed predominantly flavones, mainly *O*-glucosides and *C*-glucosides derivatives of luteolin. The ethnopharmacological properties of Eriocaulaceae are little known. For this reason we evaluate the biological potential of extracts and isolated compounds from *L. spiralis* and *S. nitens*. The methanolic extracts from capitula and flower heads from this species and the phenolics isolated from the methanolic extract of leaves of *L. spiralis* showed significantly antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative organisms and yeasts, and the antioxidant capacity by the ABTS^{•+} reduction assay could be observed. The extracts were evaluated as the ability to inhibit the hyphal formation on *C. albicans* and the extract of flower heads of *S. nitens* was able to inhibit the transition stage from budding to hyphal growth. The cytotoxic and hemolytic activities of the extracts were investigated and the extract of leaves of *L. spiralis* showed cytotoxic action on HeLa cells. A vaginal cream containing the methanolic extract of scapes from *S. nitens* was tested as antifungal and mutagenic in a vaginal candidiasis animal model. The results showed that treatment with this product was very effective in this animal model, and was able eradicate the vaginal fungal burden of infected rats after 8 days on treatment. The *in vivo* mutagenic activity of the vaginal cream was assessed by the micronucleus assay, in acute and subacute treatment, and it was not mutagenic in this conditions. The present study suggests that these Eriocaulaceae species could be a promising source of compounds to produce antifungal phytomedicines.

Key-words: *Leiothrix spiralis*, *Syngonanthus nitens*, antimicrobial activity, antioxidant activity, cytotoxicity, vulvovaginal candidiasis, micronucleus assay.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS – ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)

ABTS^{•+} – radical catiônico ABTS

Anova – Análise de variância

ATCC – *American Type Culture Collection*

CBM – concentração bactericida mínima

CFM – concentração fungicida mínima

CIM – concentração inibitória mínima

CPA – ciclofosfamida

CVV – candidíase vulvovaginal

CVVR – candidíase vulvovaginal recorrente

DMSO – dimetilsulfóxido

DP – desvio padrão

ERO – Espécie reativa de oxigênio

Est – estradiol

FT – flavonoides totais

FV – fluido vaginal

g – força centrífuga gravitacional

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

IDN – índice de divisão nuclear

Inf – infecção

i.p. – intraperitoneal

Lav – lavagem

LDH – lactato desidrogenase

LS – *Leiotrhix spiralis*

MHA – agar Müeller-Hinton

MHC – caldo Müeller-Hinton

MN – micronúcleo

MOPS – ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tertrazólio

NCE – eritrócito normocromático

NCPF – *National Collection of Pathogenic Fungi*

nt – não testado

PBS – tampão fosfato de sódio

p.c. – peso corporal

PCE – eritrócito policromático

PCEMN – eritrócito policromático micronucleado

PVC – cloreto de polivinila

Sac – sacrifício

SBF – soro bovino fetal

s.c. – subcutâneo

SDA – agar Sabouraud dextrose

SDC – caldo Sabouraud dextrose

SN – *Syngonanthus nitens*

TTC – cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Leiothrix spiralis</i> Ruhland	26
Figura 2. <i>Syngonanthus nitens</i> (Bong.) Ruhland	28
Figura 3. Representação esquemática da formação de micronúcleos em eritrócitos em decorrência de dano induzido em células parentais	38
Figura 4. Estruturas químicas dos compostos isolados do extrato metanólico de folhas de <i>L. spiralis</i>	48
Figura 5. Esquema de tratamento do ensaio anti-CVV <i>in vivo</i>	64
Figura 6. Curva analítica do flavonoide luteolina	69
Figura 7. Teor de flavonoides totais nos extratos de <i>L. spiralis</i> e <i>S. nitens</i>	69
Figura 8. IC 50% encontrado pelo teste do ABTS ^{•+} para os extratos e padrões	71
Figura 9. Formação de hifa induzida em <i>C. albicans</i> NCPF 3153 em meio RPMI 1640 suplementado com SBF	77
Figura 10. Inibição da formação de hifas em <i>C. albicans</i> após 12 horas de tratamento	78
Figura 11. Inibição da formação de hifas em <i>C. albicans</i> após 24 horas de tratamento	79
Figura 12. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa	80
Figura 13. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de capítulos de <i>S. nitens</i> sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa	81
Figura 14. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de folhas de <i>L. spiralis</i> sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa	81

Figura 15. Efeito das diferentes concentrações de luteolina sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa	81
Figura 16. Atividade hemolítica dos extratos de <i>S. nitens</i> e <i>L. spiralis</i>	82
Figura 17. Atividade hemolítica de luteolina	83
Figura 18. Índice de viabilidade e liberação de LDH de células infectadas com <i>C. albicans</i> em diferentes proporções	84
Figura 19. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> sobre a viabilidade do sistema células/ <i>C. albicans</i> 10:1, e liberação de LDH de células HeLa neste sistema	84
Figura 20. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> sobre a viabilidade do sistema células/ <i>C. albicans</i> 20:1, e liberação de LDH de células HeLa neste sistema	85
Figura 21. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> sobre a viabilidade do sistema células/ <i>C. albicans</i> 40:1, e liberação de LDH de células HeLa neste sistema	85
Figura 22. Efeito do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> (250 µg/mL) na redução da fase hifal de <i>C. albicans</i>	86
Figura 23. Efeito do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> (250 µg/mL) na inibição da formação de hifas de <i>C. albicans</i> sobre células HeLa infectadas após 24 horas	86
Figura 24. Efeito do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> (250 µg/mL) na redução da fase hifal de <i>C. albicans</i> sobre células HeLa após 24 horas	87
Figura 25. Epitélio vaginal em fase estro	88
Figura 26. Células do epitélio vaginal infectadas.....	89

Figura 27. Efeito do creme vaginal contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> sobre a carga fungica vaginal de ratas infectadas com <i>C. albicans</i> e seus respectivos controles	90
Figura 28. Secção do epitélio vaginal de ratas não infectadas	92
Figura 29. Secção do epitélio vaginal de ratas infectadas e não tratadas	93
Figura 30. Secção de epitélio vaginal de ratas tratadas com creme base (veículo)	94
Figura 31. Secção do epitélio vaginal de ratas tratadas com creme vaginal de miconazol	94
Figura 32. Secção do epitélio vaginal de ratas tratadas com creme vaginal contendo extrato de escapos de <i>S. nitens</i>	95
Figura 33. Eritrócito policromático sem micronúcleo (A); eritrócito policromático micronucleado (B); eritrócito normocromático (C).....	97
Figura 34. Frequência de PCEMNs por 1000 PCEs, obtidos em sangue periférico de ratas Wistar tratadas com creme vaginal contendo diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> e respectivos controles	98
Figura 35. (A) Estrutura geral dos flavonóis; (B) luteolina (dupla ligação entre posições 2,3)	108
Figura 36. Estrutura química do quimioterápico ciclofosfamida	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Codificação utilizada para identificação das substâncias isoladas no ensaio de atividade antimicrobiana.....	49
Tabela 2. Representação da disposição das substâncias analisadas no teste do ABTS ^{•+}	51
Tabela 3. Fórmula percentual da preparação de creme vaginal e função de cada componente	60
Tabela 4. Grupos experimentais e protocolos de tratamento para avaliação da atividade anti-CVV	62
Tabela 5. Grupos experimentais e protocolos de tratamento para avaliação da mutagenicidade	66
Tabela 6. Teor de flavonoides totais (%) nos extratos de <i>L. spiralis</i> e <i>S. nitens</i>	70
Tabela 7. Valores de IC ₅₀ dos extratos e padrões obtidos na avaliação da atividade redutora do ABTS ^{•+}	72
Tabela 8. Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de folhas, escapos e capítulos de <i>L. spiralis</i>	72
Tabela 9. Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de folhas, escapos e capítulos de <i>L. spiralis</i>	73
Tabela 10. Atividade antibacteriana das substâncias isoladas do extrato metanólico de folhas de <i>L. spiralis</i>	73
Tabela 11. Atividade antifúngica dos extratos metanólicos de folhas, escapos e capítulos de <i>L. spiralis</i>	73
Tabela 12. Atividade antifúngica dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de <i>S. nitens</i>	74

Tabela 13. Atividade antifúngica das substâncias isoladas do extrato metanólico de folhas de <i>L. spiralis</i>	74
Tabela 14. Concentração bactericida mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/ml}$) dos compostos isolados do extrato metanólico de folhas de <i>L. spiralis</i>	75
Tabela 15. Concentração bactericida mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/ml}$) dos extratos de <i>L. spiralis</i> e <i>S. nitens</i>	75
Tabela 16. Atividade antifúngica do extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> e respectivos valores de CIM obtidos sobre <i>C. albicans</i> NCPF 3152 e diferentes cepas de origem clínica .	76
Tabela 17. Controle microbiológico do creme vaginal contendo extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i>	87
Tabela 18. Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica obtidos nos animais tratados com creme vaginal contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> e seus respectivos controles	90
Tabela 19. Análise da média inicial e média final do peso corporal e ganho de peso após 8 dias de tratamento dos animais tratados com creme contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i> e respectivos controles	91
Tabela 20. Somatória do número de PCEMNs e IDN em sangue periférico de ratas Wistar submetidas a tratamento agudo e subagudo com creme contendo extrato de escapos de <i>S. nitens</i> em diferentes concentrações e seus respectivos controles	97
Tabela 21. Frequências de PCEMNs e IDN em sangue periférico de ratas Wistar submetidas a tratamento agudo e subagudo com creme contendo extrato de escapos de <i>S. nitens</i> em diferentes concentrações e seus respectivos controles	98

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 – Família Eriocaulaceae	25
2.1.1 – Genero <i>Leiothrix</i>	25
2.1.2 – Gênero <i>Syngonanthus</i>	27
2.2 – Atividade antimicrobiana.....	28
2.3 – Antioxidantes naturais	29
2.4 – Atividade citotóxica e hemolítica	31
2.5 – Candidíase vulvovaginal.....	33
2.6 – Avaliação da atividade anti-CVV <i>in vivo</i>	35
2.7 – Teste do micronúcleo em sangue periférico	37
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 – Materiais	43
4.1.1 – Solventes, reagentes e meios de cultura.....	43
4.1.2 – Equipamentos.....	44
4.1.3 – Material vegetal.....	45
4.1.4 – Micro-organismos e linhagem celular.....	45
4.1.5 – Laboratórios	46
4.2 – Métodos.....	47
4.2.1 – Coleta e identificação do material vegetal e obtenção dos extratos.....	47
4.2.1.1 – Compostos isolados.....	48
4.2.2 – Quantificação de flavonoides totais	49
4.2.2.1 – Curva analítica para quantificação de flavonoides totais	49
4.2.2.2 – Determinação do teor de flavonoides totais.....	50
4.2.3 – Avaliação da atividade antioxidante	50

4.2.4 – Avaliação da atividade antibacteriana.....	51
4.2.4.1 – Padronização da suspensão bacteriana	51
4.2.4.2 – Determinação da concentração inibitória mínima	51
4.2.4.3 – Determinação da concentração bactericida mínima	52
4.2.5 – Avaliação da atividade antifúngica	53
4.2.5.1 – Padronização da suspensão fúngica.....	53
4.2.5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima	53
4.2.5.3 – Determinação da concentração fungicida mínima.....	54
4.2.5.4 – Efeitos sobre a formação de hifa.....	54
4.2.6 – Avaliação da citotoxicidade	55
4.2.6.1 – Determinação da viabilidade celular pelo teste do MTT.....	55
4.2.6.2 – Determinação da liberação de LDH	56
4.2.6.3 – Atividade hemolítica.....	57
4.2.7 – Determinação da inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> em células infectadas, pelo extrato metanólico de escapos de <i>S. nitens</i>	58
4.2.8 – Efeito do extrato de escapos de <i>S. nitens</i> sobre a formação de hifa em células infectadas por <i>C. albicans</i>	59
4.2.9 – Preparo do creme vaginal.....	60
4.2.9.1 – Controle microbiológico do creme vaginal	60
4.2.10 – Atividade anti-CVV <i>in vivo</i>	61
4.2.10.1 – Animais.....	61
4.2.10.2 – Grupos experimentais	62
4.2.10.3 – Estabelecimento de imunossupressão	62
4.2.10.4 – Indução de estado pseudo-estro	63
4.2.10.5 – Padronização da suspensão do inóculo para infecção	63
4.2.10.6 – Infecção vaginal e monitoramento da infecção	63
4.2.10.7 – Tratamento	64
4.2.10.8 – Análise estatística	64
4.2.11 – Avaliação da mutagenicidade	65
4.2.11.1 – Tratamentos	65
4.2.11.2 – Sistema-teste: micronúcleos de sangue periférico	66
4.2.11.3 – Análise das lâminas	66
4.2.11.4 – Análise estatística	67

5. RESULTADOS	68
5.1 – Quantificação de flavonoides totais	69
5.2 – Atividade antioxidante	70
5.3 – Atividade antimicrobiana	72
5.3.1 – Efeito sobre a formação de hifa	76
5.4 – Avaliação da citotoxicidade	80
5.5 – Determinação da ação do extrato de escapos de <i>S. nitens</i> sobre a inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> em células infectadas	83
5.6 – Controle microbiológico do creme vaginal	87
5.7 – Atividade anti-CVV <i>in vivo</i>	88
5.8 – Avaliação da mutagenicidade	96
 6. DISCUSSÃO	 99
 7. CONCLUSÃO	 120
 8. REFERÊNCIAS	 123
 9. ANEXOS	 145

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana e, por um longo período, minerais, produtos vegetais e animais foram as principais fontes de substâncias ativas. Durante milênios, o homem, empiricamente, aprofundou seus conhecimentos visando à melhoria nas condições de alimentação e a cura de suas enfermidades, demonstrando uma estreita inter-relação entre o uso das plantas e sua evolução (Rates, 2001).

No Brasil, a utilização de produtos naturais vem desde o descobrimento. Os colonizadores tinham interesse em especiarias aqui existentes, o que desde então se percebeu uma grande variedade de riquezas naturais que poderiam ser exploradas. O conhecimento dos povos indígenas e a ampla vegetação foram fatores fundamentais para o descobrimento de diversas plantas com atividade terapêutica (Ribeiro & Walter, 1998). Em toda a sua extensão, o Brasil apresenta uma flora bastante diversificada, com vegetações de diferentes características e com muitos princípios ativos ainda desconhecidos (Napolitano et al., 2005). No âmbito dessa extensão continental, abrange desde regiões equatoriais ao norte até áreas extratropicais ao sul, diferenciadas climática e geomorfologicamente, com uma extraordinária diversidade ecológica. A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tal sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos (Simões et al., 2004).

No início do século XIX, com o desenvolvimento da química medicinal, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (Hostettmann et al., 2003). Com a Revolução Industrial, o desenvolvimento da química orgânica resultou em uma preferência para os produtos sintéticos para o tratamento farmacológico. As razões para isso foram que compostos puros eram obtidos facilmente,

modificações estruturais poderiam ser de fácil realização para produzir compostos potencialmente mais ativos e mais seguros e a potência econômica da indústria farmacêutica estava crescendo (Rates, 2001). Os progressos da química de síntese e as perturbações introduzidas por sucessivas guerras levaram a certo esquecimento dos produtos vegetais, em consequência da escassez de matérias-primas e das crescentes exigências impostas nos últimos tempos ao estudo de novos fármacos, a que os produtos de origem vegetal têm, com frequência, dificuldade de responder. Porém, as plantas têm sido uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (Simões et al., 2004). As plantas possuem uma ilimitada habilidade para sintetizar metabólitos secundários, sendo estes uma grande fonte de possíveis fármacos devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas (Hostettmann et al., 2003). Essas substâncias são derivadas de processos de biotransformação de macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos) e cujos produtos garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie e revelam uma gama quase que inesgotável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Simões et al., 2004). Nesse sentido, a busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes propriedades biológicas e grande interesse farmacêutico.

Revisão de literatura

2. Revisão de Literatura

2.1 Família Eriocaulaceae

A família Eriocaulaceae apresenta 11 gêneros e cerca de 1.200 espécies, com distribuição pantropical (Giulietti & Hensold, 1991; Sano, 2004). Habitam predominantemente regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, sendo o seu maior centro de diversidade genética a região tropical da América do Sul, especialmente o Brasil. Espécies desta família são amplamente distribuídas nos campos rupestres brasileiros, principalmente na Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais e Bahia), onde se encontra o principal centro de diversidade genética de Eriocaulaceae. São conhecidas popularmente como “sempre-vivas”, caracterizadas principalmente pela alta durabilidade após a colheita. Mais de 90% das espécies pertencem aos gêneros *Syngonanthus* Ruhl., *Eriocaulon* L. e *Paepalanthus* Mart. (Splett et al., 1993), sendo este último o maior gênero da família, com ampla variabilidade morfológica (Scatena & Moraes, 1996).

2.1.1 Gênero *Leiothrix*

Leiothrix é um nome de origem grega que significa pelo liso, o que diferenciaria as espécies deste gênero das demais espécies (Giulietti et al., 1987). *Leiothrix* Ruhland é um gênero exclusivo da América do Sul, com 37 espécies restritas ao Brasil. *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland ocorre no Brasil, Venezuela e Peru. *L. celiae* ocorre somente na Venezuela. As outras espécies são endêmicas em áreas de Minas Gerais e Bahia. Minas Gerais é o centro de diversidade, com 30 espécies (Giulietti et al., 1995). Existem na literatura poucos estudos químicos realizados com plantas deste gênero. As informações

químicas existentes, aliadas aos estudos botânicos, suportam até o presente momento que o gênero *Leiothrix* seja considerado grupo-irmão de *Syngonanthus* (Silva et al., 2009a).

Leiothrix spiralis Ruhland (Figura 1), pertencente ao subg. *Stephanophyllus*, é uma espécie pseudovivípara, endêmica no Estado de Minas Gerais, sendo uma planta policárpica, com reprodução anual (Coelho et al., 2005).

Quanto à química deste gênero, Dokkedal & Salatino (1992) investigaram a presença de flavonas *O*- e *C*-glicosiladas em seis espécies do gênero *Leiothrix*. Com esse trabalho, os autores concluíram que o gênero *Leiothrix* pode ser distinguido de outros gêneros, como *Eriocaulon* e *Syngonanthus*, devido à presença de flavonas *O*-glicosiladas em espécies de *Leiothrix*. Além de flavonas, Santos et al. (2003) isolaram e identificaram xantonas em espécies de *Leiothrix* e Silva et al. (2009b) identificaram derivados de rutina e apigenina na espécie *L. spiralis*.



Fonte: Lourdes C. Santos

Figura 1. *Leiothrix spiralis* Ruhland

2.1.2 Gênero *Syngonanthus*

O gênero *Syngonanthus* inclui aproximadamente 200 espécies, distribuídas nas Américas e África. O maior número encontra-se na América do Sul, principalmente no Brasil, nos estados de Minas Gerais e Bahia, com aproximadamente 180 espécies. A espécie *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (Figura 2) é conhecida como “Capim dourado”. Seus escapos são utilizados como matéria-prima na confecção de peças ornamentais como brincos e bolsas, que são exportadas para os EUA e países da Europa (Pacífico et al., 2011).

Quanto à química do gênero, 25 espécies representativas já foram estudadas, e nelas foram identificadas grandes quantidades de flavonas, com predominância de *O*-glicosídeos e *C*-glicosídeos derivados da luteolina, e com menor frequência *O*-glicosídeos derivados da apigenina (Ricci et al., 1996). Ricci et al. (1996) realizaram estudos taxonômicos de 13 espécies de *Syngonanthus*, comprovando a presença de 24 flavonas, sobretudo derivados 7-*O*-glicosilados da luteolina e 6-hidroxiluteolina, além de *O*-glicosídeos da apigenina. Recentemente, Pacífico et al. (2011) identificaram 17 compostos, entre flavonas e xantonas, incluindo 6 novas moléculas, em extratos de *S. nitens*.



Fonte: jalapao.to.gov.br/capim-dourado

Figura 2. *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland

2.2 Atividade antimicrobiana

As substâncias antimicrobianas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progresso sem limites dentro da terapêutica medicamentosa. Este grupo de medicamentos condiciona, de forma efetiva, o efeito de espécies microbianas patogênicas e oportunistas responsáveis pelas mais variadas patologias que tanto provocaram e provocam a incapacidade prolongada ou óbito de seres humanos. Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos (Cowan, 1999; Yunes & Calixto, 2001).

A investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos vegetais é um item relevante na caracterização biológica de extratos vegetais, visto que as plantas produzem um vasto número de substâncias com potencial antimicrobiano na tentativa de adaptarem-se

às agressões do meio ambiente (Das et al., 2010). Além disso, a busca de novos agentes antimicrobianos é importante, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, tornado ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (Trias & Gordon, 1997; Penna et al., 2001).

O uso de extratos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana pode adquirir significado nos tratamentos terapêuticos. Muitas espécies vegetais têm sido usadas, pelas características antimicrobianas, apresentadas pelos compostos sintetizados do metabolismo secundário da planta, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte os flavonoides e os taninos (Cushnie & Lamb, 2005; Mbaveng et al., 2008).

Vários métodos podem ser utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos de triagem de novas substâncias ativas, tais como a técnica de difusão em agar, métodos de diluição em caldo em tubos e/ou microplacas, bioautografia etc. Tais técnicas permitem a análise de vários compostos e diferentes espécies bacterianas concomitantemente (Eloff et al., 1998; Langfield et al., 2004).

2.3 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes são os compostos que inibem ou retardam a oxidação de outras moléculas, inibindo a iniciação ou a propagação de reações de oxidação. Compostos fenólicos são antioxidantes primários que agem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia. Eles estão largamente distribuídos na natureza e dentre eles destacam os derivados dos ácidos benzoico e cinâmico, bem como de flavonoides (Heim et al., 2002; Luo et al., 2011). Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série

de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite e doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativa denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs).

Os processos de oxidação de substâncias orgânicas são uma das principais causas da redução da vida de prateleira dos produtos industrializados bem como das matérias-primas em geral (Burns, 2001; Heim et al., 2002). A preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem limitar o fenômeno de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem dos produtos (Silva et al., 1999). Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de formulações farmacêuticas, são empregados compostos químicos com ação antioxidante. O uso de antioxidantes na indústria e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados (Ramalho & Jorge, 2006). Os produtos farmacêuticos e cosméticos devem ser estáveis durante as etapas de produção, envasamento, estocagem, comercialização, distribuição e utilização pelo consumidor, de forma segura e estável (Lachman et al., 2001). Deste conjunto de ações, a adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática corrente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante.

Na seleção de antioxidantes naturais, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do produto; compatibilidade com o produto e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento e ausência de toxicidade. Além disso, na escolha de um antioxidante devem-se considerar também outros fatores, incluindo legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (Ramalho & Jorge, 2006). As plantas produzem muitos metabólitos que atuam como antioxidantes para o controle do estresse oxidativo, causado pela incidência da luz solar e oxigênio. Esses metabólitos representam uma fonte promissora de novos compostos com atividade

antioxidante, e muitos estudos já foram realizados com o objetivo de identificar antioxidantes naturais com baixa toxicidade (Scartezzini & Speroni, 2000).

Muitas metodologias estão disponíveis para avaliação da ação antioxidante de novas substâncias, de forma quantitativa dos seus efeitos reais no tratamento ou prevenção de reações de oxidação. Um método para avaliar a atividade antioxidante é descrito como o ensaio de descolorização através da redução do radical catiônico ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)), e aplicável em antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, incluindo flavonoides, hidroxycinamatos e carotenoides. O $ABTS^{\bullet+}$ (radical catiônico ABTS) é gerado por oxidação de ABTS com persulfato de potássio e é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. Os resultados são expressos em porcentagem de inibição de $ABTS^{\bullet+}$ e determinada em função da concentração de antioxidante e o tempo de reação e calculado em relação à substância padrão avaliada sobre as mesmas condições (Re et al., 1999).

2.4 Atividade citotóxica e hemolítica

Estudos de citotoxicidade *in vitro* podem ser utilizados para avaliar a toxicidade em células humanas em triagem de produtos químicos e farmacêuticos (Clemedson & Ekwall, 1999; Scheers et al., 2001; Weyermann et al., 2005; Fotakis & Timbrell, 2006). Ensaio de citotoxicidade são amplamente utilizados em estudos de toxicologia *in vitro*. O ensaio de produção de LDH (lactato desidrogenase) e o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) estão entre os mais comuns empregados para a detecção de citotoxicidade ou viabilidade celular após a exposição a substâncias tóxicas. O ensaio de liberação de LDH é baseado na medida da atividade da enzima lactato desidrogenase no meio extracelular. A presença de LDH intracelular em um meio de cultura é um indicador de morte celular irreversível, devido a danos na membrana celular (Fotakis & Timbrell, 2006). O MTT

é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido em sais de formazan insolúvel por clivagem do anel de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase dentro da mitocôndria. O produto formazan é impermeável à membrana das células e, portanto, se acumula nas células saudáveis. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT (Weyermann et al., 2005; Fotakis & Timbrell, 2006).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como: limitam o número de variáveis experimentais, permitem obter dados estatisticamente significativos, são realizados em períodos de tempo mais curtos e sinalizam a presença de extrema citotoxicidade, evitando o sacrifício desnecessário de animais experimentais. Estudos como estes demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução de estudos (Rogerio et al., 2003).

A toxicidade *in vitro* de extratos vegetais sobre a membrana de glóbulos vermelhos têm sido estudada ao longo do tempo e está correlacionada com seus constituintes. Diversos estudos indicam que determinados compostos presentes em plantas, como alguns polifenóis, glicosídeos, saponinas e triterpenoides podem promover alterações na membrana de células sanguíneas e conseqüentemente produzirem hemoaglutinação (Silva et al., 2009b). A estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador de danos provocados por estes compostos. O potencial em causar lesões na membrana plasmática dos eritrócitos está relacionado à formação de poros ou à ruptura total da célula impossibilitando o transporte das substâncias, além de causar lesões que comprometem a saúde geral do paciente (Bukowska & Kowalska, 2004; Silva et al., 2009b; Mukherjee & Rajasekaran, 2010).

2.5 Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal (CVV) é caracterizada por apresentar inflamação verdadeira de vulva e vagina, causada por fungos leveduriformes, a maioria deles pertencentes ao gênero *Candida* (Sobel et al., 1998; Ziarrusta, 2002). O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, trato geniturinário e intestinal (Reed et al., 2000). A espécie *C. albicans* é a levedura mais importante no trato genital feminino e o principal agente causador de CVV. Estima-se que 80 a 90% dos casos de CVV são devidos a *C. albicans* e 10% a 20%, a outras espécies chamadas não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae*) (Sobel et al., 1998, Consolaro et al., 2004).

Mulheres normalmente saudáveis e completamente assintomáticas apresentam culturas de secreção vaginal positivas para essa levedura, o que indica a importância da colonização vaginal prévia para o desenvolvimento da infecção (Sobel et al., 1998). Essa infecção caracteriza-se por apresentar prurido, ardor, dispareunia e pela eliminação de corrimento vaginal em grumos. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura. As lesões podem se estender pelo períneo, região perianal e inguinal. O corrimento, que geralmente é branco e espesso, é inodoro e, quando depositado nas vestes a seco, tem aspecto farináceo. Em casos típicos, nas paredes vaginais e no colo uterino aparecem pequenos pontos branco-amarelados. Os sintomas intensificam-se no período pré-menstrual, quando a acidez vaginal aumenta (Álvares et al., 2007). Aproximadamente 5% das mulheres com CVV desenvolvem candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), definida usualmente como a ocorrência de quatro ou mais episódios de CVV no período de 12 meses (Marrazzo, 2003). Ao contrário das mulheres que têm episódios esporádicos de CVV, aquelas

com a doença recorrente não se beneficiam de uma diminuição na frequência de episódios sintomáticos com o passar da idade (Patel et al., 2004). Segundo Carrara et al. (2010) ultimamente os casos de CVV aumentaram acentuadamente, cerca de 25%, e CVV encontra-se em segundo lugar entre infecções vaginais, superada apenas pela vaginose bacteriana.

C. albicans é um fungo que se reproduz por brotação polimórfica e normalmente reside como um comensal em tecidos de mucosa em cerca de metade da população humana. Quando o equilíbrio da flora normal é interrompido ou as defesas imunes são comprometidas, espécies de *Candida* podem tornar-se patogênicas, muitas vezes causando recidiva da doença em indivíduos susceptíveis. Esse desequilíbrio está associado a fatores de risco tais como neutropenia, hemodiálise, cirurgias, uso indiscriminado de antibióticos, anticoncepcionais e corticoides, queimaduras, quimioterapia, diabetes e síndromes de imunodeficiências como AIDS (Pappas, 2006; Spellberg et al., 2006; Perlroth et al., 2007).

Muitas das espécies não-*albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral (Crocco et al., 2004). Estudos descrevem a emergência de cepas menos susceptíveis aos antifúngicos comumente utilizados (Mondello et al., 2003; Mondello et al., 2006).

Apesar dos avanços nas terapias antifúngicas, ainda existem muitos problemas relacionados aos fármacos disponíveis. Por exemplo, o uso de azólicos, como fluconazol, cetoconazol e miconazol, resultou em cepas clinicamente menos suscetíveis de *Candida* sp. (Sobel et al., 2003; Sojakova et al., 2004). O uso de anfotericina B é limitado por causa de suas reações relacionadas à nefrotoxicidade (Fanos & Cataldi, 2000). Esta situação evidencia a necessidade de estudos de novos compostos antifúngicos mais seguros e eficazes.

Aliado a importância desta infecção e a ocorrência de cepas menos sensíveis aos antifúngicos usuais, torna-se relevante a pesquisa de novas substâncias com atividade anti-*Candida*.

2.6 Avaliação da atividade anti-CVV *in vivo*

Uma série de modelos clinicamente relevantes de candidíase sistêmica e de mucosa em roedores foi estabelecida, predominantemente para estudar interações patógeno-hospedeiro, eficácia e farmacocinética de fármacos antifúngicos, e vacinas. Modelos experimentais *in vivo* de CVV têm sido extremamente úteis na identificação de fatores sobre a influência hormonal na infecção, a virulência das leveduras, a susceptibilidade e o tratamento da infecção (Repentigny, 2004).

Ao contrário dos seres humanos, *C. albicans* não é um colonizador natural de superfícies de mucosas de roedores e necessitam ser experimentalmente infectados. Isto tem tanto vantagens quanto limitações. A vantagem é que qualquer resposta do hospedeiro a *C. albicans* não é afetado por respostas imunes inatas ou adaptativas pré-existentes ao fungo, porém o estabelecimento de colonização ou infecção na mucosa (oral, gastrintestinal, vaginal) geralmente requer o uso de imunossupressores, antibióticos ou tratamento com estrógeno, ou a utilização de animais germ-free ou transgênicos (Samaranayake & Samaranayake, 2001; Repentigny, 2004).

Embora outras espécies, incluindo coelhos e macacos, já tenham sido descritas (Walsh et al., 1988; Steele et al., 1999; Letterio et al., 2001), modelos de roedores de CVV possuem mais vantagens em relação à escala econômica, à rápida disponibilidade de material para análises, e à rápida habilidade de gerar resposta (Repentigny, 2004).

Os roedores têm um ciclo estral regular (proestro, estro, metaestro e diestro) com alterações morfológicas nos ovários, útero e vagina que são semelhantes aos dos seres

humanos. O ciclo estral dura de 4-6 dias (Carrara et al., 2010). Microscopicamente, um esfregaço proestro mostra predominantemente células epiteliais nucleadas; a fase estro consiste de células cornificadas anucleadas; a metaestro tem a mesma proporção de leucócitos e células epiteliais nucleadas e anucleadas; e a diestro mostra predominantemente leucócitos. Modelos de roedores para CVV são altamente dependentes de um prolongado estado de pseudo-estro, que é usualmente induzido e mantido com administração de estradiol. Os níveis de estrógeno parecem ser o principal fator que afeta a susceptibilidade das ratas a *C. albicans*. Alguns autores descrevem o uso de ratas ovariectomizadas para obter um estado pseudo-estro (De Bernardis et al., 2000; Mondello et al., 2003; Tavanti et al., 2010). Em estudo recente, Carrara et al. (2010) compararam a resposta a infecção em ratas ovariectomizadas e não-ovariectomizadas e tratadas com estradiol, revelando que a obtenção do estado pseudo-estro pode ser conseguido apenas com administração de estradiol, sem a necessidade de usar outras técnicas mais demoradas e de alto custo. Outros modelos de CVV sem ovariectomia ou o uso de estrogênio foram desenvolvidos e estão baseados em imunossupressão (Naglik et al., 2008; Dhawan et al., 2009). Um modelo recentemente desenvolvido foi de CVV em ratas diabéticas (Carrara et al., 2009). Diabetes mellitus descontrolado promove aumento dos níveis de glicogênio, alterações metabólicas e diminuição do pH vaginal, que favorece a colonização e infecção por *C. albicans* (Fidel Jr. et al., 1996; Carrara et al., 2009).

Um modelo animal de CVV experimental ideal não só deve reproduzir o mais fielmente possível o processo de colonização e invasão em uma porta de entrada anatômica específica, mas também devem corresponder estreitamente a defeitos imunes específicos ou condições hormonais associadas com a infecção em um determinado local. A infecção experimental deve ser suficientemente prolongada para revelar sequencialmente a participação de atributos de virulência de *Candida* e o recrutamento de defesas do hospedeiro (Naglik et al., 2008).

2.7 Teste do micronúcleo em sangue periférico

O teste do micronúcleo, usando células de mamíferos, é amplamente utilizado para verificar a genotoxicidade de agentes químicos. Este teste é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado (Ribeiro et al., 2003). Através deste teste é possível a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Os micronúcleos, um ou vários por célula, resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula durante a anáfase (MacGregor et al., 1980).

Na medula óssea, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos, dividindo-se e diferenciando-se em eritrócitos policromáticos. Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se forma em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula (Figura 3). Os micronúcleos podem também ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo. Nesta situação, o micronúcleo irá conter o centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando-se sondas específicas (Yamamoto et al., 1980; Hayashi et al., 2000).

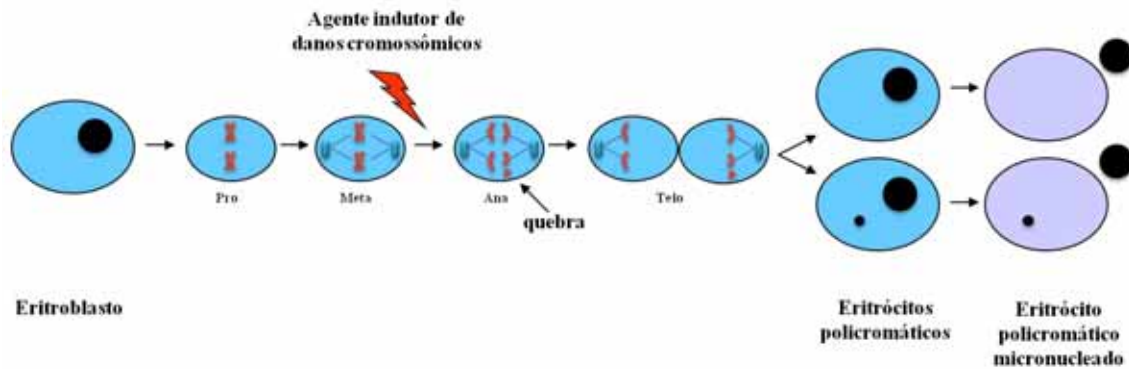


Figura 3. Representação esquemática da formação de micronúcleos em eritrócitos em decorrência de dano induzido em células parentais

Os micronúcleos são analisados em eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, transformando-se então em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (RNA - positivo), e coram-se em azul-violeta. Ao se contar os micronúcleos apenas neste tipo de célula, sabe-se que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação de eritrócito policromático é de 8 a 12 horas, os micronúcleos encontrados foram induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, ou seja, entre 10 a 24 horas (Yamamoto et al., 1980).

A frequência de micronúcleos induzida em eritrócitos policromáticos é dependente do tempo de amostragem (Hayashi et al., 2000; Senedese et al., 2008). MacGregor et al. (1980) relataram a existência de um estado de constante frequência de micronúcleos depois de repetidos regimes de dose diária e sugeriram a integração dos estudos de micronúcleos com a rotina de estudos fármaco-toxicológicos. Garriott et al. (1995) confirmaram que o teste do micronúcleo para a identificação de compostos genotóxicos pode

ser integrado com outros estudos de rotina. Esta abordagem resulta em uma redução do número de animais utilizados, além de menor tempo e economia em ambos os experimentos.

Segundo Abramsson-Zetterberg et al. (1999), uma vez que ratos são usados como modelo animal convencional em estudos farmacológicos e toxicológicos, a aplicação paralela do teste do micronúcleo pode ser vantajosa, como uma indicação do efeito genotóxico. No caso de exposição prolongada de ratos, várias amostras de sangue periférico para o teste do micronúcleo podem ser obtidas a partir do mesmo animal. Na análise de micronúcleos no sangue periférico, amostras de sangue podem ser obtidas em vários momentos ao longo do experimento, fornecendo informações complementares importantes em relação ao tempo decorrido desde a indução de micronúcleos (Senedese et al., 2008).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que alguns constituintes químicos de plantas podem ser efetivos clínica e farmacologicamente, mas não são necessariamente livres de toxicidade. Sendo assim, a investigação dos efeitos mutagênicos de extratos de plantas com potencial terapêutico pode fornecer informação quanto ao potencial quimioterapêutico bem como para a medida de segurança de seu uso (Shahrim et al., 2006).

Objetivos

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Em face do proeminente potencial farmacológico contido em espécies de Eriocaulaceae, este trabalho teve como objetivo a caracterização do potencial biológico de extratos metanólicos de folhas, escapos e capítulos de *L. spiralis* e escapos e capítulos de *S. nitens*, visto que poucos são os estudos biológicos destas espécies.

Objetivos específicos

- Avaliar o teor de flavonoides totais nos extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica;
- Avaliar o efeito dos extratos sobre a formação de hifas em *C. albicans*;
- Avaliar a citotoxicidade e atividade hemolítica;

Em decorrência dos resultados obtidos nestes ensaios:

- Avaliar a efetividade antifúngica do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* sobre um sistema celular infectado com *C. albicans*;
- Incorporar o extrato metanólico de escapos de *S. nitens* em formulação para uso intravaginal e avaliar a atividade antifúngica da formulação *in vivo* frente à modelo experimental de CVV;
- Avaliar o possível efeito mutagênico do extrato de escapos de *S. nitens* em ratas, veiculado em creme e administrado intravaginalmente.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

- 17- β estradiol - Sigma-Aldrich[®]
- ABTS
- ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico (MOPS) – Acros Organics[®]
- álcool cetoestearílico monoestearato de sorbitano polioxietileno – Polawax – Croda[®]
- anfotericina B – Sigma-Aldrich[®]
- carbonato de sódio – Merck[®]
- ciprofloxacino
- cloreto de alumínio – Labsynth[®]
- cloreto de potássio – Labsynth[®]
- cloreto de sódio – Merck[®]
- cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) - Merck[®]
- dimetilsulfóxido (DMSO) – Labsynth[®]
- etanol – Merck[®]
- gentamicina
- glicerina – Labsynth[®]
- fosfato de sódio dibásico – Merck[®]
- fosfato de potássio monobásico – Reagen[®]
- fluconazol – Sigma Aldrich[®]
- hidróxido de sódio – Labsynth, Sigma Aldrich[®]

- hipoclorito de sódio – Cuccaro & Cia[®]
- luteolina – Sigma-Aldrich[®]
- meio RPMI-1640 – Sigma-Aldrich[®]
- miconazol
- MTT – Sigma-Aldrich[®]
- Mueller-Hinton agar – BD[®]
- Mueller-Hinton caldo – Difco[®]
- Óleo mineral
- Propilenoglicol
- quercetina – Vetec[®]
- resazurina – Sigma-Aldrich[®]
- RPMI 1640 – Gibco[®]
- Sabouraud dextrose agar – Acumedia[®]
- Sabouraud dextrose caldo – Acumedia[®]
- Soro bovino fetal – Gibco[®]
- tripsina-EDTA – Sigma Aldrich[®]
- Triton X-100 – Sigma Aldrich[®]

4.1.2 Equipamentos

- Autoclave vertical – Phoenix[®]
- Balança analítica – Shimadzu[®]
- Banho de aquecimento – Fanen[®]
- Bomba de vácuo – Motores Elétricos Brasil[®]
- Câmara de fluxo laminar – Veco[®]

- Câmara de Neubauer – Kirschmann EM[®]
- Centrífuga refrigerada 5810 com rotor para microplacas – Eppendorf[®]
- Espectrofotômetro – Pharmacia[®]
- Espectrofotômetro – ThermoSpectronic BioMate 5
- Estufa de incubação bacteriológica – Fanem[®]
- Estufa de incubação CO₂ – Thermo Electron Corporation Forma Series II Hepa Class 100
- Leitor de microplacas – Termoplate[®]
- LDH-P UV AA, Wiener lab[®]
- Microscópio – Olympus CH20[®]
- Microscópio de luz invertida – Nikon TE 2000-U Eclipse[®]
- Peagômetro – Marconi[®]
- Placas de 96 poços – flat bottom – TPP, Costar[®]
- Placas de petri descartáveis – Prolab[®]
- Ultrassom – Thornton[®]
- Vórtex – Vision[®] KMC 1300 V

4.1.3 Material vegetal

Foram utilizados extratos metanólicos de folhas, escapos e capítulos de *Leiothrix spiralis* e extratos metanólicos de escapos e capítulos de *Syngonanthus nitens*.

4.1.4 Micro-organismos, linhagem celular e animais

Para os ensaios microbiológicos foram utilizadas cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e NCPF (*National Collection of Pathogenic Fungi*): *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923); *Bacillus subtilis* (ATCC 19659); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella setubal* (ATCC 19196); *Candida albicans* (ATCC 18804); *Candida albicans* (NCPF 3153); *Candida krusei* (ATCC 6258); *Candida parapsilosis* (ATCC 22019); *Candida tropicalis* (ATCC 750). Além das cepas padrões, foram também utilizados 14 isolados clínicos de *C. albicans*, fornecidos pela Seção de Microbiologia do Hospital Aeronáutico de Córdoba (Córdoba, Argentina), isolados de pacientes com candidíase vaginal no período de maio a julho de 2010. Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células HeLa ATCC CCL-2 (células de adenocarcinoma de cérvix humano). Os ensaios *in vivo* foram realizados utilizando ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar.

4.1.5 Laboratórios

Os ensaios realizados neste trabalho foram desenvolvidos nos seguintes laboratórios: Laboratório de Fisiologia dos Micro-organismos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Ensaio de atividade antimicrobiana), sob orientação da Profa. Dra. Taís M. Bauab; Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Quantificação de flavonoides totais e Controle microbiológico do creme vaginal) sob supervisão da Profa. Dra. Maria Virgínia C. Scarpa; Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Atividade antioxidante) sob supervisão do Prof. Dr. Iguatemy L. Brunetti; Laboratório de Imunologia do Departamento de Bioquímica Clínica da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Nacional de Córdoba (Atividade antimicrobiana sobre isolados clínicos de *C. albicans*, Ensaio sobre formação de hifa, Citotoxicidade, Atividade hemolítica, Atividade anti-CVV *in vivo*, Avaliação da

mutagenicidade), sob supervisão da Profa. Dra. Cláudia E. Sotomayor; Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP (Estudo histopatológico) sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa.

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta, identificação do material vegetal e obtenção dos extratos

O material vegetal utilizado neste estudo (extratos e substâncias isoladas) foi fornecido pelo Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP Araraquara, sob responsabilidade da Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.

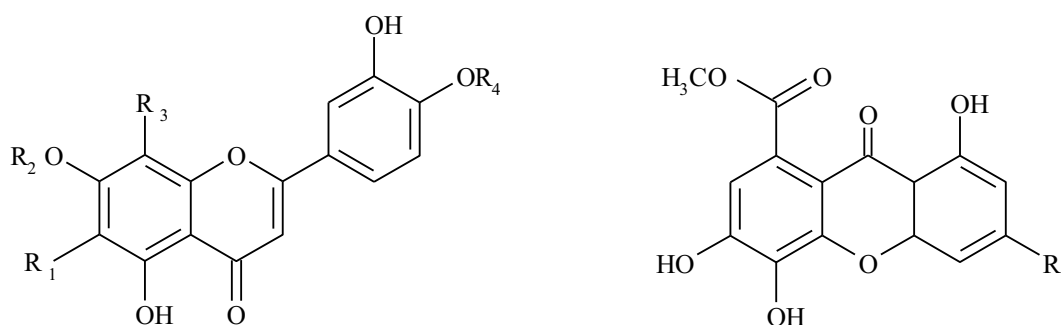
As partes aéreas de *L. spiralis* foram coletadas no mês de maio de 2006, em Santana do Riacho (Serra do Cipó) (MG), e de *S. nitens* foram coletadas no mês de janeiro de 2008, na região de Diamantina (MG). As espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) e as exsiccatas estão depositadas no herbário no IB-USP sob os números SANO 4798 e SANO 3895, respectivamente.

Para preparação dos extratos, o material vegetal foi previamente seco em estufa com circulação de ar a 40°C, por 48 horas, sendo esporadicamente revirados. Após secagem, foram separados em capítulos, escapos e folhas e posteriormente triturados em moinho de facas para realização do processo de extração. Cada parte foi extraída sequencialmente por percolação com solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, diclorometano e metanol, respectivamente). Em seguida, as misturas foram filtradas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, a temperatura de 45°C. Os extratos foram transferidos para recipientes de vidro e mantidos em capela de exaustão até completa eliminação dos

solventes (Prista et al., 1995). Os extratos metanólicos das folhas, escapos e capítulos de *L. spiralis* e os extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens* foram selecionados para este estudo.

4.2.1.1 Compostos isolados

A partir do extrato metanólico de folhas de *L. spiralis* foram isolados os compostos apresentados na Figura 4. Estes compostos foram fornecidos pelo Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, que realizou o isolamento e identificação das substâncias, sob responsabilidade da Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos.



	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(1) -	-	C-Glc	H	H	H
(2) -	-	C-Glc	OCH ₃	H	H
(3) -	-	H	OCH ₃	C-Glc	H
(4) -	-	C-Glc	H	H	OCH ₃
(5) -	-	OH	OCH ₃	H	H
(6) -	OH	-	-	-	-
(7) -	OCH ₃	-	-	-	-

Figura 4. Estruturas químicas dos compostos isolados do extrato metanólico de folhas de *L. spiralis*

Dentre as substâncias apresentadas na Figura 4, as de números (5) e (6) (flavona e xantona), e as de números (2) e (3) (flavonas) foram identificadas reunidas em uma mesma fração (Fração (5)+(6) e Fração (2)+(3)). As demais foram identificadas isoladamente. Para o ensaio de atividade antimicrobiana as substâncias foram novamente codificadas para melhor identificação dos resultados. A Tabela 1 apresenta esta codificação (em letras de A a F) e a nomenclatura de cada substância. Ressalta-se que a substância F corresponde a aglicona luteolina, que foi obtida comercialmente (Sigma-Aldrich®) e também submetida ao ensaio.

Tabela 1. Codificação utilizada para identificação das substâncias isoladas no ensaio de atividade antimicrobiana

Código	Substância*	Identificação da substância
A	(4)	4'-metoxiluteolina-6-C- α -L-arabinopiranosídeo
B	Fração (5) + (6)	(5): 6-hidroxi-7-metoxiluteolina (6): 8-carboximetil-1,5,6-triidroxi-3-metoxixantona
C	(7)	8-carboxi-metil-1,3,5,6-tetraidroxixantona
D	(1)	luteolina-6-C- β -D-glucopiranosídeo
E	Fração (2) + (3)	(2): 7-metoxiluteolina-6-C- β -D-glucopiranosídeo (3): 7-metoxiluteolina-8-C- β -D-glucopiranosídeo
F	Luteolina	Luteolina (Sigma-Aldrich®)

* Numeração correspondente a Figura 4

4.2.2 Quantificação de flavonoides totais nos extratos

4.2.2.1 Curva analítica para quantificação de flavonoides totais

Para a construção da curva analítica foram preparadas soluções do flavonoide luteolina de concentrações finais de 5, 10, 15, 20, e 25 $\mu\text{g/mL}$, em balões volumétricos de 10 mL, contendo 1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 2,5%. Foi utilizado como branco do sistema 1 mL da solução de cloreto de alumínio a 2,5% diluído em etanol em balão

de 10 mL. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos. Após este período, as leituras das absorvâncias das soluções foram realizadas em comprimento de onda de 351 nm (Funari & Ferro, 2006).

4.2.2.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Foram preparadas soluções em etanol dos extratos na concentração de 5 µg/mL, acrescentadas de 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5%. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos e em seguida foram realizadas as leituras das absorvâncias de cada solução a 351 nm. Como branco do sistema, foi utilizada 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído em etanol. O resultado foi obtido pela média de três determinações (Georgetti et al., 2006).

4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

A metodologia utilizada foi baseada na oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio e formação do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, e posterior redução pela ação da substância teste (Pellegrini et al., 1998; Re et al., 1999; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Foi preparada previamente uma solução de ABTS diluído em tampão fosfato de sódio pH 7,4, seguida da adição de solução de persulfato de potássio 10 mM. Esta solução foi mantida em repouso, ao abrigo da luz, por 12 a 16 horas, para total formação do $\text{ABTS}^{\bullet+}$. No momento da utilização, a solução reativa de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída em tampão fosfato e analisada em espectrofotômetro a 735 nm até obtenção de valor de absorvância de 0,7.

As amostras analisadas foram diluídas em metanol 12,5% em diferentes concentrações (0,31, 0,63, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 µg/mL) e dispostas em microplacas de 96 poços, conforme representado na Tabela 2. Como padrões foram utilizados os flavonoides

luteolina e quercetina. Como branco foi utilizado metanol 12,5%. Uma solução de metanol 12,5% e ABTS^{•+} foi utilizada como controle do sistema. Os resultados foram apresentados como a concentração capaz de reduzir 50% do ABTS^{•+} (IC₅₀).

Tabela 2. Representação da disposição das substâncias analisadas no teste do ABTS^{•+}

Reagentes	Branco	ABTS ^{•+} controle	Teste
ABTS ^{•+} sol. trabalho	-	100 µL	100 µL
Amostra	-	-	150 µL
Metanol 12,5%	300 µL	200 µL	50 µL

4.2.4 Avaliação da atividade antibacteriana

4.2.4.1 Padronização da suspensão bacteriana

Cultivos bacterianos de 24 horas em caldo Müeller-Hinton (MHC) foram transferidos para solução tampão fosfato pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância entre 0,08 a 0,10, que corresponde a esta concentração. Posteriormente a suspensão foi diluída na proporção 1:10 para atingir a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, que foi, então, utilizada nos ensaios.

4.2.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antibacteriana e a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram realizadas por meio da técnica de microdiluição de acordo

com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços e cada orifício foi preenchido com MHC estéril, o inóculo e as soluções das substâncias-teste, de tal forma que o volume final do poço fosse de 100 μ L. As soluções dos extratos testados foram preparadas em metanol 25% em concentração inicial de 2000 μ g/mL e diluídas seriadamente até 7,8 μ g/mL, e as substâncias isoladas foram diluídas em metanol 25% em concentração inicial de 500 μ g/mL e diluídas seriadamente até 1,96 μ g/mL. Como controle positivo foi utilizada solução de ciprofloxacino a 35 μ g/mL. Também foram realizados o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controles de turbidez das substâncias-testes e controle negativo (metanol 25 %).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. O resultado foi avaliado observando-se a turbidez ocorrida nos poços teste, e posterior avaliação colorimétrica utilizando resazurina como indicador, onde os poços que apresentam atividade antibacteriana permanecem corados de azul, enquanto os poços onde houve crescimento microbiano se coram de rosa.

4.2.4.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima

Antes da adição de resazurina, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo agar Müeller-Hinton (MHA), e incubadas durante 24 h em estufa a 37°C. Após esse período foram observados os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a concentração bactericida mínima (CBM) que é definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura.

4.2.5 Avaliação da atividade antifúngica

4.2.5.1 Padronização da suspensão fúngica

Cultivos de 48 horas das leveduras em caldo Sabouraud dextrose (SDC) foram transferidos para solução PBS pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC/mL) que foi confirmada por leitura espectrofotométrica a 625 nm com valor de absorbância entre 0,08 a 0,10. Em seguida, foram diluídas até atingir a concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, que foi, então, utilizada nos testes.

4.2.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A avaliação da atividade antifúngica e determinação da CIM foram realizadas por meio da técnica de microdiluição de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M27-A2 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços e cada orifício foi preenchido com meio líquido RPMI 1640, ajustado a pH 7,0 com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante. Foram acrescentados também o inóculo e as soluções dos extratos diluídos, de tal forma que o volume final dos poços fosse de 100 μ L. As soluções dos extratos foram preparadas em metanol 25% em concentração inicial de 2000 μ g/mL e diluídas seriadamente até 7,81 μ g/mL, e as substâncias isoladas foram diluídas em metanol 25% em concentração inicial de 500 μ g/mL e diluídas seriadamente até 1,96 μ g/mL. Como controle positivo foi utilizado solução de fluconazol a 65 μ g/mL. Também foram realizados o controle de esterilidade do meio, controle do crescimento do inóculo, controle de esterilidade dos extratos e controle negativo (solvente). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. O resultado foi avaliado observando-se a turbidez

ocorrida nos poços teste, seguida de avaliação colorimétrica utilizando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) como indicador. Os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano se coram de vermelho (Duarte et al., 2005).

4.2.5.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Antes da adição do indicador TTC nas microplacas, uma alíquota de cada poço foi semeada em placas de Petri contendo agar Sabouraud dextrose (SDA), e incubadas durante 48 horas em estufa a 37°C. Após esse período foi observado os pontos onde ocorreram crescimento microbiano, determinando assim a concentração fungicida mínima (CFM) que é definida como a menor concentração testada na qual não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura.

4.2.5.4 Efeitos sobre a formação de hifa

C. albicans (NCPF 3153), previamente cultivadas em SDA, foram ressuspensas a uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL em solução de PBS pH 7,2. Os extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*, extrato metanólico de folhas de *L. spiralis*, e o flavonoide luteolina foram testados em diferentes concentrações baseadas na CIM obtida no ensaio de atividade antifúngica, sendo elas 0,5 x CIM, 1 x CIM e 2 x CIM. Foi avaliada a atividade sobre a formação de hifa em microplacas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 enriquecidos com 10% de soro bovino fetal (SBF) e gentamicina (1%). As análises foram feitas em triplicata. Ao final de 12 e 24 horas, foram observadas a formação de hifa em microscópio de luz invertida (Nikon TE 2000-U Eclipse) em aumento de 400 x, e

registrada uma imagem do campo observado para cada concentração e para o controle de crescimento do fungo. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B a 5 µg/mL.

Para análise da atividade sobre a redução de hifa, a suspensão preparada foi cultivada por 24 horas para se obter *C. albicans* em filamentação, e uma alíquota de 20 µL deste crescimento foi adicionada a poços contendo meio RPMI 1640 adicionados de 10% de SBF e gentamicina (1%) e as diferentes concentrações do extrato de escapos de *S. nitens*. Ao final de 24 horas, foi observada a redução das hifas em microscópio de luz invertida com aumento de 400 x e registrada uma imagem do campo observado para cada concentração (Zhang et al., 2006). Anfotericina B a 5 µg/mL foi utilizada como controle positivo.

4.2.6 Avaliação da citotoxicidade

4.2.6.1 Determinação da viabilidade celular pelo teste do MTT

Foi avaliado o efeito citotóxico de diferentes concentrações dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*, folhas de *L. spiralis* e luteolina, baseadas na CIM obtida nos ensaios de atividade antifúngica (0,5 x CIM, 1 x CIM e 2 x CIM), sobre células HeLa (ATCC CCL2 – células de adenocarcinoma de cervix humano) para 24 horas de tratamento utilizando o ensaio do MTT (Jiao et al., 1992). Este ensaio permite medir a sobrevivência e proliferação celular e baseia-se na redução metabólica do MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase em um composto de cor azul (formazan), permitindo determinar a funcionabilidade mitocondrial das células tratadas. A quantidade de células vivas é proporcional ao formazan produzido. Previamente, células HeLa (5000/poço) foram cultivadas por 24 horas em placa de 96 poços e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As soluções dos extratos foram preparadas em meio RPMI 1640, esterilizadas por filtração e adicionadas aos poços correspondentes (50 µL). Após 24 horas de incubação, 20 µL de

solução de MTT (10 mg/mL) foram adicionadas em cada poço e a placa foi novamente incubada a 37 °C por 4 horas. Após incubação, as placas foram centrifugadas (45 g/5min), foi desprezado o sobrenadante e adicionado em cada poço 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas 5 minutos em agitador para dissolver os sais de formazan formados. A leitura das absorbâncias foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O índice de viabilidade celular é obtido através da equação 1:

$$\text{Equação 1: } I.\text{viabilidade} = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs basal}}$$

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (Anova) seguido de teste de Dunnet (múltiplas comparações com um único controle) com $p < 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5[®] para a realização das análises estatísticas.

4.2.6.2 Determinação de liberação de LDH

A citotoxicidade induzida pelos extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*, folhas de *L. spiralis* e luteolina foi avaliada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Após a exposição das células HeLa aos extratos e luteolina no teste do MTT, foram separadas alíquotas de 50 µL do sobrenadante para avaliação da presença de LDH. A presença de LDH no meio foi determinada utilizando um kit comercialmente disponível (LDH-P UV AA, Wiener lab[®]). O ensaio baseia-se na conversão de piruvato para lactato na presença de LDH, com redução paralela de NADH. A formação de NAD^+ resulta em uma variação de absorbância, medida em espectrofotômetro a 340 nm. Alíquotas de 20 µL das amostras foram adicionadas a

eppendorffs contendo 1 mL solução tampão Tris pH 7,2 contendo piruvato e cloreto de sódio (reagente A) e aquecidos em banho a 37 °C até momento da leitura. No momento da leitura foram adicionados 25 µL de solução contendo NADH (reagente B) e imediatamente lido em espectrofotômetro a 340 nm (Spectra max190 Molecular Devices). A leitura foi realizada em diferentes tempos (0, 1, 2 e 3 minutos). Para análise dos resultados, foi utilizada a seguinte equação 2:

$$\text{Equação 2: LDH (UI)} = \Delta \text{Abs} / \text{min} \times F$$

onde: $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ = diferença dos valores de absorbância por tempo (minutos); F = fator (10080).

Os resultados foram analisados estatisticamente, comparando os valores de LDH obtidos a nível basal com os diferentes tratamentos com os extratos, por análise de variância (Anova) seguida de teste de Dunnet (múltiplas comparações com um único controle) com $p < 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5[®] para a realização das análises estatísticas.

4.2.6.3 Atividade hemolítica

Eritrócitos humanos de indivíduo saudável foram coletados em tubos contendo heparina como anticoagulante. Os eritrócitos foram centrifugados a 80 g por 10 minutos e lavados 3 vezes com PBS pH 7,2. Com o sedimento formado foi preparada uma solução a 10 % de eritrócitos em PBS e novamente diluído a proporção 1:10 com PBS. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de PBS em cada poço e 100 µL de cada solução de extrato em concentração inicial de 2000 µg/mL e diluída seriadamente até 7,81 µg/mL. Procedida a diluição seriada, foram adicionados em cada poço 100 µL da solução de

eritrócitos. Como controle positivo foi utilizada solução de Triton X-100 (1%) e um controle negativo (metanol 25%) e controle da absorbância dos extratos (branco) também foram analisados. Após incubação durante 1 hora a 37 °C, a placa foi centrifugada a 80 g por 10 minutos e as absorbâncias do sobrenadante foram medidas em leitor de microplacas a 450 nm (He et al., 2007). A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a equação 3:

Equação 3:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(\text{Abs extrato} + \text{eritrócitos}) - \text{Abs branco} - \text{Abs Cont. negativo}}{\text{Abs Cont. positivo} - \text{Abs Cont. negativo}} \times 100$$

Os resultados foram calculados em porcentagem de hemólise e analisados estatisticamente por análise de variância (Anova) seguido do teste de Dunnett. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5[®] para a realização das análises estatísticas.

4.2.7 Determinação da inibição de crescimento de *C. albicans* em células infectadas, pelo extrato metanólico de escapos de *S. nitens*

Previamente, células HeLa foram semeadas em placa de 96 poços e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, as células cultivadas (5000/poço) foram infectadas com *C. albicans* (NCPF 3153) em diferentes proporções célula/fungo (10:1, 20:1 e 40:1). As células infectadas foram tratadas com diferentes concentrações do extrato de escapos de *S. nitens* (500, 250 e 125 µg/mL). Após 24 horas de incubação, 50 µL de cada poço foi retirado para avaliação da liberação de LDH, e solução de MTT (10 mg/mL) foi adicionada em cada poço e a placa foi novamente incubada a 37 °C por 4 horas. Após incubação, as placas foram centrifugadas (45 g/5min), desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se em cada poço 200 µL de DMSO, sendo mantidos 5 minutos em

agitador para dissolver os sais de formazan formados. A leitura das absorbâncias foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (Termoplate®). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Obteve-se a porcentagem de viabilidade do sistema (célula/*C. albicans*) através da equação 4:

$$\text{Equação 4: } \% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs basal}} \times 100$$

Para cada um dos tratamentos foi considerado como controle basal as células infectadas sem tratamento. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (Anova) seguida de teste de Dunnet (múltiplas comparações com um único controle) com $p < 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5® para a realização das análises estatísticas.

4.2.8 Efeito do extrato de escapos de *S. nitens* sobre a formação de hifa em células infectadas por *C. albicans*

Células HeLa foram infectadas com *C. albicans* (NCPF 3153) ($2,5 \times 10^3$ UFC/mL). Foram tratadas com 3 concentrações dos extratos de escapos de *S. nitens* (0,5 x CIM, 1 x CIM e 2 x CIM), em microplacas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 enriquecidos com 10% de SBF, para verificação da atividade sobre a formação e redução de hifa. Ao final de 24 horas, foi observada a redução das hifas em microscópio de luz invertida com aumento de 400 x e registrada uma imagem do campo observado para cada concentração. Anfotericina B a 5 µg/mL foi utilizada como controle positivo.

4.2.9 Preparo do creme vaginal

Para o preparo do creme foi utilizada a fórmula apresentada na Tabela 3. As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente até 75 °C para completa fusão do material graxo, sendo posteriormente reunidas e agitadas até resfriamento para incorporação do extrato, previamente dissolvido em propilenoglicol. O pH da formulação foi ajustado a 4,0 – 4,5 utilizando solução de ácido cítrico a 10%. O creme, preparado nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% de extrato, foi acondicionado em frascos de propileno, parede dupla com tampa rosqueável e tampa interna de PVC.

Tabela 3. Fórmula percentual da preparação de creme vaginal e função de cada componente

Nome INCI	Matéria-prima	Função	Concentração (%)
Fase oleosa			
Emulsifying wax	Álcool cetoestearílico monoestearato de sorbitano polioxietileno	Cera autoemulsionante nao-iônica	12,00
Mineral oil	Óleo mineral	Emoliente	2,00
Fase aquosa			
Glycerin	Glicerina	Emoliente	2,00
Water	Água destilada	Veículo	q.s.p. 100
Propylene glycol	Propilenoglicol	Umectante	6,00
Extract	<i>S. nitens</i>	Princípio ativo	2,0; 1,0; 0,5
Citric acid sol. 10%	Ácido cítrico	Corretivo de pH	q.s. pH 4,0 – 4,5

INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredient

4.2.9.1 Controle microbiológico do creme vaginal

Para evitar qualquer interferência nos resultados da atividade anti-CVV, o creme vaginal foi preparado sem a adição de conservantes. Assim, fez-se necessário a

realização do controle microbiológico do creme. O ensaio foi realizado 30 dias após o preparo do creme, e a amostra analisada foi a mesma utilizada no teste de atividade anti-CVV. Para contagem total de micro-organismos, foram transferidos assepticamente 10 g de creme para 90 mL de PBS pH 7,2. A solução foi submetida à agitação por 10 minutos. Após homogeneização, foi transferido 1 mL da amostra para placas de petri na qual foi adicionado 20 mL de ágar tioglicolato para contagem de bactérias totais ou 20 mL de SDA para contagem de leveduras. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas e 25 °C durante 7 dias, para o isolamento de bactérias e leveduras, respectivamente. Após este período foi contado o número de colônias e contabilizado o número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g). O limite de contaminação não deve ser superior a 10^3 UFC/g para bactérias e 10^2 UFC/g leveduras para preparações não estéreis de aplicação tópica (mucosas), segundo recomendações oficiais (Farmacopéia Brasileira, 2010; Brasil, 1999).

4.2.10 Atividade anti-CVV *in vivo*

4.2.10.1 Animais

Foram utilizadas 42 ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 8 semanas e pesando entre 150 – 200 g. Durante o estudo os animais permaneceram no biotério da FCQ–UNC, a temperatura de 22 °C e 12 horas de ciclo claro/escuro. Os animais foram providos de alimento e água *ad libitum*. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCQ–UNC, Argentina, e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (Protocolo nº 25/2010).

4.2.10.2 Grupos experimentais

Foram usados 7 grupos de 6 animais. O experimento consistiu de grupo controle (não infectados), grupo controle de infecção (infectados e não tratados), grupo controle positivo (infectados e tratados com antifúngico), grupos controle veículo (infectados e tratados com creme base), grupos tratamentos (tratados com creme contendo o extrato) conforme representado na Tabela 4.

Tabela 4. Grupos experimentais e protocolos de tratamento para avaliação da atividade anti-CVV

Grupos ^a	Descriminação	Infecção	Tratamento	Volume (mL)
1	Controle não infectados	–	Solução PBS	0,1
2	Controle de infecção	+	Solução PBS	0,1
3	Controle positivo	+	miconazol creme 30 mg/g	0,1
4	Controle veículo	+	Creme base	0,1
5	Creme vaginal 0,5%	+	0,45 mg	0,1
6	Creme vaginal 1,0%	+	0,9 mg	0,1
7	Creme vaginal 2,0%	+	1,8 mg	0,1

^aForam tratados 6 animais por grupo; (–) ausência (+) presença

4.2.10.3 Estabelecimento de imunossupressão

Os animais foram conduzidos a um estado de imunossupressão através de administração de CPA, em dose única de 50 mg/kg de p.c., por via intra-peritoneal (i.p.; 0,3 mL), no primeiro dia de tratamento.

4.2.10.4 Indução de estado pseudo-estro

Para induzir a condição de pseudo-estro, foi administrado em cada animal solução de estradiol (0,2 mg/animal), por via subcutânea (s.c.), 1 x ao dia, durante 5 dias que antecederam a infecção. O volume injetado foi de 0,1 mL. Durante este período foi avaliado a atividade hormonal através de lavagem vaginal e observação microscópica do fluido vaginal a fresco em microscópio óptico em aumento de 40 x. Essa observação foi usada para identificar a fase do ciclo estral e determinar se houve indução da fase pseudo-estro.

4.2.10.5 Padronização da suspensão do inóculo para infecção

Culturas de 48 h de *C. albicans* (NCPF 3145), cultivadas em SDA foram suspendidas em solução tampão PBS pH 7,2, contadas em câmara de Neubauer e ajustada a suspensão a concentração de $5,0 \times 10^7$ UFC/mL.

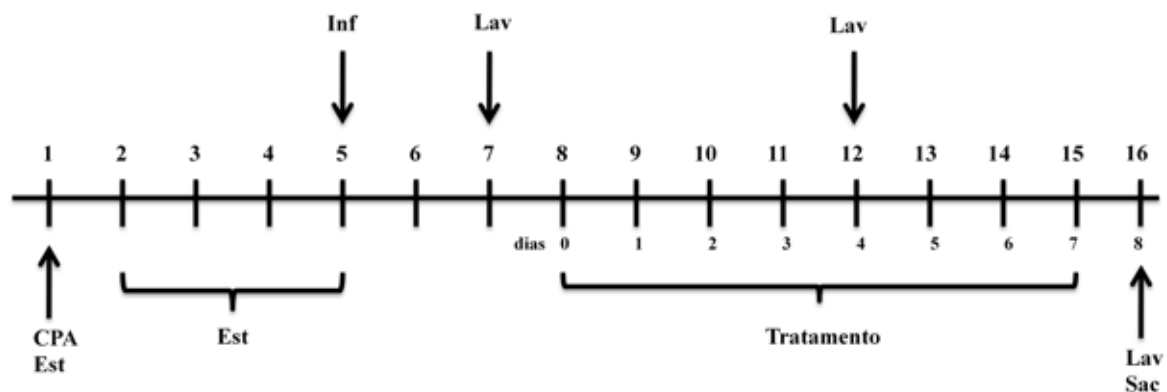
4.2.10.6 Infecção vaginal e monitoramento da infecção

A suspensão do inóculo previamente preparada foi introduzida na vagina (0,1 mL) 5 dias após a primeira administração de estradiol para indução hormonal do estado pseudo-estro. O mesmo volume de PBS foi introduzido nos animais do grupo controle.

A infecção foi monitorada 2 dias após a introdução vaginal do inóculo, através de lavagem vaginal com 0,1 mL de PBS e imediata remoção do fluido. Diluições do fluido foram procedidas e semeadas, em triplicata, em placas de Petri contendo SDA suplementado com cloranfenicol e incubadas a 37 °C por 48h. A infecção foi considerada positiva se houve crescimento, de no mínimo, uma colônia por placa, e se o somatório do número de colônias de cada indivíduo fosse maior que 10^2 UFC/mL.

4.2.10.7 Tratamento

Os diferentes grupos de animais foram tratados conforme esquematizado na Figura 5. Os grupos tratamento e controles foram tratados da mesma forma, duas vezes ao dia, por 8 dias, através da introdução vaginal de 0,1 mL de creme (equivalente a $93,5 \text{ mg} \pm 0,008$). Nos dias 4 e 8, foram procedidas lavagens vaginais e o fluido coletado foi semeado em placas de SDA+cloranfenicol, incubados por 48h a 37°C , para verificação da carga fúngica vaginal. Os animais foram pesados diariamente e a variação do peso corporal dos animais tratados foi comparada àqueles do grupo sem tratamento. Após o último dia de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e o canal vaginal foi longitudinalmente removido para avaliação histopatológica, que consistiu na confecção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina.



CPA: ciclofosfamida; Est: estradiol; Inf: infecção; Lav: lavagem; Sac: sacrifício

Figura 5. Esquema de tratamento do ensaio anti-CVV *in vivo*.

4.2.10.8 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância para experimentos inteiramente casualizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “p-

value”. Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima para $\alpha = 0,05$. A variação do peso corporal dos animais foi analisada estatisticamente pelo teste de Dunnett. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5[®] para a realização das análises estatísticas.

4.2.11 Avaliação da mutagenicidade

4.2.11.1 Tratamentos

Para esse experimento, realizado concomitantemente com o ensaio de atividade antifúngica *in vivo*, 35 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas, com 8 semanas e peso médio inicial de 150 – 200 g foram submetidas a 2 tempos de tratamento: agudo (24 h) e subagudo (7 dias). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCQ-UNC, Argentina, e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (Protocolo n° 25/2010).

As concentrações do creme vaginal contendo extrato metanólico de *S. nitens* (0,5%, 1,0% e 2,0% p/v) foram selecionadas com base em experimento preliminar de atividade antifúngica *in vitro*. Foram realizados paralelamente um grupo controle do veículo (creme base), um grupo controle negativo (não tratado), um grupo controle positivo (50 mg/kg p.c. de CPA, 0,3 mL, i.p.) e um grupo controle de hormônio (estradiol 0,2 mg/animal, 0,1 mL, s.c.). Cada grupo de tratamento consistiu de 5 animais (Tabela 5). Os animais foram tratados 2 vezes ao dia de maneira idêntica através de introdução intravaginal de 0,1 mL (equivalente a $93,5 \text{ mg} \pm 0,008$), e pesados diariamente.

Tabela 5. Grupos experimentais e protocolos de tratamento para avaliação da mutagenicidade

Grupos ^a	Tratamentos	Doses
1	Controle negativo	PBS
2	Controle veículo (creme base)	0,1 mL
3	Creme 0,5%	0,1 mL
4	Creme 1,0%	0,1 mL
5	Creme 2,0%	0,1 mL
6	Ciclofosfamida	50 mg/kg p.c.
7	Estradiol	0,2 mg/animal

^a Foram tratados 5 animais em cada grupo

4.2.11.2 Sistema-teste: micronúcleos de sangue periférico

A frequência de micronúcleos em sangue periférico foi determinada de acordo com a técnica descrita por MacGregor et al. (1980). Amostras de sangue periférico foram coletadas após 24 horas e 7 dias do início do tratamento. Para isso, coletou-se uma gota de sangue da cauda de cada animal, que foi disposta no canto superior da lâmina e realizou-se o esfregaço. Após secagem, o material foi fixado em metanol por 5 minutos, e as laminas foram coradas utilizando-se Giemsa diluído (1:10) por 15 minutos.

4.2.11.3 Análise das lâminas

Foi analisada a presença de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (PCEs), que se coram de azul e que são mais jovens. Os eritrócitos normocromáticos (NCEs), que são mais maduros, se coram de laranja. A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) foi determinada analisando 2000 PCEs por animal, em

microscopia de luz sob imersão (1000x de aumento). Para a obtenção dos índices de divisão nuclear (IDN) foram analisados 400 eritrócitos (PCE / PCE + NCE) no sangue periférico, a fim de se avaliar a citotoxicidade dos diferentes tratamentos (Tavares et al., 2011).

4.2.11.4 Análise estatística

Os dados da frequência de PCEMNs e IDN foram analisados estatisticamente por análise de variância (Anova) para experimentos inteiramente casualizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “*p-value*”. Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima para $\alpha = 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5[®] para a realização das análises estatísticas.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação de flavonoides totais no extrato

A curva analítica (Figura 6) foi construída a partir da média das leituras das absorbâncias e apresentou coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9984, sendo considerada linear suficiente para ser usada como referência na determinação do teor de flavonoides totais no extrato. A partir da equação da reta fornecida pela curva analítica de luteolina ($y = 30,88x + 0,0268$) e do valor médio das absorbâncias obtidas para as soluções dos extratos, obteve-se concentração de flavonoides apresentados na Figura 7 e Tabela 6.

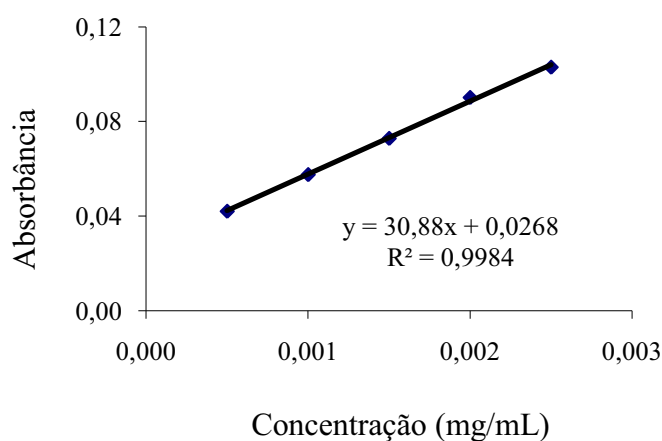


Figura 6. Curva analítica do flavonoide luteolina

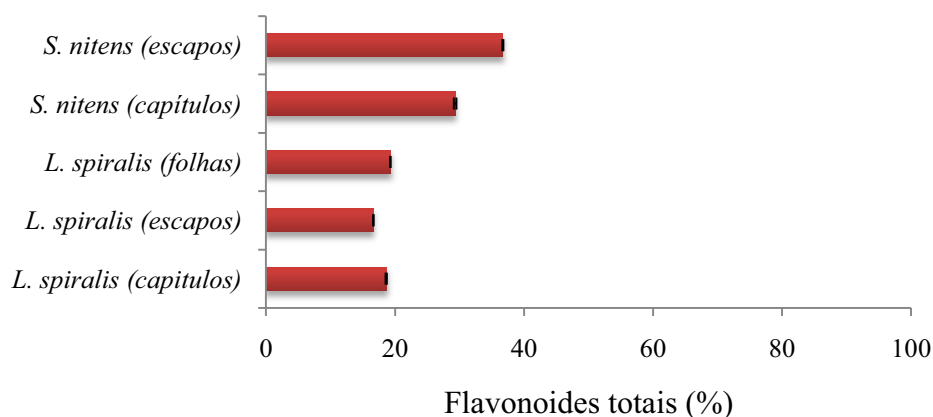


Figura 7. Teor de flavonoides totais nos extratos de *L. spiralis* e *S. nitens*

Tabela 6. Teor de flavonoides totais (%) nos extratos de *L. spiralis* e *S. nitens*

Amostra	Conc (mg/mL)	FT (%)
		Média ± DP
<i>L. spiralis</i> (capítulos)	0,005	18,610 ± 0,099
<i>L. spiralis</i> (escapos)	0,005	16,623 ± 0,037
<i>L. spiralis</i> (folhas)	0,005	19,257 ± 0,037
<i>S. nitens</i> (capítulos)	0,005	29,296 ± 0,198
<i>S. nitens</i> (escapos)	0,005	36,701 ± 0,075

FT= flavonoides totais; DP = desvio padrão

5.2 Atividade antioxidante

A Figura 8 apresenta os gráficos obtidos no testes do ABTS^{•+} para as substâncias utilizadas como padrão, os flavonoides luteolina e quercetina, e para cada extrato analisado, com respectivos valores de concentração inibitória média (IC₅₀). Os resultados mostrados na Tabela 7 e demonstraram que os extratos vegetais testados apresentaram considerável atividade antioxidante quando comparados aos padrões quercetina e luteolina, sendo que o extrato de folhas de *L. spiralis* apresentou melhor resultado (IC₅₀ = 1,743 µg/mL) seguido do extrato de escapos de *S. nitens* (IC₅₀ = 2,493 µg/mL) em relação aos padrões, cujos valores de IC₅₀ foram de 1,140 µg/mL para quercetina e 1,215 µg/mL para luteolina.

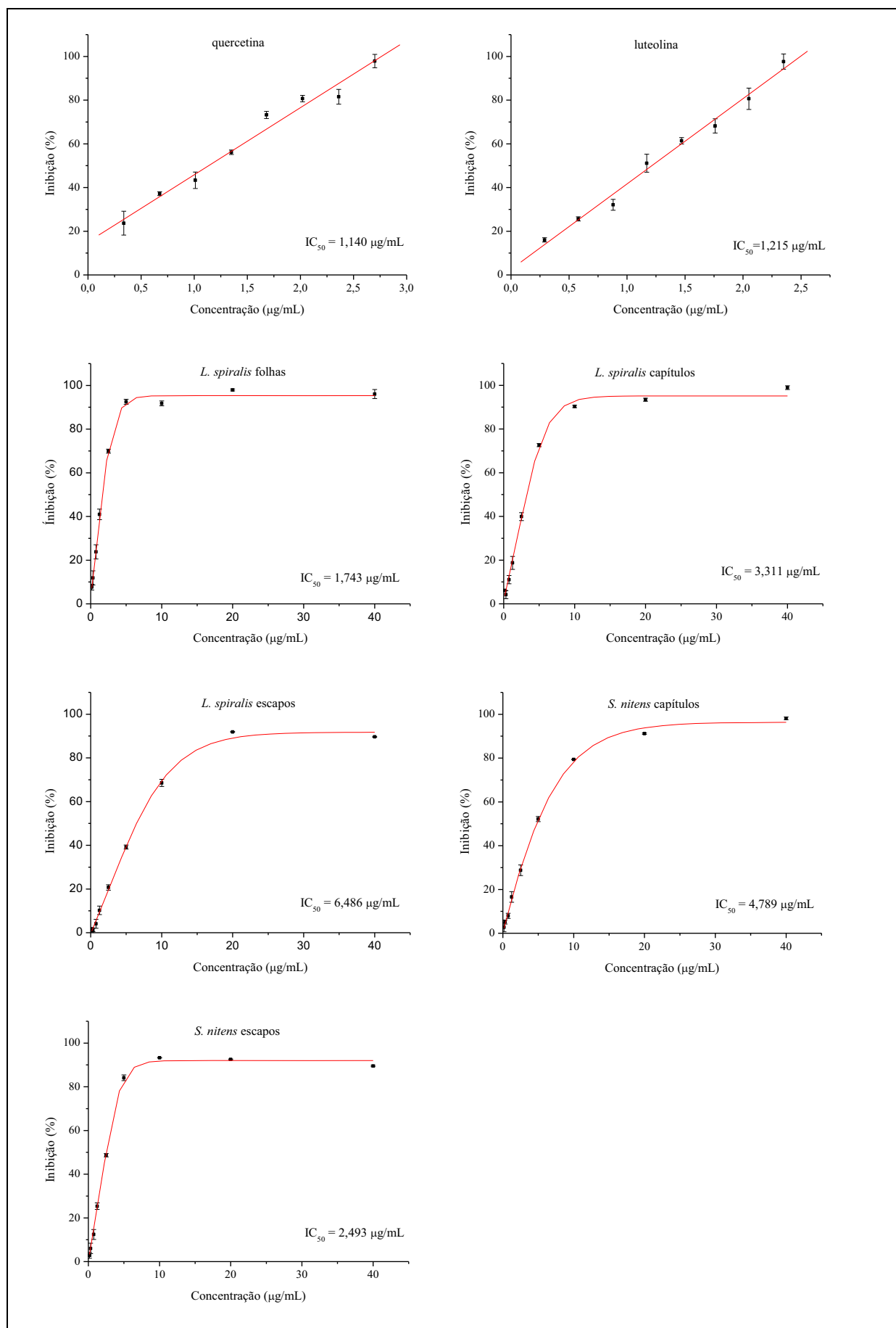


Figura 8. IC_{50} encontrado pelo teste do $ABTS^{\bullet+}$ para os extratos e padrões

Tabela 7. Valores de IC₅₀ dos extratos e padrões obtidos na avaliação da atividade redutora do ABTS^{•+}

Amostras	IC ₅₀ ^a
	Média ± DP
<i>L. spiralis</i> folhas	1,743 ± 0,063 ^b
<i>L. spiralis</i> capítulos	3,311 ± 0,110
<i>L. spiralis</i> escapos	6,486 ± 0,153
<i>S. nitens</i> capítulos	4,789 ± 0,216
<i>S. nitens</i> escapos	2,493 ± 0,075
quercetina	1,140 ± 0,038 ^b
luteolina	1,215 ± 0,031 ^b

^a Valores em µg/mL; ^b não diferentes estatisticamente (p<0,001); DP: desvio padrão

5.3 Atividade antimicrobiana

As tabelas 8, 9 e 10 apresentam os resultados de CIM obtidos na avaliação da atividade antibacteriana dos extratos e compostos fenólicos, após a adição do revelador resazurina.

Tabela 8. Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de folhas, escapos e capítulos de *L. spiralis*

Amostras testadas	CIM ^a					
	Bactérias Gram-positivas			Bactérias Gram-negativas		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. setubal</i>
LS folhas	1000	1000	500	-	-	-
LS escapos	1000	1000	250	-	250	-
LS capítulos	1000	250	500	-	-	-

^a Valores em µg/mL; (-) CIM > 1000 µg/mL

Tabela 9. Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*

Amostras testadas	CIM ^a					
	Bactérias Gram-positivas			Bactérias Gram-negativas		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. setubal</i>
SN capítulos	1000	1000	1000	-	1000	-
SN escapos	250	1000	500	-	500	-

^a Valores em µg/mL; (-) CIM > 1000 µg/mL**Tabela 10.** Atividade antibacteriana das substâncias isoladas do extrato metanólico de folhas de *L. spiralis*

Amostras testadas	CIM ^a					
	Bactérias Gram-positivas			Bactérias Gram-negativas		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. setubal</i>
A	-	-	-	-	-	-
B	125	250	-	62,5	31,25	-
C	125	125	-	-	125	-
D	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-
F	125	62,5	31,25	250	62,5	250

^a Valores em µg/mL; (-) CIM > 250 µg/mL

As Tabelas 11, 12 e 13 apresentam os resultados de CIM obtidos na avaliação da atividade antifúngica dos extratos e compostos fenólicos.

Tabela 11. Atividade antifúngica dos extratos metanólicos de folhas, escapos e capítulos de *L. spiralis*

Amostras testadas	CIM ^a			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
LS folhas	500	500	250	1000
LS escapos	500	250	250	500
LS capítulos	1000	250	250	250

^a Valores em µg/mL

Tabela 12. Atividade antifúngica dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*

Amostras testadas	CIM ^a			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
SN capítulos	1000	500	1000	250
SN escapos	250	31,25	62,5	62,5

^a Valores em µg/mL**Tabela 13.** Atividade antifúngica das substâncias isoladas do extrato metanólico de folhas de *L. spiralis*

Amostras testadas	CIM ^a			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
A	125	nt	nt	nt
B	-	-	125	-
C	62,5	15,7	15,7	31,25
D	-	-	125	-
E	-	250	125	250
F	125	250	125	250

^a Valores em µg/mL; nt = não testado.; (-) CIM > 500 µg/mL

Os resultados de CIM para as atividades antibacteriana e antifúngica mostram que os compostos B e C apresentaram capacidade de inibir o crescimento de quase todas as bactérias, e o composto C mostrou os melhores resultados contra todas as espécies de leveduras testadas. Os extratos testados apresentaram principalmente atividade contra bactérias Gram-positivas, e o extrato de escapos de *S. nitens* apresentou melhores resultados frente às espécies de *Candida*.

Os resultados de CBM e CFM estão apresentados nas Tabelas 14 e 15 e mostraram que a maioria das amostras testadas puderam apresentar efeitos bactericida e fungicida. Em comparação aos valores de CIM pode-se observar que a maioria dos valores de CBM e CFM encontrados coincide com o valor de CIM correspondente, principalmente para leveduras.

Tabela 14. Concentração bactericida mínima e concentração fungicida mínima dos extratos de *L. spiralis* e *S. nitens*

Amostras testadas	CBM ^a		CFM ^a					
	<i>S.</i>	<i>B.</i>	<i>E.</i>	<i>P.</i>	<i>C.</i>	<i>C.</i>	<i>C.</i>	<i>C.</i>
	<i>aureus</i>	<i>subtilis</i>	<i>faecalis</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>albicans</i>	<i>krusei</i>	<i>parapsilosis</i>	<i>tropicalis</i>
LS folhas	1000	1000	-	-	1000	1000	250	1000
LS capítulos	1000	1000	-	-	1000	500	250	-
LS escapos	1000	1000	-	1000	1000	250	250	-
SN capítulos	-	-	-	-	1000	-	1000	-
SN escapos	500	1000	500	500	500	31,25	62,5	250

^a Valores em µg/mL; (-) CBM e CFM > 1000 µg/mL

Tabela 15. Concentração bactericida mínima e concentração fungicida mínima dos compostos isolados do extrato metanólico de folhas de *L. spiralis*

Amostras testadas	CBM ^a					CFM ^a				
	<i>S.</i>	<i>B.</i>	<i>E.</i>	<i>E.</i>	<i>P.</i>	<i>S.</i>	<i>C.</i>	<i>C.</i>	<i>C.</i>	<i>C.</i>
	<i>aureus</i>	<i>subtilis</i>	<i>faecalis</i>	<i>coli</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>setubal</i>	<i>albicans</i>	<i>krusei</i>	<i>parapsilosis</i>	<i>tropicalis</i>
A	-	-	-	-	-	-	250	nt	nt	nt
B	250	250	-	250	250	-	-	-	125	-
C	250	125	-	-	250	-	250	15,7	15,7	62,5
D	-	-	-	-	-	-	-	-	125	-
E	-	-	-	-	-	-	-	250	125	250
F	125	125	125	250	250	-	500	250	125	250

^a Valores em µg/mL; (-) CBM e CFM > 500 µg/mL; nt: não testado

A Tabela 16 apresenta a atividade do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* sobre cepas de *C. albicans* de origem clínica. Os resultados obtidos mostram que todas as cepas foram suscetíveis ao extrato, apresentando valores de CIM entre 62,5 e 250 µg/mL.

Tabela 16. Atividade antifúngica do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* obtidos sobre *C. albicans* NCPF 3152 e diferentes cepas de origem clínica

<i>C. albicans</i>	CIM ^a	<i>C. albicans</i>	CIM ^a
NCPF 3153	250		
FV 1	125	FV 8	62,5
FV 2	62,5	FV 9	250
FV 3	125	FV 10	250
FV 4	125	FV 11	250
FV 5	125	FV 12	62,5
FV 6	62,5	FV 13	125
FV 7	125	FV 14	250

^a Valores em µg/mL

5.3.1 Efeito sobre a formação de hifas

O efeito dos extratos metanólicos de escapos e capítulos de *S. nitens*, folhas de *L. spiralis* e luteolin sobre a formação e crescimento de hifa está apresentado nas Figuras 9, 10 e 11, e apresenta a ação na presença e ausência dos compostos teste. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B a 5 µg/mL. *C. albicans* foi incubada por 12 e 24 horas utilizando diferentes concentrações dos extratos de *S. nitens* (escapos e capítulos), *L. spiralis* (folhas) e luteolina, e observada em microscópio de luz invertida com aumento de 400x. Na ausência dos compostos a formação de hifas foi observada, enquanto que a formação de tubos germinativos foi significativamente afetada pelo tratamento com anfotericina B após 12 horas. Pode-se observar que o tratamento com extrato de escapos de *S. nitens* apresenta inibição significativa na formação de hifas após 12 e 24 horas de tratamento, observando predominância de fase leveduriforme e alguma formação anormal de hifas. A formação anormal de hifas também pode ser observada nos diferentes tratamentos com *L. spiralis* após 12 e 24 horas. Os demais extratos não apresentaram significativa inibição na formação de hifa comparados ao crescimento normal de *C. albicans*.

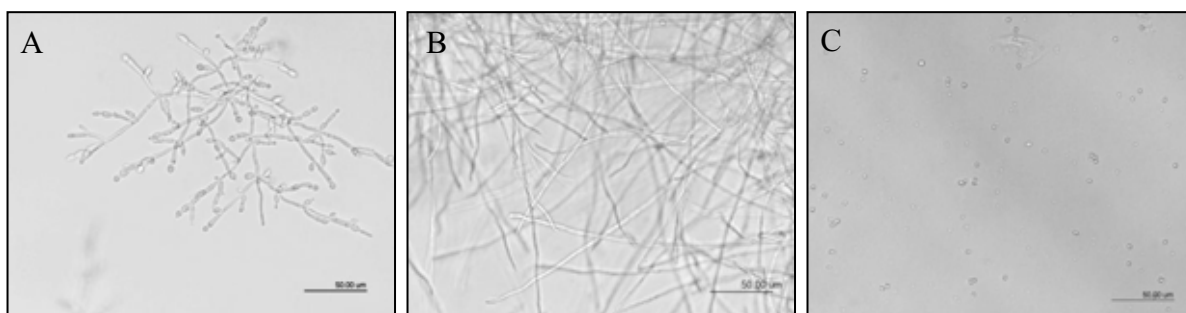


Figura 9. Formação de hifa induzida em *C. albicans* NCPF 3153 em meio RPMI 1640 suplementado com SBF. A = 12 horas; B = 24 horas; C = tratamento com anfotericina B (5 µg/mL) (aumento 400x)

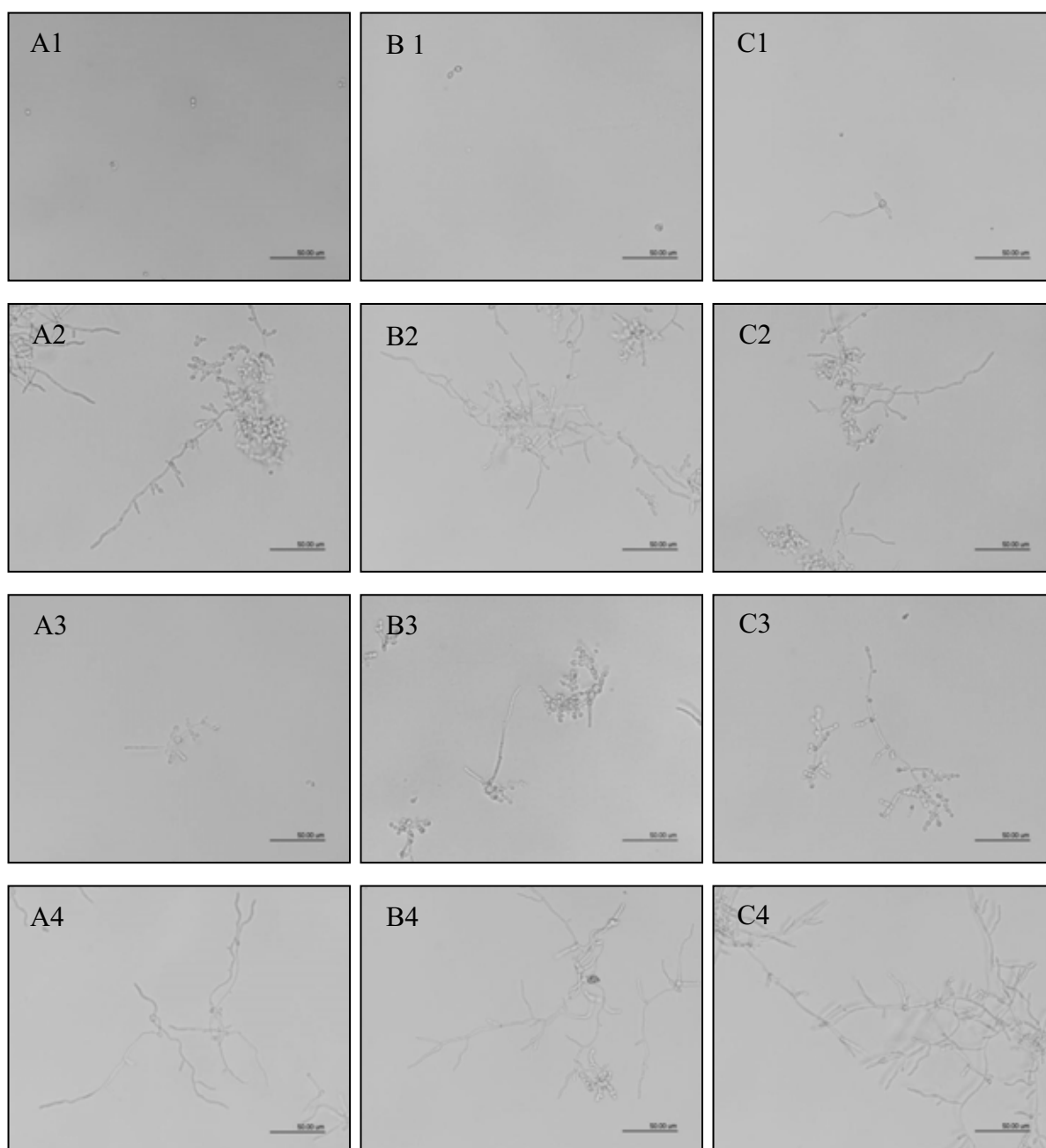


Figura 10. Inibição da formação de hifas em *C. albicans* após 12 horas de tratamento. Formação de hifa foi induzida em *C. albicans* NCPF 3153 em meio RPMI 1640 suplementado com SBF e tratados com diferentes concentrações dos extratos e luteolina. Anfotericina B (5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Fotomicrografia a fresco com aumento de 400x. *S. nitens* escapos – A1 = 500 µg/mL; B1 = 250 µg/mL; C1 = 125 µg/mL; *S. nitens* capítulos – A2 = 1000 µg/mL; B2 = 500 µg/mL; C2 = 250 µg/mL; *L. spiralis* folhas – A3 = 1000 µg/mL; B3 = 500 µg/mL; C3 = 250 µg/mL; luteolina – A4 = 250 µg/mL; B4 = 125 µg/mL; C4 = 62,5 µg/mL (aumento 400x)

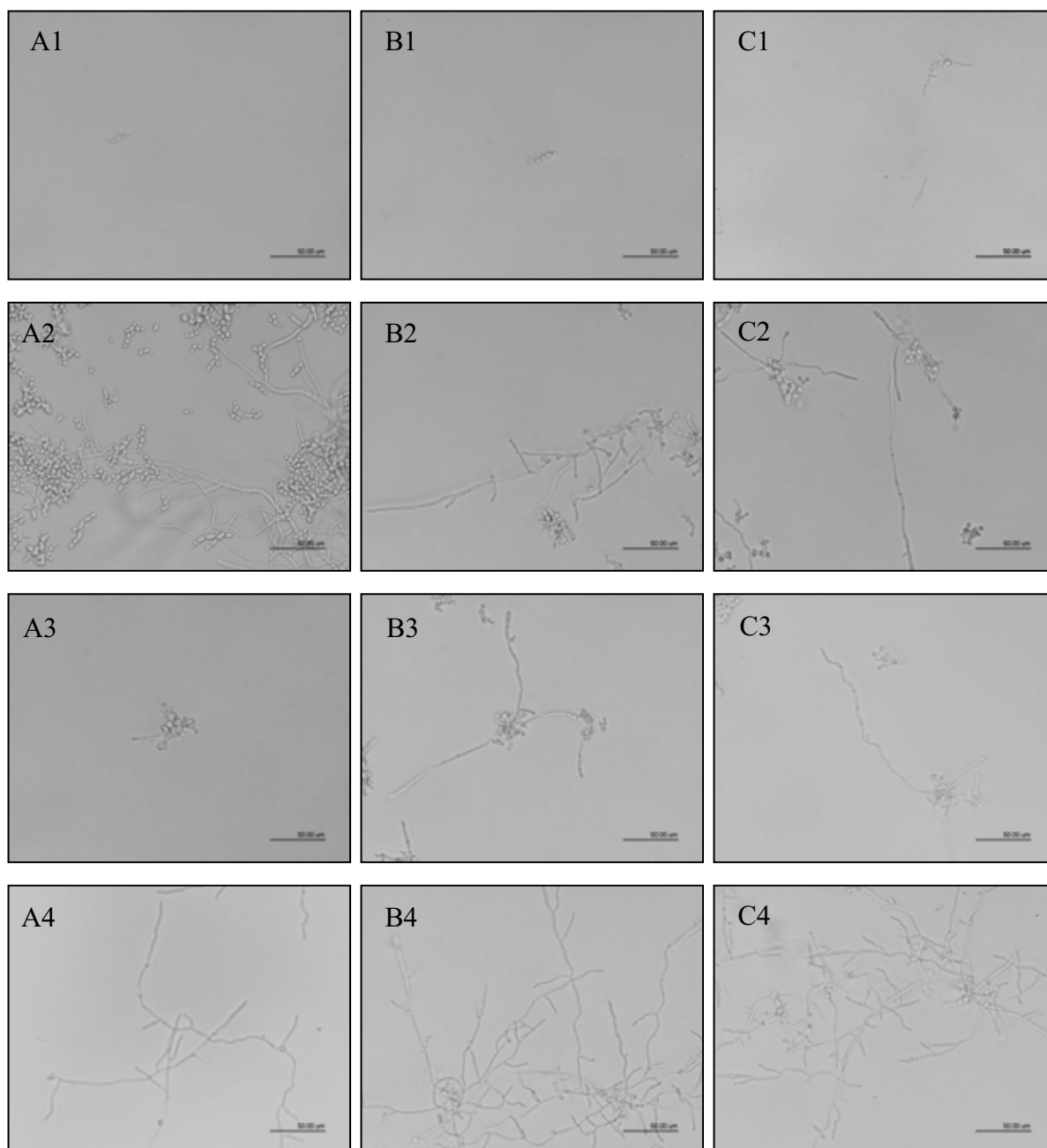


Figura 11. Inibição da formação de hifas em *C. albicans* após 24 horas de tratamento. Formação de hifa foi induzida em *C. albicans* NCPF 3153 em meio RPMI 1640 suplementado com SBF e tratados com diferentes concentrações dos extratos e luteolina. Anfotericina B (5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Fotomicrografia a fresco com aumento de 400x. *S. nitens* escapos – A1 = 500 µg/mL; B1 = 250 µg/mL; C1 = 125 µg/mL; *S. nitens* capítulos – A2 = 1000 µg/mL; B2 = 500 µg/mL; C2 = 250 µg/mL; *L. spiralis* folhas – A3 = 1000 µg/mL; B3 = 500 µg/mL; C3 = 250 µg/mL; luteolina – A4 = 250 µg/mL; B4 = 125 µg/mL; C4 = 62,5 µg/mL (aumento 400x)

5.4 Avaliação da citotoxicidade

As Figuras de 12 a 15 apresentam os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular em condições de crescimento normal (sem tratamento) e após tratamento com as diferentes concentrações dos extratos. Após análise estatística, os extratos de escapos e capítulos de *S. nitens* não mostram diferenças significativas para os valores de índice de viabilidade celular em relação ao crescimento basal, não apresentando, assim, morte celular. Os resultados do ensaio de liberação de LDH no meio de cultura para os extratos de *S. nitens* também não apresentaram diferenças significativas relacionadas aos níveis basais, demonstrando que os extratos não promovem danos sobre a membrana celular.

O extrato metanólico de folhas de *L. spiralis* apresentou citotoxicidade nas concentrações acima de 500 µg/mL. Os ensaios de citotoxicidade pelo MTT revelaram perfis semelhantes para luteolina e extrato de folhas de *L. spiralis*, mostrando diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas e o crescimento basal, indicativo de morte celular. O ensaio de liberação de LDH revelou significativo aumento após exposição aos compostos em relação aos níveis basais, o que sugere que a ação citotóxica apresentada se deve a danos na membrana celular.

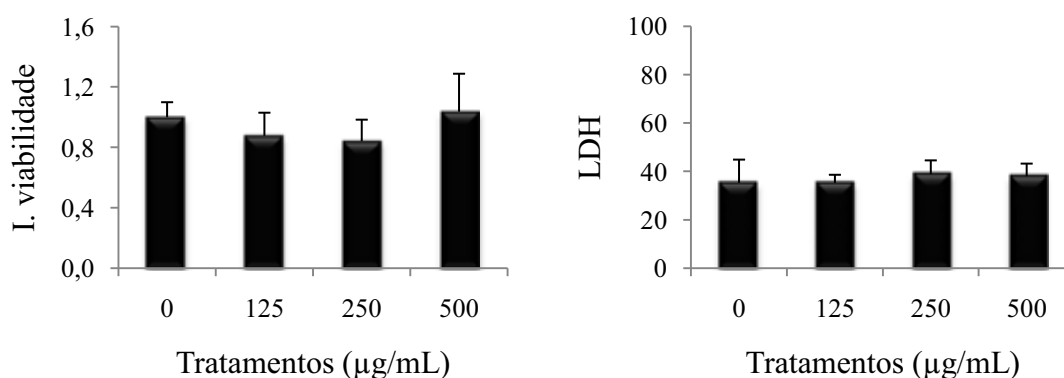


Figura 12. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa

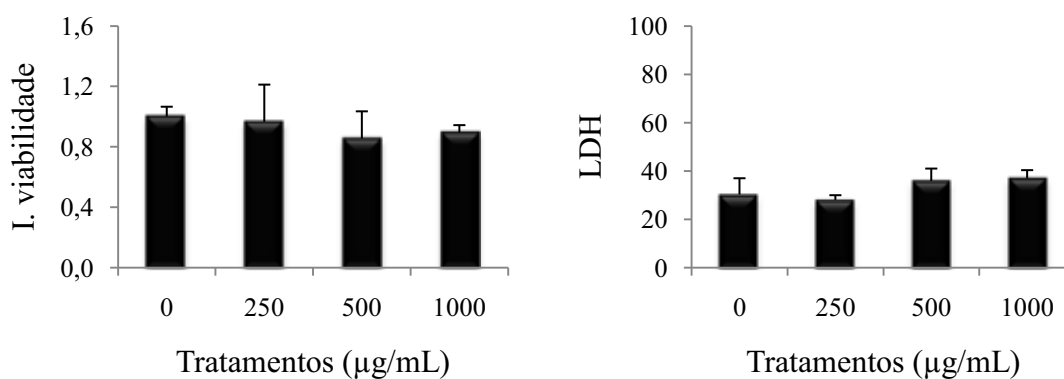


Figura 13. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de capítulos de *S. nitens* sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa

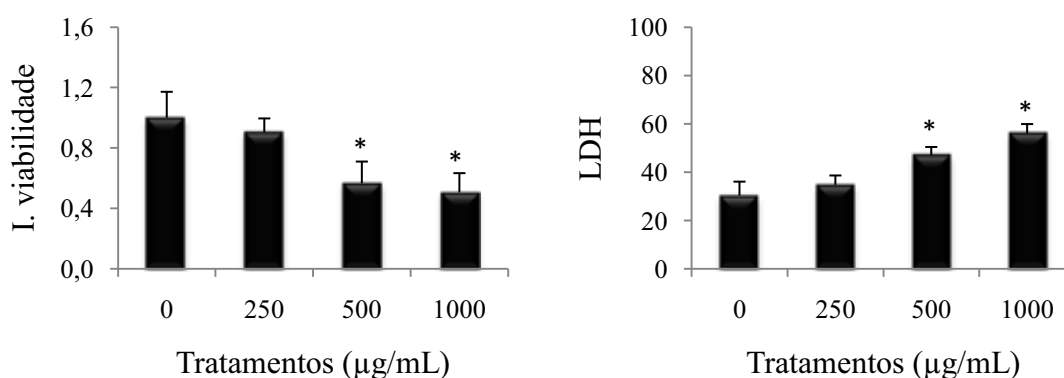


Figura 14. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de folhas de *L. spiralis* sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa

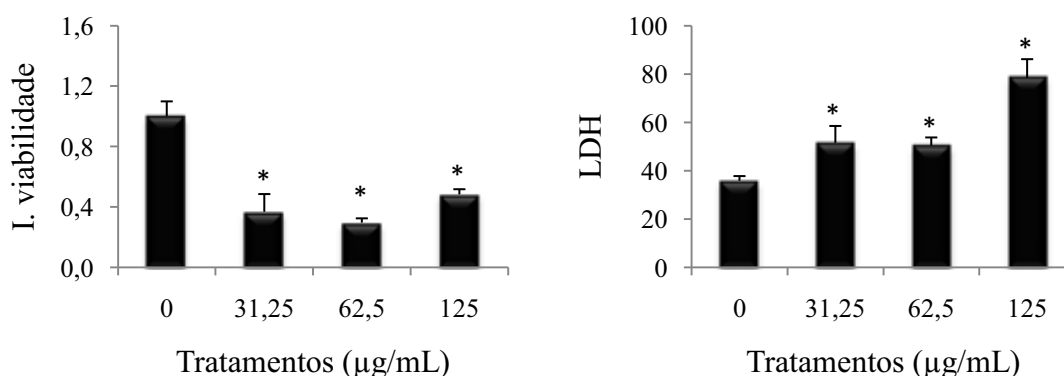


Figura 15. Efeito das diferentes concentrações de luteolina sobre a viabilidade e liberação de LDH de células HeLa

A capacidade de promover hemólise dos compostos em estudo foi investigada pela média da lise de uma suspensão a 10% de eritrócitos humanos por análise espectrofotométrica. Foi usado Triton X-100 (1%) como controle positivo, que induziu $95,0\% \pm 3,16$ de hemólise enquanto o controle do solvente não apresentou hemólise. Os extratos foram testados na concentração inicial de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e diluídos seriadamente até 7,8 $\mu\text{g/mL}$, e luteolina foi avaliada na concentração inicial de 250 $\mu\text{g/mL}$ e diluída seriadamente até 1,89 $\mu\text{g/mL}$, e não foi observada lise celular significativa para nenhum dos compostos comparados ao controle positivo (Figura 16 e 17).

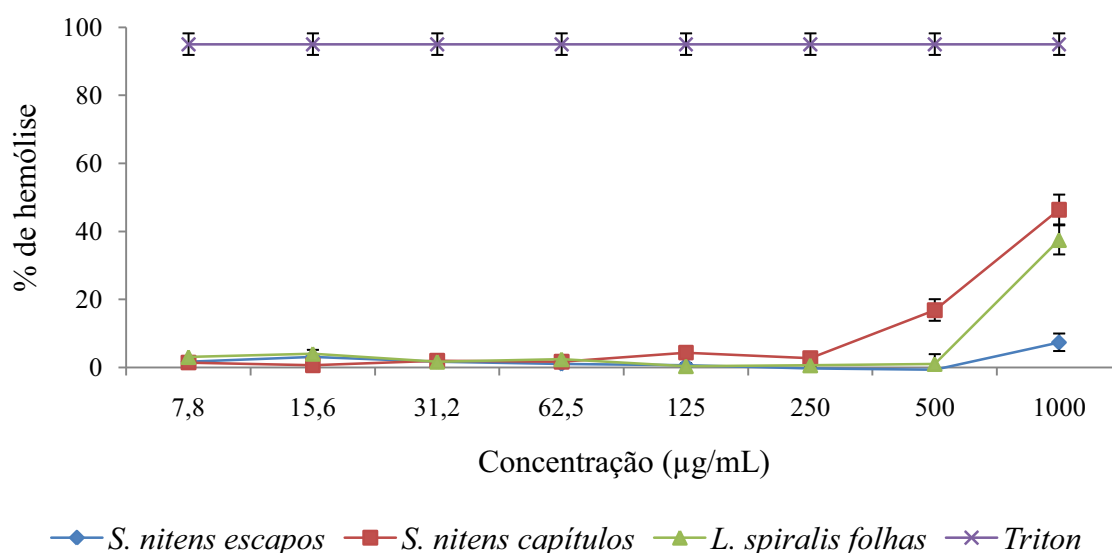


Figura 16. Atividade hemolítica dos extratos de *S. nitens* e *L. spiralis*

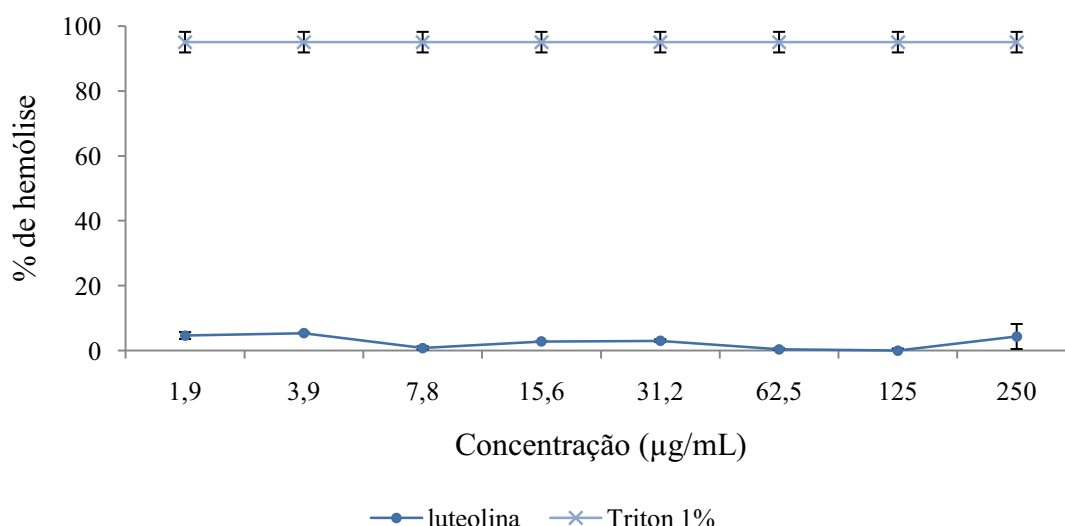


Figura 17. Atividade hemolítica de luteolina

5.5 Determinação da ação do extrato de escapos de *S. nitens* sobre a inibição do crescimento de *C. albicans* em células infectadas

As células, previamente cultivadas, foram infectadas com *C. albicans* (NCPF 3153) em diferentes proporções célula/fungo (10:1, 20:1 e 40:1) e tratadas com o extrato de escapos de *S. nitens* nas mesmas concentrações utilizadas na avaliação da citotoxicidade, para verificar a ação antifúngica dos compostos sobre este sistema. Após 24 horas, solução de MTT foi adicionada e medida a concentração dos sais de formazan formados. Os resultados estão apresentados nas Figuras de 18 a 21 e mostram que o extrato apresentou diminuição da viabilidade do sistema células/*C. albicans*. Assim como nas células, a redução metabólica do MTT pela mitocôndria fúngica permitiu determinar a viabilidade de *C. albicans* sobre o sistema. Para verificar que este efeito não se devia à morte celular, o ensaio de LDH foi utilizado como monitoramento. Da mesma forma, foi analisada a ação sobre a viabilidade de células HeLa infectadas por *C. albicans* nas diferentes proporções pela redução de MTT e monitorados pela liberação de LDH, e foi possível observar que a infecção induzida não promoveu morte celular (Figura 18). Sabendo-se que o extrato metanólico de escapos de *S.*

nitens e a infecção por *C. albicans* não apresentaram redução da viabilidade de células HeLa, verifica-se então que a redução da viabilidade do sistema, nestas condições, se deva à diminuição da infecção. As análises mostram diferenças estatisticamente significativas na redução da viabilidade do sistema tratado com extrato comparado ao sistema não tratado.

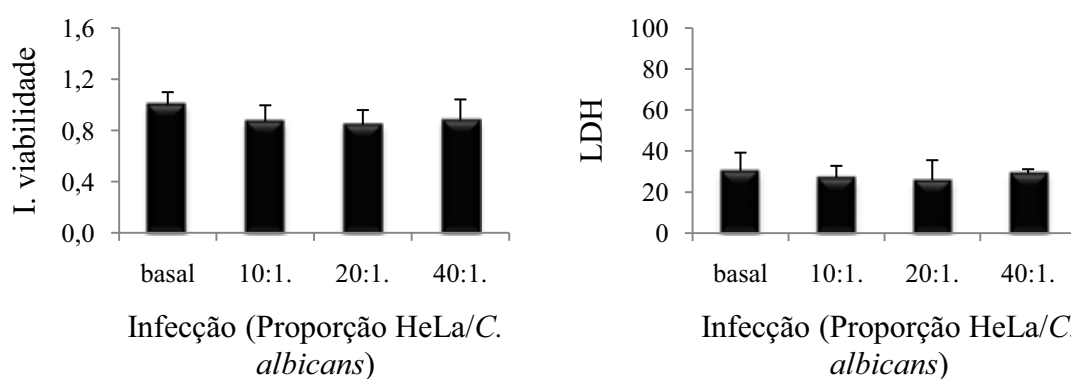


Figura 18. Índice de viabilidade e liberação de LDH de células infectadas com *C. albicans* em diferentes proporções

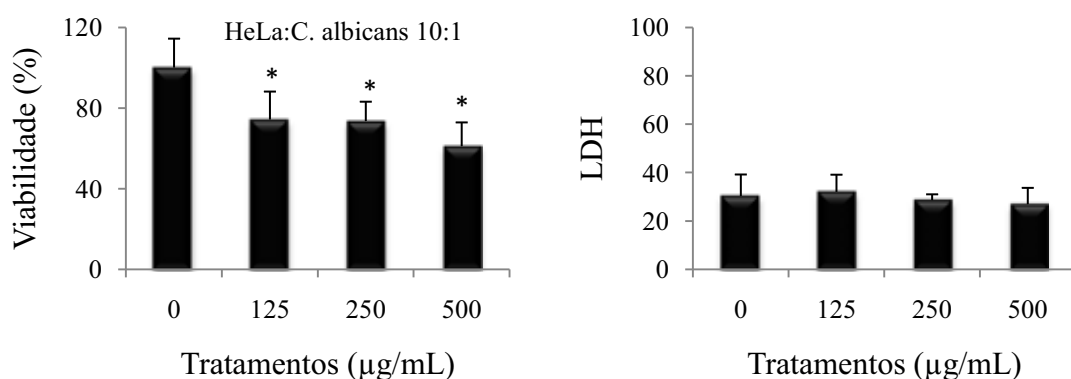


Figura 19. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* sobre a viabilidade do sistema células/*C. albicans* 10:1, e liberação de LDH de células HeLa neste sistema

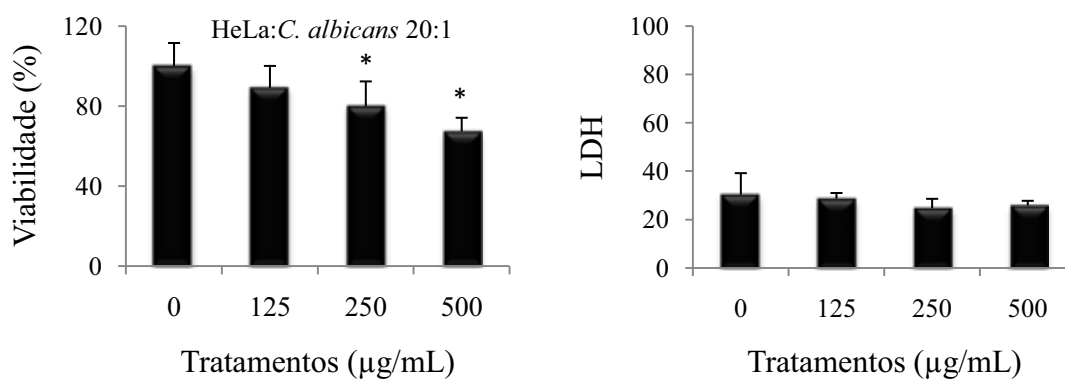


Figura 20. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* sobre a viabilidade do sistema células/*C. albicans* 20:1, e liberação de LDH de células HeLa neste sistema

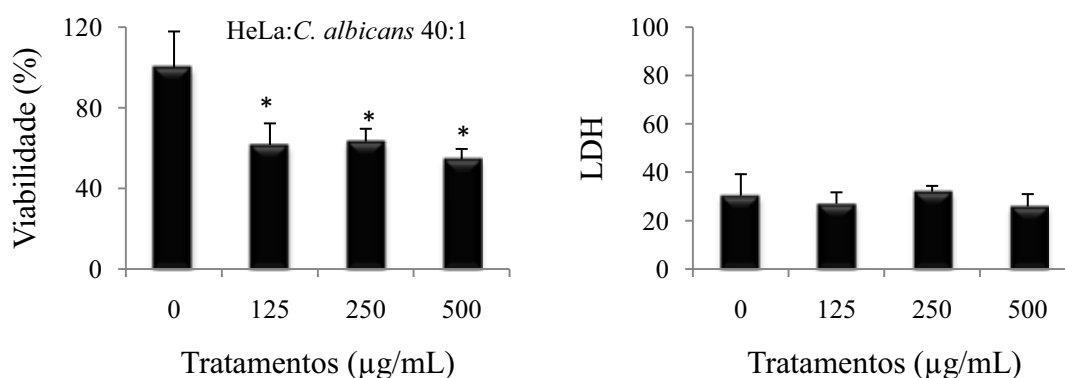


Figura 21. Efeito das diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* sobre a viabilidade do sistema células/*C. albicans* 40:1, e liberação de LDH de células HeLa neste sistema

Após observar que o extrato de escapos de *S. nitens* apresentou melhor efeito inibitório da formação de hifas, este extrato foi então analisado sobre colônias de 24 horas de *C. albicans*, utilizando a CIM (250 µg/mL), afim de verificar a capacidade de promover redução da hifa já filamentizada. Na observação sobre microscópio de luz invertida, observa-

se que após 24 horas houve significativa redução das hifas, tanto sobre *C. albicans* em meio quanto sobre o sistema *C. albicans* + células HeLa (Figura 22 a 24).

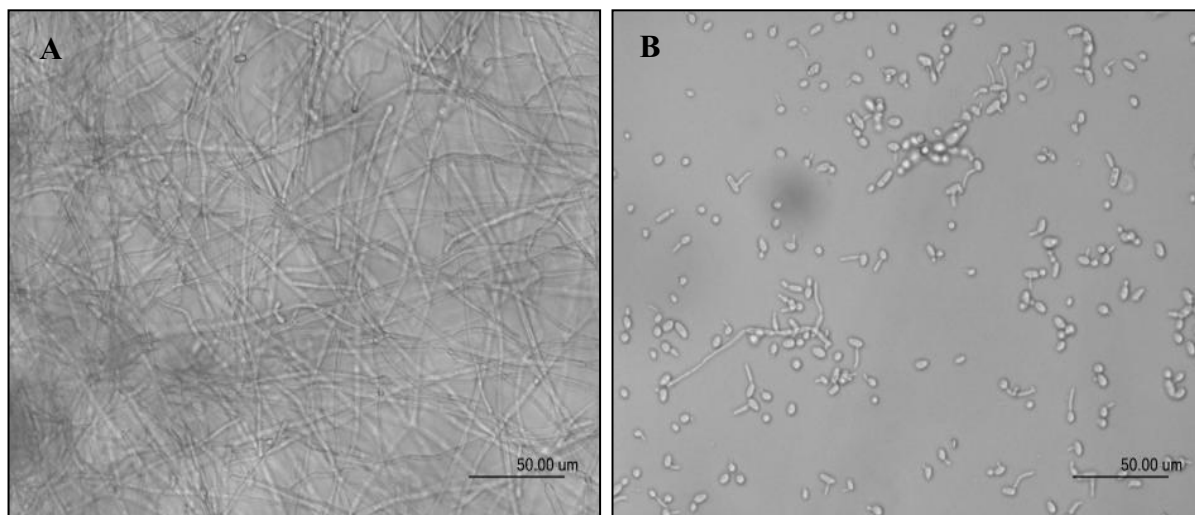


Figura 22. Efeito do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* (250 µg/mL) na redução da fase hifal de *C. albicans*. A = *C. albicans* filamentizada (24 h); B = *C. albicans* após tratamento com extrato (aumento 400x)

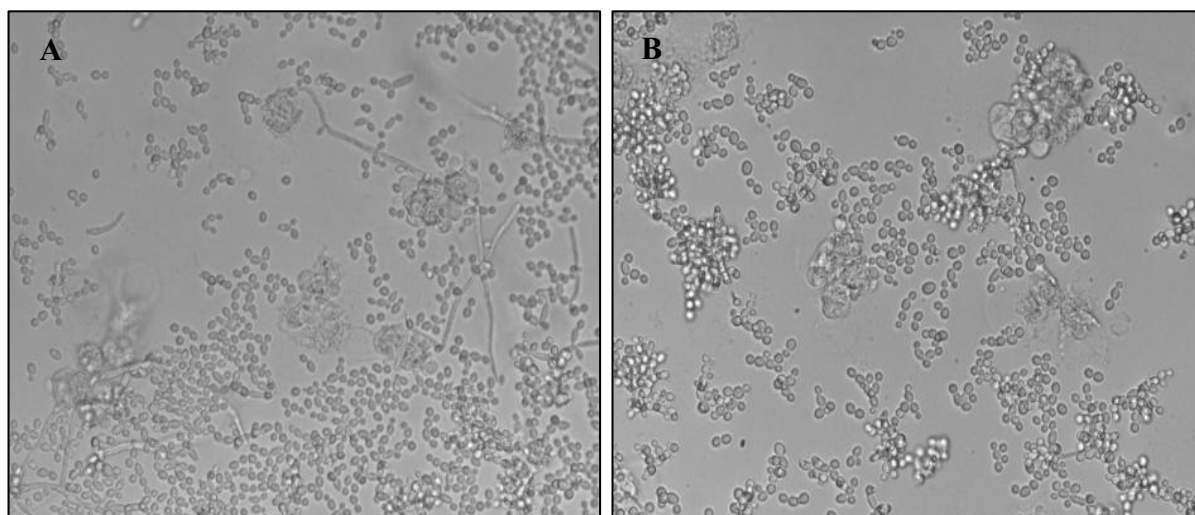


Figura 23. Efeito do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* (250 µg/mL) na inibição da formação de hifas de *C. albicans* sobre células HeLa infectadas após 24 horas. A = *C. albicans* (24 h); B = *C. albicans* após tratamento com extrato (aumento 400x)

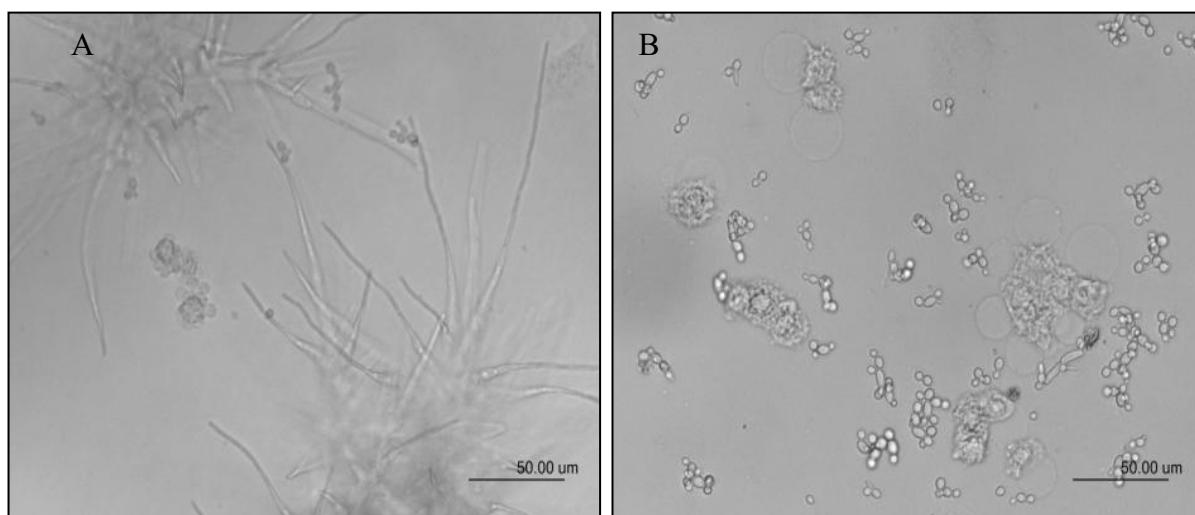


Figura 24. Efeito do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* (250 µg/mL) na redução da fase hifal de *C. albicans* sobre células HeLa após 24 horas. A = *C. albicans* filamentizada; B = *C. albicans* após tratamento com extrato (aumento 400x)

5.6 Controle microbiológico do creme vaginal

A Tabela 17 apresenta os resultados de contagem do número total de micro-organismos no creme, em UFC/g de creme, e observa-se que os valores estão de acordo com as recomendações oficiais para produtos não estéreis.

Tabela 17. Controle microbiológico do creme vaginal contendo extrato metanólico de escapos de *S. nitens*

Micro-organismos	Recomendação*	Resultado
Bactérias totais	$<10^3$ UFC/g	<10 UFC/g
Fungos e leveduras	$<10^2$ UFC/g	<10 UFC/g

* Farmacopéia Brasileira, 2010; Brasil, 1999

5.7 Atividade anti-CVV *in vivo*

Foi verificada a atividade hormonal frente à análise do fluido vaginal a fresco, após o 4º dia de administração subcutânea de solução de estradiol (0,2 mg/animal), onde pode-se observar a presença predominante de células epiteliais anucleadas, característico de estado de pseudo-estro (Figura 25). Antes de promover a infecção, uma amostra do fluido vaginal de cada rata foi coletada e em nenhum animal foi encontrado *C. albicans*. Ao dia 0 (dois dias após a infecção) todos os animais foram novamente amostrados para verificação da carga fúngica. O tratamento teve início após a confirmação da infecção que foi considerada positiva e suficiente para começar o tratamento com um mínimo de 10^2 UFC/mL. Os animais que apresentaram baixa carga fúngica, foram novamente infectados para que pudesse ser obtida uma carga inicial satisfatória para iniciar o tratamento. A Figura 26 mostra a presença de células epiteliais infectadas por *C. albicans*.

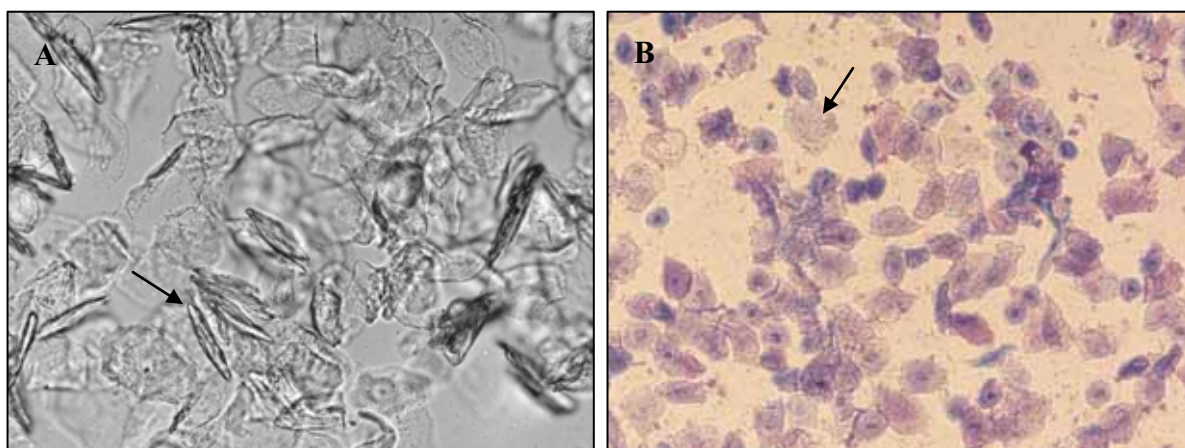


Figura 25. Epitélio vaginal em fase estro. Predominância de células cornificadas (células epiteliais anucleadas). A: observado a fresco (aumento 400x); B: Giemsa (aumento 200x)

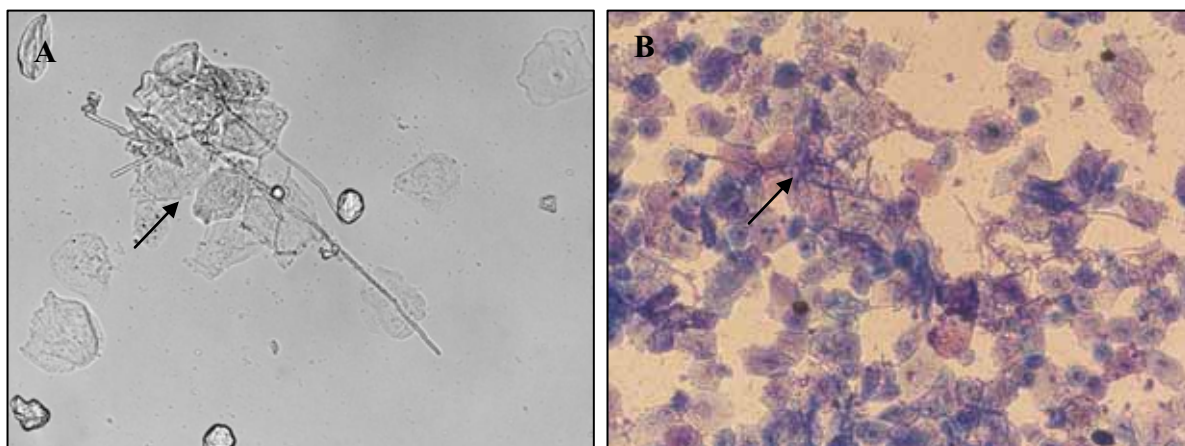


Figura 26. Células do epitélio vaginal infectadas. A: observação a fresco (aumento 400 x); B: Giemsa (aumento 200 x)

No 4º dia após o início do tratamento, amostras do fluido vaginal foram novamente coletadas para quantificação da carga fúngica, onde se pode observar que todos os animais do grupo infectados mantinham infecção (6/6), assim como os animais do controle creme base, enquanto que o número de animais dos grupos tratados com creme reduziu, apresentando em todos eles redução significativa da infecção comparada aos grupos controle da infecção e veículo (Figura 27 e Tabela 18). Os animais do grupo controle positivo, tratados com miconazol, tiveram a carga fúngica reduzida totalmente, sendo então, neste dia, considerados curados. No 8º dia após o início do tratamento, *C. albicans* foi detectada nos animais do grupo infectados em níveis significativamente elevados, assim como os animais do controle do veículo. Os grupos tratados com creme apresentaram redução total (0/6 – 100% de redução).

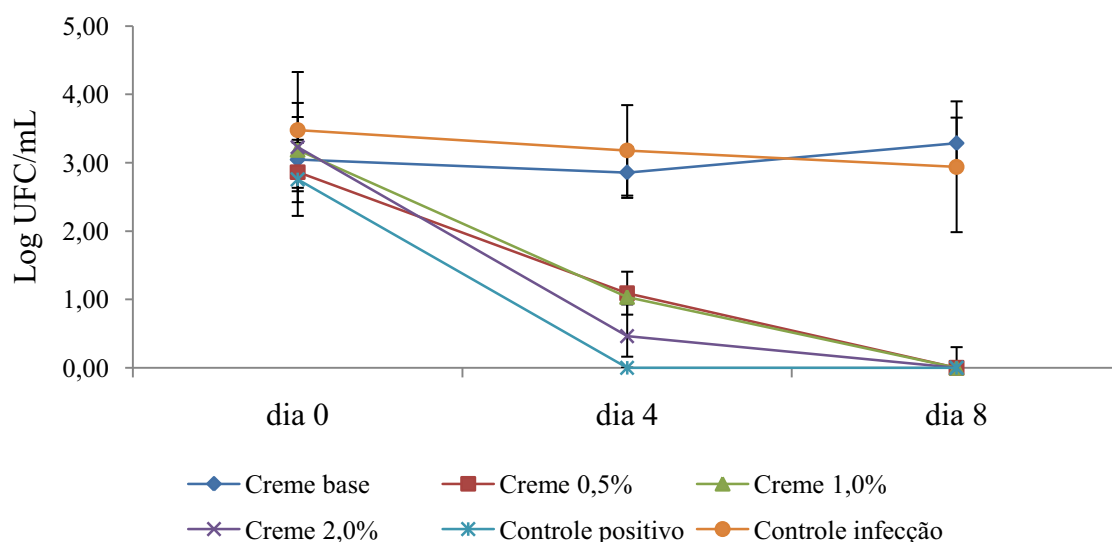


Figura 27. Efeito do creme vaginal contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de escapos de *S. nitens* sobre a carga fúngica vaginal de ratas infectadas com *C. albicans* e seus respectivos controles

Tabela 18. Número de animais infectados e quantificação da carga fúngica obtidos nos animais tratados com creme vaginal contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de escapos de *S. nitens* e seus respectivos controles

Grupos	Dia 0		Dia 4		Dia 8	
	Animais infectados (%)	Log UFC/mL $\pm$ DP	Animais infectados (%)	Log UFC/mL $\pm$ DP	Animais infectados (%)	Log UFC/mL $\pm$ DP
Controle Infecção	6/6 (100)	3,48 $\pm$ 0,85	6/6 (100)	2,18 $\pm$ 0,66	6/6 (100)	2,94 $\pm$ 0,96
Controle positivo	6/6 (100)	2,76 $\pm$ 0,53	0/6 (0)	0,0 $\pm$ 0,0*	0/6 (0)	0,0 $\pm$ 0,0*
Creme 0,5%	6/6 (100)	2,86 $\pm$ 0,09	3/6 (50)	1,09 $\pm$ 0,31*	0/6 (0)	0,0 $\pm$ 0,0*
Creme 1,0%	6/6 (100)	3,19 $\pm$ 0,15	2/6 (33,3)	1,04 $\pm$ 0,07*	0/6 (0)	0,0 $\pm$ 0,0*
Creme 2,0%	6/6 (100)	3,23 $\pm$ 0,65	2/6 (33,3)	0,46 $\pm$ 0,30*	0/6 (0)	0,0 $\pm$ 0,0*
Creme base	6/6 (100)	3,04 $\pm$ 0,62	6/6 (100)	2,86 $\pm$ 0,37	6/6 (100)	3,29 $\pm$ 0,37

* $P < 0,05$ comparado com controle + e controle infecção

A Tabela 19 mostra a média inicial e média final do peso corporal e o ganho de peso dos animais durante o período do experimento. Não se observa diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos comparados ao controle não infectados ($p > 0,05$).

Tabela 19. Análise da média inicial e média final do peso corporal e ganho de peso após 8 dias de tratamento dos animais tratados com creme contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de escapos de *S. nitens* e respectivos controles

Grupos de tratamentos (n=6)	Peso inicial ^a (g)	Peso final ^a (g)	Ganho de peso ^a (g)	Ganho de peso ^a (%)
Controle (não infectados)	174,0 ± 6,4	185,0 ± 4,8	10,9 ± 5,1	6,3 ± 3,1
Infectados	161,3 ± 16,0	176,1 ± 15,4	14,9 ± 5,6	9,4 ± 3,8
MCZ	163,8 ± 19,6	175,6 ± 23,1	11,9 ± 4,9	7,2 ± 2,5
Creme base	187,5 ± 7,7	193,9 ± 6,3	6,4 ± 3,6	3,5 ± 2,0
Creme 0,5%	159,5 ± 15,8	168,1 ± 12,1	8,6 ± 4,9	5,7 ± 3,9
Creme 1,0%	184,6 ± 13,3	192,6 ± 12,7	8,0 ± 1,2	4,4 ± 0,9
Creme 2,0%	167,3 ± 21,7	178,6 ± 20,1	11,3 ± 5,3	7,0 ± 3,2

^a Valores em média ± desvio padrão

A análise histológica mostra que nos animais não infectados (Figura 28) se observa o tecido íntegro e sem inflamação. Os animais infectados e não tratados (Figura 29) apresentam extensiva colonização no epitélio com numerosas hifas. A presença de infiltrados inflamatórios no útero, canal vaginal, vulva e uretra indicam houve disseminação da infecção em diferentes locais do sistema. Nos grupos controle do veículo (Figura 30), a presença de inflamação e de danos epiteliais permanece marcante. Nos animais tratados com miconazol (Figura 31) e com creme contendo o extrato (Figura 32), apesar de a infecção haver sido considerada inexistente após o último dia de tratamento, na análise histológica observa-se ainda a presença de infiltrados inflamatórios e descamações no epitélio vaginal, porém em

quantidades reduzidas. Todos os animais apresentam vacúolos no tecido epitelial, que podem ser depósitos de hormônio e estar relacionado à indução da fase pseudo-estro com estradiol.

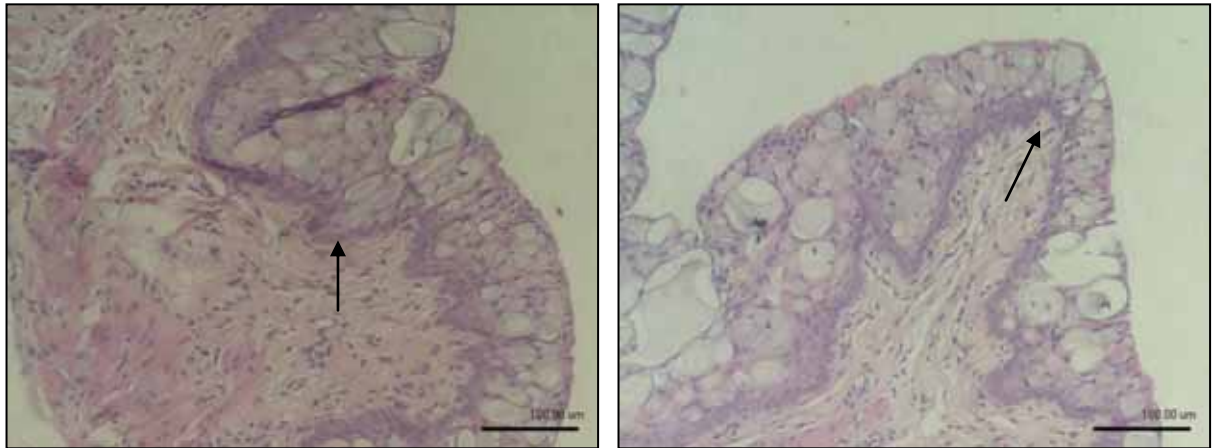


Figura 28. Secção de epitélio vaginal de animais não infectados (aumento 200x)

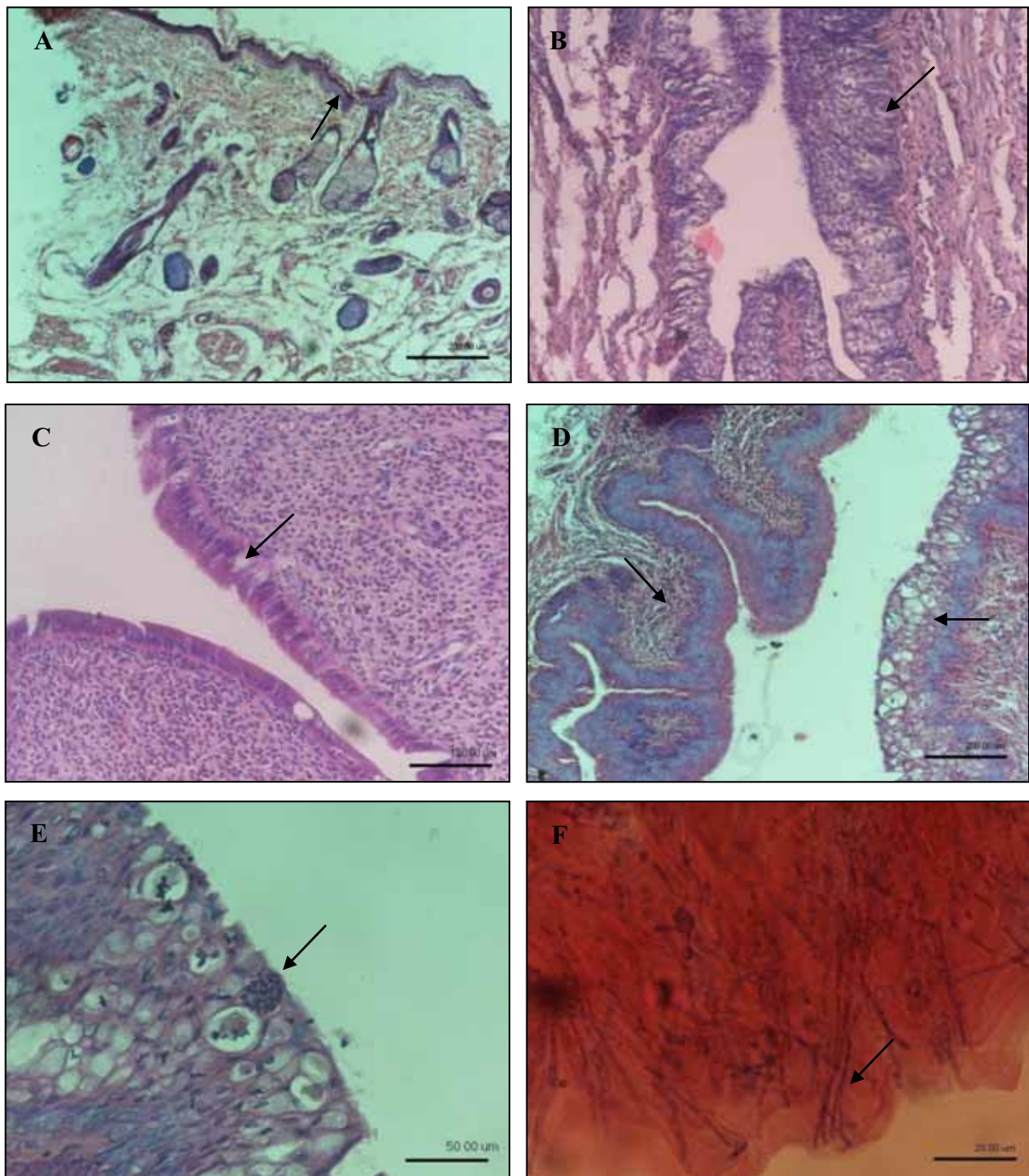


Figura 29. Secção de epitélio vaginal de ratas infectadas e não tratadas. A: secção de vulva apresentando infiltrado inflamatório (aumento 100x); B: secção de uretra com infiltrado inflamatório (aumento 200x); C: útero apresentando hiperplasia epitelial, inflamação e descamação do epitélio (aumento 200x); D: secção de epitélio vaginal apresentando infiltrado inflamatório e descamação do epitélio (aumento 100x); E: epitélio vaginal com vacúolo de infiltrado inflamatório (aumento 400x); F: detalhe de epitélio vaginal apresentando numerosas hifas aderidas ao epitélio (aumento 1000x).

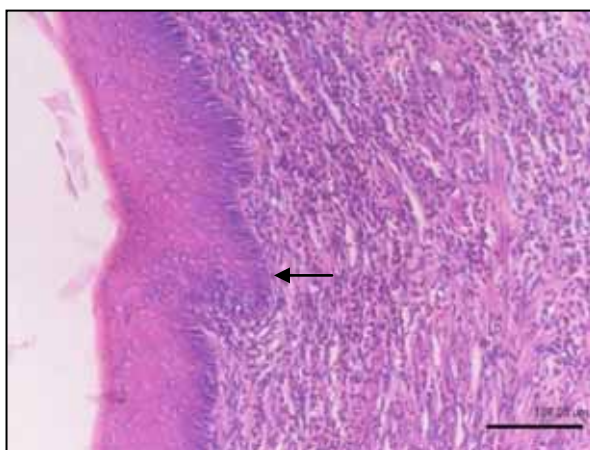


Figura 30. Secção de epitélio vaginal de ratas tratadas com creme base (veículo) (aumento 200x). Presença de infiltrados inflamatórios e descamação do epitélio

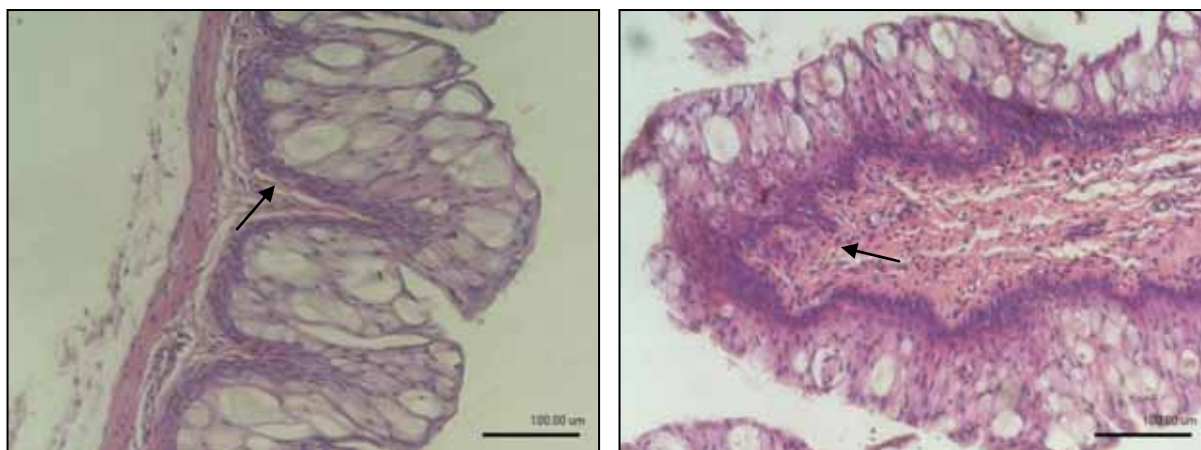


Figura 31. Secção de epitélio vaginal de ratas tratadas com creme vaginal de miconazol (controle positivo) (aumento 200x). Nota-se redução de infiltrados inflamatórios

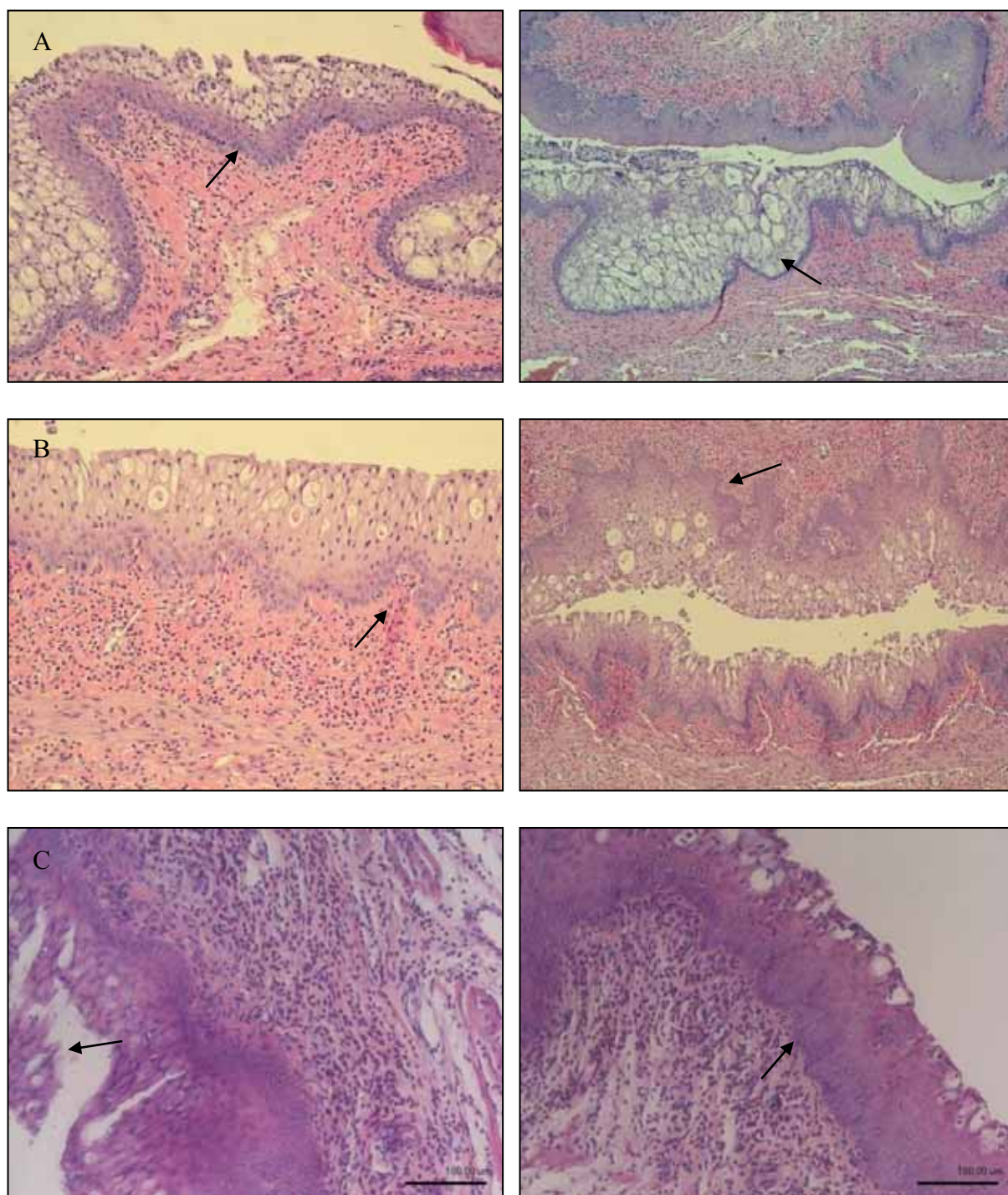


Figura 32. Secção de epitélio vaginal de ratas tratadas com creme vaginal contendo extrato de escapos de *S. nitens* a 2% (aumento 200x). A: creme 0,5%; B: creme 1,0%; C: creme 2,0%. Presença de infiltrado inflamatório, acantose, espongiose e danos no epitélio

5.8 Avaliação da mutagenicidade

Os resultados obtidos da análise da frequência de PCEMNs em sangue periférico de ratas Wistar (Figura 33), submetidas aos tratamentos agudo e subagudo com creme contendo extrato metanólico de escapos de *S. nitens* e respectivos controles estão apresentados nas Tabelas 20 e 21. Quando os resultados são somados (Tabela 20), observa-se que os animais tratados mostram frequências de PCEMNs semelhantes às aquelas apresentadas pelos animais do controle negativo, não mostrando diferenças estatisticamente significativas, revelando, assim, ausência de efeito mutagênico. Os tratamentos com o veículo (creme base) e com estradiol levaram a frequências de PCEMNs que não diferem estatisticamente em relação àqueles do controle negativo. Os valores médios de PCEMNs e IDN obtidos em sangue periférico dos animais submetidos aos diversos tratamentos estão apresentados na Tabela 21, juntamente com o desvio padrão (DP). Não houve redução significativa da porcentagem de PCEs em relação ao total de eritrócitos em todos os grupos de tratamento quando comparados aos animais do controle negativo, mostrando ausência de citotoxicidade dos diferentes tratamentos, nas condições utilizadas nesse trabalho. Na Figura 34 é mostrado os resultados referentes às frequências de PCEMNs, obtidos nos diferentes tratamentos e respectivos controles.

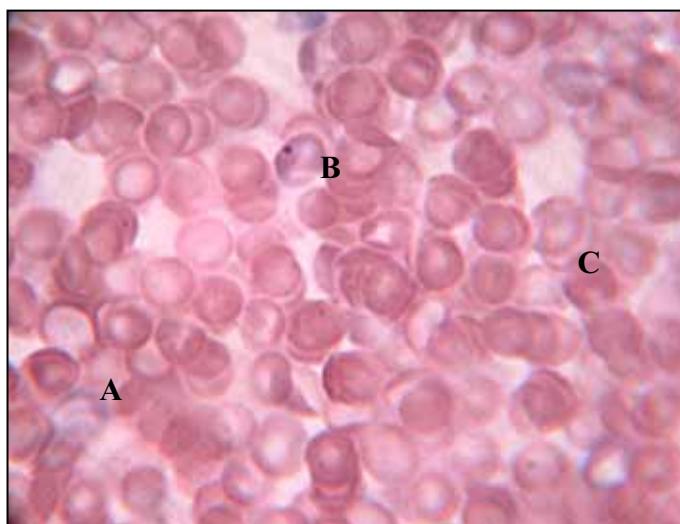


Figura 33. Eritrócito policromático sem micronúcleo (A); eritrócito policromático micronucleado (B); eritrócito normocromático (C)

Tabela 20. Somatória do número de PCEMNs e IDN em sangue periférico de ratas Wistar submetidas a tratamento agudo e subagudo com creme contendo extrato de escapos de *S. nitens* em diferentes concentrações e seus respectivos controles

Tratamentos	Agudo			Subagudo		
	Nº PCEMNs	% PCEMNs	IDN	Nº PCEMNs	% PCEMNs	IDN
Controle negativo	31	0,31	0,161	22	0,22	0,150
Creme base	25	0,25	0,199	19	0,19	0,130
Creme 0,5 %	18	0,18	0,174	23	0,23	0,201
Creme 1,0 %	17	0,17	0,163	27	0,27	0,160
Creme 2,0 %	22	0,22	0,179	21	0,21	0,177
Estradiol	27	0,27	0,173	-	-	-
CPA ^a	173	1,73	0,178	173	1,73	0,178

^a Significativamente diferente do controle negativo ($P > 0,05$)

Foram analisados 2000 células por animal, com total de 10000 PCEs por grupo de tratamento

Tabela 21. Frequências de PCEMNs e IDN em sangue periférico de ratas Wistar submetidas a tratamento agudo e subagudo com creme contendo extrato de escapos de *S. nitens* em diferentes concentrações e seus respectivos controles

Tratamentos	Agudo		Subagudo	
	Nº PCEMNs ^a	IDN ^a	Nº PCEMNs ^a	IDN ^a
Controle negativo	6,2 ± 2,8	0,161 ± 0,02	4,4 ± 2,3	0,150 ± 0,03
Creme base	5,0 ± 4,5	0,199 ± 0,04	3,8 ± 1,8	0,129 ± 0,02
Creme 0,5 %	3,6 ± 2,6	0,174 ± 0,04	4,6 ± 2,2	0,201 ± 0,02
Creme 1,0 %	3,4 ± 1,8	0,163 ± 0,03	5,4 ± 3,1	0,160 ± 0,05
Creme 2,0 %	4,4 ± 2,3	0,179 ± 0,03	4,2 ± 2,3	0,177 ± 0,04
Estradiol	5,4 ± 2,3	0,173 ± 0,03	-	-
CPA ^b	34,6 ± 6,8	0,179 ± 0,03	34,6 ± 6,8	0,179 ± 0,03

^a Valores em média ± desvio padrão; ^b Significativamente diferente do controle negativo ($P > 0,05$)

Foram analisados 2000 células por animal, com total de 10000 PCEs por grupo de tratamento

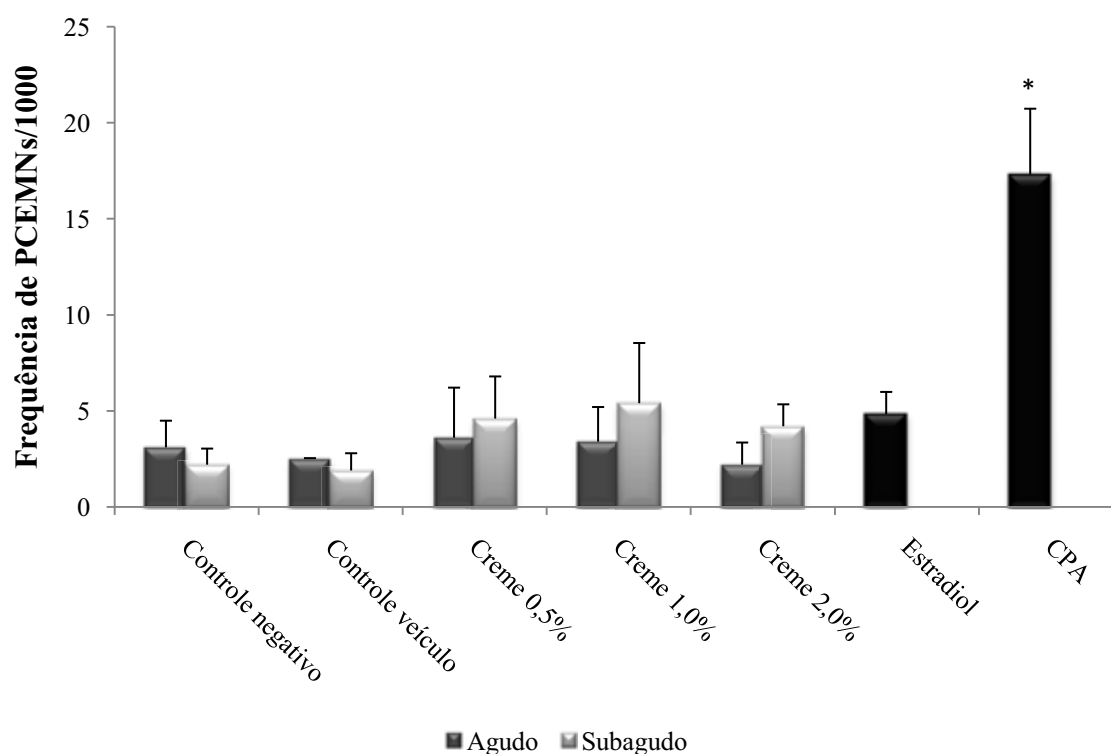


Figura 34. Frequência de PCEMNs obtidos em sangue periférico de ratas Wistar tratados com creme vaginal contendo diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* e respectivos controles. (*) Estatisticamente diferente do controle negativo ($p > 0,05$)

Discussão

6. DISCUSSÃO

As plantas constituem um enorme laboratório de síntese orgânica, produzindo a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, que são derivadas de processos de biotransformação de macromoléculas. Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes (Verpoorte et al., 2002; Simões et al., 2004). Porém, sabe-se que os produtos naturais identificados a partir de plantas têm proporcionado inúmeras descobertas na utilização clínica e continua a ser um componente essencial na busca de novos medicamentos (Balunas & Kinghorn, 2005).

A família Eriocaulaceae apresenta predominantemente flavonoides e naftopiranonas (Vilegas et al., 1999, Andrade et al., 1999, Santos et al., 1999). Dentre as substâncias estudadas neste trabalho incluiu-se duas xantonas inéditas na espécie *L. spiralis*, com padrão de oxigenação (1,3,5,6) e com um grupo carboximetoxi na posição 8. A ocorrência de xantonas, com o grupo COOCH_3 na posição 8 não é usual e a maioria das xantonas isoladas de plantas comumente apresenta um grupo metila na posição 3 (Santos et al., 2001). As xantonas são metabólitos secundários derivados da dibenzopirona. Seu nome é proveniente do grego *xanthos* que significa amarelo, decorrente de sua coloração característica. As agliconas xantônicas se distribuem no reino vegetal de forma significativa, principalmente nas plantas das famílias Guttiferae e Gentianaceae. São encontradas ainda nas famílias Moraceae e Polygalaceae, ou ainda em um número reduzido nas famílias Leguminosae, Loganiaceae, Lythraceae e Rhamnaceae. Seus derivados *O*-glicosilados encontram-se unicamente nas famílias Gentianaceae e Polygalaceae (Simões et al., 2004). Também foram identificadas pela primeira vez em *L. spiralis* as flavonas (4) e (5).

A escolha dos solventes para extração deve basear-se principalmente na seletividade que o mesmo apresenta pelas substâncias a serem extraídas (Simões et al., 2004).

O processo de extração realizado neste estudo baseou-se em submeter a droga vegetal à extração com solventes de polaridade crescente, primeiramente com hexano, em seguida com diclorometano e por último metanol. Este procedimento teve por objetivo concentrar o maior conteúdo de substâncias fenólicas no extrato metanólico. A partir da construção da curva analítica do flavonoide luteolina, pôde-se obter a equação da reta, que relaciona de forma direta o valor de absorbância de uma solução com a concentração de flavonoides nela presentes (em equivalentes de luteolina). A partir da equação da reta obtida pela curva analítica, foi calculado o teor de flavonoides nos extratos em estudo. A concentração de flavonoides totais também se deve ao comprimento de onda escolhido para a análise. O flavonoide luteolina apresenta pico de absorção a 351 nm, e assim os extratos foram analisados no mesmo comprimento de onda para se obter um valor real de flavonoides totais em equivalentes de luteolina. Os extratos apresentaram um alto teor de flavonoides. Esse fato correlaciona-se diretamente com as diferenças na polaridade dos solventes de extração utilizados e solubilidade de compostos fenólicos. Na verdade, o metanol (solvente polar) é considerado como um dos melhores solventes para a extração de compostos fenólicos. Observou-se que o maior conteúdo de flavonoides totais foi encontrado no extrato metanólico de escapos de *S. nitens*.

Alguns estudos relatam que muitas atividades biológicas, como a antioxidante e antimicrobiana, são devidos ao conteúdo de fenóis, como os flavonoides (Einbond et al., 2004; Banerjee et al., 2005; Choi et al., 2006). A análise química de espécies da família Eriocaulaceae tem mostrado a presença de um grande número de flavonoides (Santos et al., 1999; Santos et al., 2003; Fang et al., 2008; Silva et al., 2009a). Compostos fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas são bons agentes antioxidantes naturais (Van den Berg et al., 2000; Atoui et al., 2005). Desta forma, neste estudo, a atividade antioxidante dos extratos analisados, obtidos com o ensaio do ABTS^{•+}, pode ser correlacionada com o

conteúdo de flavonoides totais, sugerindo que os flavonoides nos extratos compõem uma parcela importante da atividade antioxidante.

O crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas é devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas, vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, em ácido ascórbico, tocoferóis, carotenoides e em compostos fenólicos e têm demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos (Wolfe et al., 2003; Manach et al., 2005). Alguns autores estudaram a composição de compostos fenólicos solúveis dos capítulos de 21 espécies de *Leiothrix*. A presença de luteolina *O*- e *C*-glucopiranosídeo foi determinada em espécies de *Leiothrix* (Dokkedal et al., 1992) e outro estudo determinou a presença de xantonas e flavonoides com atividade antioxidante em capítulos de *L. flavescens* e *L. curvifolia* (Santos et al., 2003).

Todos os extratos analisados apresentaram capacidade redutora do ABTS^{•+} em baixas concentrações e o extrato metanólico de folhas de *L. spiralis* apresentou melhor resultado de IC₅₀. Pode-se sugerir, então, que a capacidade antioxidante deste extrato se deva à presença de derivados da luteolina. Múltiplos mecanismos podem estar subjacentes ao efeito antioxidante da luteolina. Este flavonoide tem a capacidade de agir como um captador de EROs por meio de sua própria oxidação. Além disso, possui as estruturas essenciais para a atividade antioxidante dos flavonoides em geral: 3',4' hidroxilação, presença de uma dupla ligação entre carbonos 2 e 3 e um grupo carbonila no carbono 4. O átomo de hidrogênio a partir de um grupo hidroxila aromático pode ser doado aos radicais livres. Como um composto aromático, luteolina pode suportar elétrons desemparelhados em torno do sistema eletrônico, e pode ainda inibir a geração de oxidases e inibir diretamente as enzimas que catalisam a oxidação dos componentes celulares (Lin et al., 2008).

A presença de compostos fenólicos em espécies de Eriocaulaceae pode constituir um modelo promissor para se avaliar mecanismos envolvidos na atividade

antimicrobiana (Cushnie et al., 2005). Flavonoides apresentam efeitos inibitórios contra múltiplos micro-organismos. As ações resultam de uma interação destes compostos com a membrana celular dos micro-organismos alvo, provavelmente devido à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e com a parede celular (Cowan, 1999).

Métodos de diluição em meio líquido são comumente utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. A prova de sensibilidade por este método foi uma das primeiras a serem desenvolvidas, servindo ainda hoje como método de referência (NCCLS, 2003; Langfield et al., 2004). Outro aspecto vantajoso desta metodologia é a possibilidade de se utilizar mais de uma substância-teste, bem como diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio. Possibilita ainda demonstrar qual a concentração mínima da substância-teste necessária para inibir o crescimento microbiano (Cowan, 1999; Palomino et al., 2002; Langfield et al., 2004)

Os resultados de CIM para as atividades antibacteriana e antifúngica mostraram que os compostos B (fração flavona e xantona (5)+(6)) e C (xantona (7)) apresentaram capacidade de inibir o crescimento da maioria das bactérias testadas, e o composto C mostrou os melhores resultados contra todas as espécies de leveduras testadas. Não foi evidenciada atividade contra *E. coli* pelas flavonas testadas, mas esta ação foi observada pelo composto B sugerindo que a associação de flavona e xantona promoveu melhor atividade antimicrobiana. O menor valor de CIM obtido desta associação foi de 31,25 µg/mL contra *P. aeruginosa* e essa atividade encontrada pode ser considerada promissora levando-se em conta que esta bactéria é pouco sensível a antibióticos de primeira escolha (Livermore, 1992; Troillet et al., 1997) e também que *P. aeruginosa* é responsável por grande parte das infecções nosocomiais (Jarvis & Martine, 1992; Sader et al., 2001). Além disso, Dharmaratne et al. (1999) descreveram que uma xantona isolada de *Calophyllum moonii* e *C. lankensis*, apresentou forte atividade contra espécies resistentes de *S. aureus* em baixas concentrações. Iinuma et al. (1996) isolaram uma xantona de *Garcinia dioica*, com

significativa atividade contra espécies de *Staphylococcus* resistentes à vancomicina. A atividade antibacteriana *in vitro* de xantonas sugere que estes compostos se apresentam como substâncias promissoras para uso farmacêutico.

Todas as outras substâncias testadas apresentaram atividade antibacteriana seletiva, apresentando principalmente atividade contra bactérias Gram-positivas. Isso se deve as diferenças nas camadas de contorno dessas bactérias, uma vez que as Gram-negativas possuem membrana externa, parede celular e membrana interna estando a membrana diretamente relacionada a menor difusão de compostos para o interior da bactéria, devido a presença dos lipopolissacarídeos (Burt, 2004).

Os extratos e compostos isolados apresentaram atividade contra todas as espécies de leveduras. A atividade antifúngica dos compostos fenólicos é atribuída a algumas propriedades lipofílicas, que determinam a sua capacidade de penetrar a membrana plasmática e induzir mudanças nas propriedades físico-químicas da parede, membrana e/ou organelas celulares (Knobloch et al., 1987). A capacidade antioxidante também tem sido considerada importante como mecanismo de ação antifúngica de compostos fenólicos. Uma hipótese é que durante o estresse, os fungos respondem por controlar a produção de metabólitos e trabalhos demonstram que compostos fenólicos exercem sua ação antioxidante sobre enzimas relacionadas à biossíntese destes metabólitos (Dambolena et al., 2010; Dambolena et al., 2011). O extrato de escapos de *S. nitens* demonstrou melhor atividade frente as espécies de *Candida* testadas. Dessa forma, este extrato foi testado frente a isolados clínicos de *C. albicans* e apresentou atividade contra essas leveduras. Por estes motivos, o extrato de escapos de *S. nitens* foi, então, incorporado em uma formulação na qual a capacidade antifúngica *in vivo* frente a modelo experimental de CVV foi avaliada.

Diversos autores descreveram a atividade antibacteriana e antifúngica de flavonoides. Kuete et al. (2008) reportaram atividade antibacteriana, antifúngica e antimicobacteriana de luteolina isolada de casca da raiz de *Ficus chlamydocarpa*. Fang et al.

(2008) encontraram cinco compostos fenólicos, dentre eles xantonas e flavonas, que foram isoladas da espécie *Eriocaulon buergerianum*, que apresentaram potencial ação antibacteriana contra *S. aureus*. Silva et al. (2009a) descreveram a atividade antifúngica do extrato metanólico de *L. spiralis*, porém apresentando valores de CIM maiores que 1 mg/mL. Neste trabalho encontraram-se valores de CIM menores que os reportados. Esta ação apresentada pelos extratos pode ser devido ao conteúdo de flavonoides, principalmente à aglicona luteolina, que apresentou atividade frente a todos os micro-organismos testados. Os dados obtidos deste estudo sugerem que os flavonoides e xantonas estão entre as classes químicas responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos vegetais deste estudo.

São diversos os fatores de virulência que contribuem para a infectividade de *C. albicans*, sendo alguns ainda não bem definidos, estando sob investigação. Alguns desses fatores incluem a secreção de proteases, fosfolipases e a capacidade de alterar a morfologia das células leveduriformes de brotamento a forma de hifas ou filamentos (Low et al., 2008). A transformação da fase leveduriforme para a fase de hifa é influenciada pelas condições ambientais e na patogênese a forma filamentada é mais patogênica que a forma leveduriforme. *C. albicans* existe na forma de levedura na pele e mucosas e torna-se invasiva na forma de hifas (Ogasawara et al., 2007). A capacidade deste fungo de mudar sua morfologia passando de células leveduriformes a hifas e, assim, aderir às células e posteriormente penetrar tecidos do hospedeiro, continua a ser um importante determinante de virulência na infecção invasiva (Low et al., 2008). Ambas células, leveduriformes e hifais, estão presentes no hospedeiro durante crescimento comensal e durante a infecção. As hifas são túbulos longos, delgados e contínuos com septos que separam cada núcleo e são estruturas que exercem importante papel na invasão da mucosa e as torna resistentes a ação de células de defesa como macrófagos e neutrófilos (Zhang et al., 2006).

A inibição e a redução da formação de hifas foi observada, pelo extrato de escapos de *S. nitens* em todas as concentrações testadas, após 12 e 24 horas, o que sugere que

a atividade antifúngica exercida deva-se tanto à inibição da formação como à redução desta estrutura particular de fungos. Estes resultados constituem uma referência importante para a caracterização da ação antifúngica dos extratos estudados.

Os flavonoides podem não só afetar as membranas microbianas, mas também as de células de mamíferos. Estudos têm demonstrado que flavonoides têm a capacidade de inibir a proliferação de células de mamíferos *in vitro*, principalmente células tumorais (Rocha-Guzmán et al., 2009; Tamaki et al., 2011).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* são os primeiros testes utilizados para avaliar a toxicidade de novos compostos para aplicação terapêutica e vêm sendo empregados como adjuvante dos testes *in vivo*, possibilitando a substituição ao uso de animais na avaliação da toxicidade de substâncias e preparações (Valadares, 2006). Neste trabalho foram utilizados os ensaios de liberação de LDH e de redução de MTT, que estão entre os testes mais comuns utilizados para a detecção de citotoxicidade após a exposição a substâncias tóxicas. É recomendado que mais de um ensaio seja utilizado para determinar a viabilidade celular em estudos *in vitro*, uma vez que pode garantir a qualidade e aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos (Fotakis & Timbrell, 2006).

Este estudo foi conduzido com os extratos metanólicos de folhas de *L. spiralis*, de capítulos e escapos de *S. nitens* e o flavonoide luteolina. O extrato metanólico de folhas de *L. spiralis* apresentou-se citotóxico nas concentrações acima de 500 µg/mL. Os ensaios de citotoxicidade pelo MTT revelaram perfis semelhantes para luteolina e extrato de folhas de *L. spiralis*, mostrando diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas e o crescimento basal, indicativo de morte celular. O ensaio de liberação de LDH revelou significativo aumento após exposição celular aos compostos em relação aos níveis basais, o que sugere que a ação citotóxica apresentada se deve a danos na membrana celular. Os extratos de *S. nitens* não apresentaram citotoxicidade nestas condições.

Preparações obtidas de plantas proporcionam uma mistura complexa de diferentes substâncias químicas, as quais podem atuar sinérgica ou antagonicamente na indução da citotoxicidade (Chung et al., 2004; Serafin et al., 2007; Huang et al., 2008; Kwak et al., 2009). Estudos com culturas celulares de mamíferos começaram a elucidar os mecanismos subjacentes do potencial efeito protetor de componentes de plantas contra a carcinogênese, incluindo efeito antimutagênico de extratos e compostos naturais contra os agentes indutores de danos celulares (Resende et al., 2007; Munari et al., 2008; Furtado et al., 2009; Tavares et al., 2011). As células são muito suscetíveis à oxidação leve, por exemplo, com soluções diluídas de peróxido de hidrogênio. Estas mudanças podem ser protegidas por adição de compostos antioxidantes diversos, como os flavonoides. Portanto, é possível sugerir que os flavonoides ofereçam proteção contra o câncer através de suas propriedades antioxidantes (Cutter et al., 2001).

O flavonoide luteolina foi avaliado isoladamente quanto à citotoxicidade por ser um composto importante presente na composição dos extratos vegetais em estudo, tanto como aglicona quanto seus glicosídeos. Os resultados indicaram citotoxicidade deste composto nas diferentes concentrações testadas. A luteolina mostrou forte atividade anti-proliferativa contra diferentes linhas de células tumorais humanas, incluindo câncer de pulmão, leucemia mieloide, câncer de próstata e câncer de pâncreas (Wu et al., 2008). Alguns estudos indicam que a luteolina apresenta ações no crescimento, no controle do ciclo celular e no apoptose em vários tipos de células (Selvendiran et al., 2006; Lim et al., 2007; Chiu & Lin, 2008). Wu et al. (2008) mostraram a citotoxicidade de luteolina sobre células AGS (linha celular de câncer gástrico humano) pelo teste do MTT. Estudos demonstraram que a citotoxicidade de luteolina pode estar relacionada à presença de 2,3-dupla ligação no anel heterocíclico (anel C) (Figura 35), à *orto*-hidroxilação no anel B e ao número de hidroxilas na estrutura. Sabe-se, também, que a substituição na posição C3 por um glicosídeo diminuem a citotoxicidade destes compostos em relação à aglicona (Chang et al., 2008).

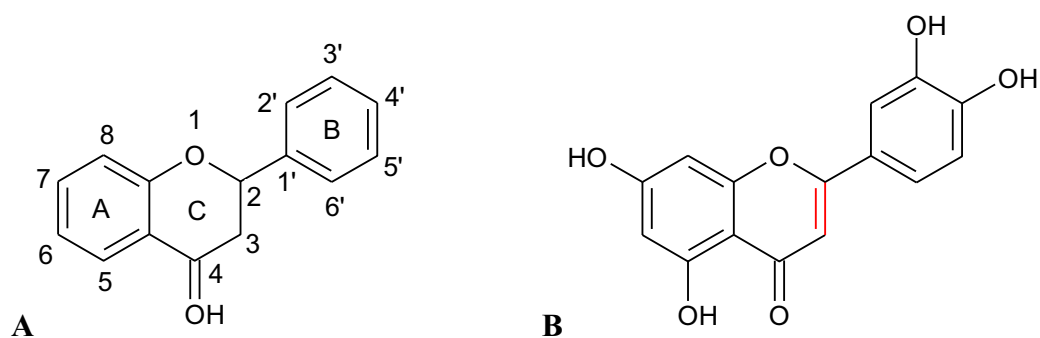


Figura 35. (A) Estrutura geral dos flavonóis; (B) luteolina (dupla ligação entre posições 2,3)

A atividade antioxidante está envolvida na prevenção do câncer na fase inicial, enquanto atividade antiproliferativa está alvejando células cancerosas em estágios de promoção e progressão. No entanto, deve-se notar que usando o MTT, não é possível diferenciar entre a inibição do crescimento celular e o aumento da morte celular (García-Alonso et al., 2006). Enquanto isso, o ensaio de liberação de LDH revelou toxicidade após exposição em concentrações iguais, portanto, o extrato de *L. spiralis* e luteolina promoveram a ruptura da membrana de células HeLa. A este respeito, dados de estudos enfocando a elucidação das bases moleculares da atividade antiproliferativa de polifenóis indicam que atuam tanto na inibição do crescimento celular quanto na indução de morte celular (Lin et al., 2008; García-Alonso et al., 2006; Luo et al., 2011; Lazzè et al., 2004). Além disso, dados de estudos de outras culturas de células sugerem que o mecanismo pelo qual os compostos fenólicos modulam a proliferação celular é notavelmente dose dependente (García-Alonso et al., 2006; Selvendiran et al., 2006). A inibição de crescimento de células HeLa foi evidente após um tratamento com concentrações crescentes do extrato de folhas de *L. spiralis* e luteolina. Isso indica que os polifenóis presentes no extrato imediatamente iniciaram uma série de eventos celulares que levaram à inibição da proliferação celular e/ou a indução de morte celular.

A toxicidade *in vitro* de vários extratos de plantas sobre a membrana da célula vermelha foi estudada e correlacionada com os seus constituintes (Bukowska & Kowalska,

2004; Robert et al., 2010). Vários mecanismos não específicos podem causar hemólise. A atividade hemolítica pode ser um resultado da formação de poros nas membranas celulares alterando sua permeabilidade, e promovendo a ruptura da célula. Alguns compostos como flavonoides podem causar oxidação de hemoglobina produzindo meta-hemoglobina e assim causar hemólise (Mukherjee & Rajasekaran, 2010). Por outro lado, flavonoides atuam como protetores de membranas biológicas contra indução de danos oxidativos induzidos por radicais livres e/ou EROs (Asgary et al., 2005). Eles capturam as EROs e, em alguns casos também interagem com as proteínas celulares, especialmente com proteínas heme, que exercem suas funções fisiológicas, a oxidação e a redução do ferro (Kitagawa et al., 2004). A estabilidade mecânica da membrana de eritrócitos é importante como indicador de citotoxicidade e o ensaio de hemólise *in vitro* é bastante empregado para a avaliação toxicológica de extratos vegetais (Sharma & Sharma, 2001; Bukowska & Kowalska, 2004; Mukherjee & Rajasekaran, 2010). A avaliação da ação hemolítica de agentes antifúngicos torna-se importante também na caracterização da citotoxicidade, visto que alguns fármacos antifúngicos apresentam hematotoxicidade, como por exemplo, anfotericina B que induz queda na produção de eritrócitos e é altamente nefrotóxica (Fanos & Cataldi, 2000). Nas condições utilizadas neste estudo, os extratos analisados, assim como o flavonoide luteolina, não apresentaram ação hemolítica.

Observando que o extrato metanólico de escapos de *S. nitens* mostrou melhores resultados na atividade antifúngica e não apresentou citotoxicidade sobre células HeLa, estas células foram infectadas e posteriormente tratadas com este extrato, obtendo-se assim um modelo mimético para avaliação da ação antifúngica em um sistema biológico. Células HeLa foram utilizadas por se tratar de uma linhagem de células epiteliais humanas bem caracterizadas, e pelo tecido cervical se tratar de um sítio favorável à infecção por *Candida* sp. em episódios de CVV humana (Souza et al., 2009). O ensaio foi realizado conforme o teste do MTT, que é reduzido a formazan por ação de células viáveis, o que identifica a

presença de células vivas. Neste caso, a redução do MTT pode ser por ação tanto do metabolismo celular quanto do metabolismo do fungo. Por este motivo, o sistema foi então monitorado pelo teste de liberação de LDH, que é uma enzima presente em células humanas, porém não em células do fungo. As células também foram desafiadas pela adição de *C. albicans*, que não promoveram redução de viabilidade celular. Dessa forma, visto que o sistema tratado não apresentou aumento de liberação de LDH em relação aos níveis basais, e sabendo-se que o extrato não promove redução da viabilidade celular, pode-se definir que a redução da viabilidade do sistema é devido à redução da infecção por *C. albicans*.

O extrato também foi avaliado quanto à capacidade de inibir a formação de hifas de *C. albicans* e também reduzi-las sobre células HeLa infectadas. O extrato foi avaliado na CIM (250 µg/mL). As imagens registradas em microscópio de luz invertida mostraram que esta ação foi observada, o que sugere que a capacidade antifúngica deste extrato deva-se à atuação tanto sobre a formação quanto sobre a redução de hifas, tornando-se importante na caracterização da atividade antifúngica deste extrato.

Os resultados obtidos com o extrato metanólico de escapos de *S. nitens* estimularam a incorporação do extrato em um creme para administração intravaginal e a realização do estudo *in vivo* em um modelo animal de CVV. O creme preparado foi submetido ao controle microbiológico, onde não houve crescimento na contagem de micro-organismos totais. O controle de qualidade microbiológico de produtos não-estéreis, que inclui produtos de uso tópico, assegura que a carga microbiana presente no produto, seja no aspecto qualitativo ou quantitativo, não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do uso (Pinto et al., 2003). Pode-se sugerir que a ausência de micro-organismos totais se deva à possível ação conservante do extrato de escapos de *S. nitens*, visto que este extrato apresenta atividade antimicrobiana. Em virtude da ausência de bactérias totais, fez-se desnecessária a pesquisa de bactérias patogênicas.

Existe um grande número de fármacos antifúngicos disponíveis. Os principais agentes são pertencentes aos polienos, como a anfotericina B e nistatina, ou aos azólicos, tais como fluconazol e itraconazol. Estudos têm indicado uma diminuição da sensibilidade de *C. albicans* aos azólicos (Sanglard & Odds, 2002) e efeitos tóxicos como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade associada ao uso polienos, particularmente anfotericina B (Kauffman & Carver, 1997; Fanos & Cataldi, 2000). A fim de transpor todos estes inconvenientes é necessária a busca por novos produtos mais eficazes e seguros para o tratamento de infecções fúngicas.

A patogênese da CVV envolve uma aderência inicial da levedura na mucosa vaginal, seguida de colonização assintomática onde as leveduras passam a desenvolver um estado infeccioso (sintomático). Isso ocorre quando o local de colonização no hospedeiro é favorável ao desenvolvimento das leveduras, normalmente como consequência de um fator de predisposição, tais como a diminuição da resposta imunológica observada em enfermidades imunocomprometidas, diabetes mellitus, gravidez ou uso crônico de corticoides. Outros fatores que contribuem são o uso de antibióticos, terapia estrogênica, pequenos traumas ocorridos durante o ato sexual, uso de roupas sintéticas e a dieta. Na ausência desses fatores, observações clínicas mostram que a CVV ocorre predominantemente durante a fase luteal do ciclo menstrual, quando os níveis de estrógeno e progesterona são altos. A resposta do epitélio e do estroma cervical vaginal de roedores a esteroides sexuais são similares a de humanos. Assim, mudanças no epitélio vaginal dependem da fase do ciclo estral (Repentigny, 2004; Naglik et al., 2008).

O modelo experimental utilizado foi baseado em imunossupressão e indução da fase estro com tratamento hormonal. Em modelos experimentais *in vivo* de CVV, a chave para estabelecer uma infecção persistente é a manutenção prolongada de estado pseudo-estro. Este estado é frequentemente induzido por administração subcutânea de estradiol. Na ausência de tratamentos com estrógeno, a infecção é curta com baixa carga fúngica vaginal (Naglik et al.,

2008). A dose de estradiol utilizada neste estudo foi eleita baseada em estudos que mostraram que esta concentração foi efetiva na indução e manutenção do estado pseudo-estro (Carrara et al., 2009). A administração de estradiol transforma a coluna epitelial em epitélio escamoso grosso e aumenta o conteúdo de glicogênio, pH e crescimento de substratos, que aumentam a suscetibilidade local à colonização do fungo e facilitam a adesão e desenvolvimento de *C. albicans* no tecido. Estrógeno pode também inibir as defesas imunes inatas e adaptativas (Naglik et al., 2008).

Nos modelos de CVV *in vivo*, o uso de alguma técnica de imunossupressão é válida como forma de obter colonização fúngica em curto tempo. Alguns modelos de infecção de mucosa foram descritos, com infecção persistente, usualmente requerendo alguma forma de imunossupressão ou intervenção terapêutica (Martinez et al., 2001; Chami et al., 2004). Sem alguma forma de imunossupressão ou outro tipo de manipulação, a carga fúngica no animal é variável e frequentemente declina rapidamente. Foi demonstrado em ratos e camundongos que após a infecção inicial se estabelece, sem o uso de agentes imunossupressores, depois de uma semana a carga fúngica reduz naturalmente para um estado de portador (Naglik et al., 2008). Chami et al. (2004) utilizaram ratas ovariectomizadas e tratadas com estradiol, e compararam, nestas condições, ratas imunossuprimidas e não-imunossuprimidas, verificando que no segundo caso, animais inoculados com *C. albicans* não apresentaram infecção, concluindo que a imunossupressão é um complemento necessário para o sucesso deste modelo. Foldvari et al. (2000) desenvolveram e validaram um modelo animal de CVV para aplicação na triagem e avaliação da eficácia antifúngica de sistemas de liberação tópica de fármacos. Os animais sem imunossupressão não sustentaram a infecção além de 2 a 3 dias, no entanto, em animais imunossuprimidos com CPA, a infecção pode ser mantida durante cerca de duas semanas, sendo, dessa forma, considerada adequada para o teste de terapias tópicas antifúngicas. Diversas substâncias têm sido empregadas em modelos de imunossupressão em animais, como a dexametasona, a ciclosporina, a ciclofosfamida e o

metotrexato. Porém, o efeito destes compostos não é o mesmo em todas as espécies. Em roedores a CPA é capaz de inibir a produção de anticorpos, e atua em células com alta atividade mitótica, inibindo as respostas imunes humoral e celular (Foldvari et al., 2000, Naglik et al., 2008).

Foi observado que uma suspensão de *C. albicans* contendo 5×10^7 UFC (0,1 mL) foi suficiente para estabelecer infecção quando instilada intravaginalmente, em ratas em estado pseudo-estro e imunossuprimidas (Dhawan et al., 2009; Carrara et al., 2010). Carrara et al. (2010) mostraram que, com esta suspensão, 100% das ratas desenvolveram e mantiveram a infecção durante 3 semanas de experimento. A infecção foi monitorada 2 dias após inoculação para verificação da carga fúngica, através de cultivo do fluido vaginal obtido por lavagem. Foi previamente estabelecido que a infecção fosse considerada positiva e suficiente para iniciar o tratamento apresentando no mínimo 10^2 UFC/mL. Dessa forma, os animais que não apresentaram colonização suficiente de *C. albicans* foram novamente inoculados com a mesma suspensão da levedura.

Embora alguns estudos já tenham sido desenvolvidos em animais maiores, incluindo macacos, pequenos mamíferos como ratos e camundongos são frequentemente escolhidos para tais estudos por razões econômicas e por sua relativa similaridade a humanos em termos imunológicos e anatômicos (Samaranayake & Samaranayake, 2001; Chamilos et al., 2007). Este experimento mostrou a suscetibilidade de ratas da linhagem Wistar, que foram bem adaptadas para o desenvolvimento e manutenção da CVV. Estes animais são de fácil manuseio e extremamente úteis como modelos experimentais *in vivo* para o sistema genital feminino. Estudos anteriores indicaram resistência de algumas linhagens de camundongos à infecção vaginal por *C. albicans* (Calderon et al. 2003; Clemons et al. 2004).

O modelo experimental de CVV tem sido utilizado para avaliação da eficácia antifúngica de produtos de origem vegetal. Dhawan et al. (2009) avaliaram a eficácia da associação de dois compostos obtidos a partir *Mentha* spp. em modelos imunossuprimidos

com CPA e tratamento hormonal, e observaram que em cinco dias de tratamento, a carga fúngica foi reduzida significativamente comparado ao grupo não tratado. Mondello et al. (2003) e Mondello et al. (2006) investigaram a atividade anti-CVV *in vivo* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e de seu componente bioativo, terpinen-4-ol, respectivamente. Ambos apresentaram-se ativos frente a diferentes cepas de *C. albicans* no modelo de infecção vaginal em ratas. Zhang et al. (2006) investigaram a atividade anti-*Candida* em modelos *in vivo* de uma saponina esteroideal isolada da espécie *Tribulus terrestris* L., encontrando significativa atividade antifúngica após 14 dias de tratamento. Chami et al. (2004), utilizando modelo de ratas imunossuprimidas, observaram redução da carga fúngica vaginal utilizando uma dose 2 x CIM dos compostos fenólicos carvacrol e eugenol, extraídos do óleo essencial de orégano, administrados 2 x por dia. O tratamento com carvacrol, em 7 dias, levou a exibir cultura de *Candida* negativa, o que foi confirmado pelo exame histológico, e os animais tratados com eugenol exibiram significativa redução de UFC comparado ao grupo controle.

Neste trabalho foi examinada especificamente a atividade terapêutica de extrato metanólico de escapos de *S. nitens*, incorporado a formulação, em um modelo experimental de CVV. Após o 4º dia de tratamento com os cremes contendo o extrato a 0,5, 1,0 e 2,0%, a carga fúngica foi reduzida significativamente. No 8º dia, foi observada 100% de redução da infecção.

O estudo histológico dos animais dos grupos tratados com creme vaginal mostrou a presença de microabscessos residuais de infiltrado inflamatório, descamação epitelial e hiperqueratose. Apesar de o tratamento com extrato ter completamente erradicado a carga fúngica vaginal, o produto por si só não foi capaz de diminuir os sinais de inflamação. Histologicamente, o epitélio vaginal dos animais do grupo MCZ não foi diferente daqueles do grupo não-infectado.

Muitos compostos antimicrobianos sintéticos, de aplicação intravaginal, apresentam algum tipo de citotoxicidade, e tais agentes parecem causar irritação da mucosa

vaginal e inativação da flora normal vaginal quando usados frequentemente em doses clínicas efetivas, além de efeitos genotóxicos. O metronidazol, indicado para tratamento de tricomoníase e algumas infecções bacterianas vaginais, mostrou significativo efeito genotóxico em análise de PCEMNs em medula óssea em camundongos, e mostrou também genotoxicidade em células da mucosa vaginal de ratas (Ornelas-Aguirre et al., 2006). Em análise do efeito genotóxico de miconazol, em tratamento agudo e subagudo, observou-se significativa indução de aberrações cromossômicas dose-dependente em ratos (Hassan & Hassan, 1997). Muitas plantas apresentam em sua constituição compostos químicos que podem ser citotóxicos ou genotóxicos, podendo até mesmo estar relacionados ao desenvolvimento de tumores (Ames, 1983). Assim, verifica-se que é imperativa a realização de ensaios para a avaliação da mutagenicidade de produtos naturais.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determina através da Resolução nº 90 de 16 de março de 2004 que, para concessão de registro de medicamento fitoterápico, devem ser realizados testes quanto à sua toxicidade aguda ou por doses repetidas, bem como quanto à genotoxicidade. Para a avaliação da genotoxicidade, caso os fitoterápicos sejam utilizados em tratamentos de longa duração, a ANVISA determina que sejam empregados os testes de Ames e do Micronúcleo. Várias outras agências internacionais citam o teste do micronúcleo sendo um dos primeiros de uma série de ensaios a serem realizados para a análise do potencial genotóxico de substâncias (Krishna et al., 2000; Ribeiro et al., 2003).

Com relação ao sistema-teste empregado, o teste do micronúcleo é altamente sensível para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos. As células analisadas em sangue periférico são eritrócitos jovens, ou seja, reticulócitos imaturos identificados devido ao seu alto conteúdo de RNA ou elevado nível de receptores de transferrina expressos em sua superfície. Estas células possuem um tempo de vida relativamente curto, de modo que

qualquer micronúcleo que ela contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (Hayashi et al., 2000, Ribeiro et al., 2003).

Historicamente, o modelo animal mais usado para o teste do micronúcleo tem sido o camundongo ou rato, e as diretrizes regulatórias sugerem estes modelos para avaliação da mutagenicidade. Quando o sangue periférico é utilizado, os ratos são recomendados. No entanto, qualquer espécie de mamífero apropriada pode ser utilizada desde que seja uma espécie em que o baço não remova os eritrócitos micronucleados ou uma espécie que demonstre sensibilidade adequada para a detecção de agentes que causam aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas. É recomendado também o emprego de animais jovens e saudáveis e que no início do estudo, a variação de peso dos animais seja mínima, não excedendo mais que 20% do peso médio (Hayashi et al., 2000).

Dentre as vantagens do teste do micronúcleo *in vivo* está a possibilidade de se utilizar qualquer tipo de roedor, permitir tratamentos agudos, subagudos e crônicos, além de ser possível a contagem dos eritrócitos maduros. Destaca-se ainda a possibilidade de utilização de várias formas de administração, dentre as quais pode-se citar subcutânea e gavagem (Hayashi et al., 2000), mucosas (Kovalkovicová et al., 2004) e tópica (Senedese et al., 2008). A gavagem é indicada como via normalmente usada para administração da substância teste, sendo que as demais vias como injeção intraperitoneal, intravenosa ou tópica podem ser aceitas quando o seu uso for justificado. Por se tratar de um produto de aplicação intravaginal, os cremes contendo as diferentes concentrações do extrato foram avaliados por esta via de administração. MacGregor et al. (1987) sugeriram que pelo menos 4 animais por grupo de tratamento fossem analisados. O presente estudo analisou 5 animais por grupo de tratamento. As amostras de sangue caudal foram coletadas 24 horas e 7 dias após o início dos tratamentos, uma vez que a frequência de MNs induzida em PCEs é dependente do tempo de amostragem (Ribeiro et al., 2003). Análise de MNs em amostras de sangue periférico obtidas em diferentes momentos ao longo do experimento fornece informações complementares importantes em

relação ao tempo decorrido desde a indução de micronúcleos (Senedese et al., 2008). Itoh et al. (2002) utilizaram o mesmo sistema teste para a avaliação de antimicrobianos quinolônicos aplicados por via dérmica em ratos.

Neste ensaio, as inclusões de um controle de veículo e controle positivo são elementos importantes para o seu desempenho e interpretação dos dados. É descrito na literatura uma variedade de controles positivos e a sua inclusão neste experimento, como medida de controle de qualidade, é recomendada para garantir que os dados sejam analisados com precisão e sua realização esteja de acordo com normas descritas (Hayashi et al., 2000; Krishna et al., 2000). Há diversas vantagens de se incluir um grupo controle positivo simultâneo em um estudo de genética toxicológica, entre elas: serve como padrão para verificar as condições de manutenção dos animais, facilita a comparação de dados de um laboratório para outro, ajuda no estabelecimento de critérios mínimos de aceitação do ensaio e assegura precisamente que todos os passos em um experimento foram seguidos (Krishna et al., 2000).

A ciclofosfamida (*N,N*-bis(2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amina 2-óxido) (Figura 36) é um agente quimioterapêutico, utilizada primeiramente no tratamento do câncer mas também é utilizado como agente imunossupressor no tratamento de artrites, lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, psoríase, esclerose, entre outras enfermidades não malignas (Anderson et al., 1995). É um antineoplásico sintético, pertencente à classe dos agentes alquilantes, no grupo das mostardas nitrogenadas. Essa classe tem a propriedade de se tornar um eletrólito forte pela formação de intermediários de íon carbônio ou de complexos com a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA). Essas reações resultam na formação de ligações covalentes entre o DNA e componentes nucleofílicos formados pela alquilação, como grupos fosfato, amino, sulfidril, hidroxila, carboxila e imidazol, causando danos estruturais ao ácido nucleico (Anderson et al., 1995; Krishna et al., 1995; Krishna et al., 2000). A CPA tem sido amplamente utilizada como controle positivo, no teste de

micronúcleos em ratos. A concentração utilizada, de 50 mg/kg, administrada em uma única dose, induz um significativo aumento na frequência de micronúcleos tanto em células somáticas como em germinativas nestes animais (Krishna et al., 1995), porém ratos tratados com uma única dose de 10 mg/kg já se observa indução de micronúcleos (Anderson et al., 1995).

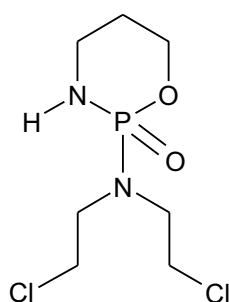


Figura 36. Estrutura química do quimioterápico ciclofosfamida

Em estudos com animais, além da inclusão de um grupo controle positivo, tratados com um agente indutor de danos cromossômicos, é desejável também a inclusão um grupo controle negativo, tratados com veículo. Além disso, grupo controle não tratado também deve ser incluído, a menos que existam dados históricos publicados demonstrando que não existe nenhum efeito deletério ou mutagênico induzidos pelo veículo. Em análises de sangue periférico, é aceitável uma coleta de amostra pré-tratamento, utilizada como controle negativo (Hayashi et al., 2000). Hayashi et al. (2000) recomendam que as lâminas a serem analisadas sejam codificadas de forma que a identidade de cada amostra não seja reconhecida pelo analista. Este procedimento evita que o analista seja induzido a encontrar células micronucleadas, visto que o controle positivo apresenta frequência de micronúcleos bastante elevada.

Seguindo recomendações dos protocolos mais aceitos para análise genotóxica *in vivo*, este estudo incluiu a análise simultânea dos controles positivo (CPA), negativo (água)

e o veículo (creme base) como meio de controle de qualidade e parâmetros de análise de genotoxicidade e citotoxicidade (MacGregor et al., 1980; Hayashi et al., 2000; Krishna et al., 2000). Neste trabalho, o grupo tratado somente com CPA apresentou um aumento significativo de PCEMNs quando comparado ao grupo controle negativo. Isso assegura a sensibilidade do sistema-teste utilizado, uma vez que o quimioterápico CPA é utilizado como indutor de danos cromossômicos.

O creme contendo diferentes concentrações do extrato de *S. nitens* foi avaliado quanto à capacidade de induzir PCEMNs em sangue periférico de ratas Wistar. O produto não apresentou aumento estatisticamente significativo de PCEMNs quando comparado controle negativo. Nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, pode-se afirmar que o extrato *S. nitens* não apresenta efeito mutagênico.

A atividade biológica de extratos de plantas depende de uma soma complexa de propriedades individuais, incluindo a sua composição, a estrutura de compostos existentes, a afinidade para o local de destino, as propriedades dentro do sistema biológico, dentre outros. Neste estudo, focou-se a atenção em algumas atividades para caracterizar as propriedades biológicas das espécies *L. spiralis* e *S. nitens*. Os extratos demonstraram consideráveis teores de flavonoides, e puderam ser caracterizadas as atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica *in vitro* e *in vivo*. Também foi possível determinar que os extratos não apresentam ação citotóxica, hemolítica e mutagênica, e a atividade antiproliferativa pode ser demonstrada somente pelo extrato de folhas de *L. spiralis*, além do flavonoide luteolina, e uma melhor compreensão de como extratos de plantas com atividade antioxidante podem inibir o crescimento de micro-organismos e a proliferação das células tumorais pôde ser demonstrada.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Os extratos metanólicos apresentaram valores expressivos no teor de flavonoides totais, sendo que o extrato metanólico de escapos de *S. nitens* apresentou maior conteúdo, e a atividade antioxidante pode ser observada frente ao ABTS^{•+};
- Os extratos e os compostos fenólicos apresentaram melhor atividade frente a bactérias Gram-positivas, e também apresentaram atividade frente a todas as espécies de *Candida* testadas. O extrato de escapos de *S. nitens* apresentou atividade frente aos isolados clínicos de *C. albicans*;
- O extrato de escapos de *S. nitens* apresentou a capacidade de reduzir e inibir a formação de hifas de *C. albicans*;
- Os extratos de escapos e capítulos de *S. nitens* não apresentaram diminuição da viabilidade de células HeLa tanto pelo teste do MTT quanto pela liberação de LDH, enquanto que o extrato de folhas de *L. spiralis* e o flavonoide luteolina apresentaram-se citotóxicos. Nenhum composto apresentou atividade hemolítica significativa comparada ao controle positivo;
- Foi possível observar que o extrato de escapos de *S. nitens* foi capaz de diminuir a viabilidade de *C. albicans* em um sistema biológico mimético de infecção (células HeLa infectadas com *C. albicans*);
- O creme vaginal, preparado sem conservantes, não apresentou contaminação verificado pelo controle microbiológico. O extrato de escapos de *S. nitens*, incorporado à formulação, apresentou atividade antifúngica no modelo experimental de CVV nas diferentes concentrações testadas;
- As frequências de PCEMNs obtidas nos animais tratados com creme vaginal contendo diferentes concentrações do extrato metanólico de escapos de *S. nitens* apresentaram-se

semelhantes àquelas não submetidas a qualquer tratamento, e estatisticamente diferentes do controle positivo, mostrando assim, ausência de efeito mutagênico.

- O creme contendo o extrato, administrado por via vaginal, mostrou ausência de efeito citotóxico em células de sangue periférico de ratas Wistar, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho.

Estes resultados permitem inferir que o extrato de escapos de *S. nitens* apresenta-se como promissor agente antifúngico. A caracterização do potencial biológico destes extratos permitirá o biodirecionamento ao estudo químico destas espécies, além da possibilidade do estudo de sua utilização em sinergia com outros antimicrobianos e agentes antiproliferativos ou determinar sua atividade anti-hemolítica e antimutagênica.

Referências

8. REFERÊNCIAS

- Abramsson-Zetterberg, L.A.; Grawè, J.; Zetterberg, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. *Mutation Research*, v. 423, p. 113–124, 1999.
- Álvares, C.A.; Svidzinski, T.I.E.; Consolaro, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, p. 319-327, 2007.
- Ames, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, v. 221, p. 1256-1264, 1983.
- 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. *Mutation Research*, v. 330, p. 115-81, 1995.
- Andrade, F.D.P.; Santos, L.C.; Dokkedal, A.L.; Vilegas, W. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. *Phytochemistry*, v. 51, p. 411-415. 1999.
- Asgary, S.; Naderi, G.H.; Askari, N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experimental and Clinical Cardiology*, v. 10, p. 88-90, 2005.
- Atoui, A.K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v. 89, p. 27-36, 2005.
- Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.

- Banerjee, A.; Dasgupta, N.; De, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. Food Chemistry, v. 90, p. 727-33, 2005.
- Bukowska, B.; Kowalska, S. Phenol and catechol induce pre-hemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. Toxicology Letters, v. 152, p. 73-84, 2004.
- Burns, J. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 49, p. 5797-5808, 2001.
- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. International Journal of Food Microbiology, v. 94, p. 223-253, 2004.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos".
- Calderon, R.; Williams, M.; Martinez, M.; Clemons, K.V.; Stevens, D.A. Genetic susceptibility of vaginal candidiasis. Medical Mycology, v. 41, p. 143-147, 2003.
- 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. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 200, 659.e1-659.e4, 2009.
- Carrara, M.; Donatti, L.; Damke, E.; Svidizinski, T.I.E.; Consolaro, M.E.L.; Batista, M.R. A new model of vaginal infection by *Candida albicans* in rats. Mycopathologia, v. 1, p. 1-8, 2010.

- Chami, F.; Chami, N.; Bennis, S.; Trouillas, J.; Remmal, A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, 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. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 42-55, 2007.
- Chang, H.; Mi, M.; Ling, W.; Zhu, J.; Zhang, Q.; Wei, N.; Zhou, Y.; Tang, Y.; Yuan, J. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*. *Archives of Pharmacal Research*, v. 31, p. 1137-1144, 2008.
- Chiu, F.L.; Lin, J.K. Downregulation of androgen receptor expression by luteolin causes inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells and xenografts. *Prostate*, v. 68, p. 61-71, 2008.
- Choi, Y.M.; Noh, D.O.; Cho, S.Y.; Suh, H.J.; Kim, K.M.; Kim, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, v. 39, p. 756-761, 2006.
- Chung, V.Q.; Tattersall, M.; Cheung, H.T.A. Interactions of a herbal combination that inhibits growth of prostate cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 53, p. 384-390, 2004.
- Clemedson, C.; Ekwall, B. Overview of the final MEIC results. I. The *in vitro*–*in vitro* evaluation. *Toxicology In Vitro*, v. 13, p. 657-663, 1999.
- Clemons, K.V.; Spearow, J.L.; Parmar, R.; Espiritu, M.; Stevens, D.A. Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans* vaginitis correlates with host estrogen sensitivity. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 4878-4880, 2004.

- Coelho, F.F.; Neves, A.C.O.; Capelo, C.; Figueira, J.E.C. Pseudovivipary in two rupestrian endemic species (*Leiothrix spiralis* and *Leiothrix vivipara*). *Current Science*, v. 88, p. 1225-1226, 2005.
- Consolaro, M.E.L.; Albertoni, T.A.; Shizue, Y.C.; Mazucheli, J.; Peralta, R.M.; Svidzinski, T.I.E. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 202-205, 2004.
- Cowan, N.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 564-582, 1999.
- Crocco, E.I.; Mímica, L.M.J.; Muramatu, L.H.; Garcia, C.; Souza, V.M.; Ruiz, L.R.B.; Zaitz, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, p. 689-697, 2004.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, p. 343-356, 2005.
- Cutter, H.; Wu, L.-Y.; Kim, C.; Morre, D.J.; Morre, D.M. Is the cancer protective effect correlated with growth inhibitions by green tea (-)-epigallocatechin gallate mediated through an antioxidant mechanism? *Cancer Letters*, v. 162, p. 149-154, 2001.
- Dambolena, J.S.; Zunino, M.P.; López, A.G.; Rubinstein, H.R.; Zygadlo, J.A.; Mwangi, J.W.; Thoithi, G.N.; Kibwage, I.O.; Mwalukumbi, J.M.; Kariuki, S.T. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 410-414, 2010.

- Dambolena J.S.; Zygadlo J.A.; Rubinstein H.R. Antifumonisin activity of natural phenolic compounds. A structure–property–activity relationship study. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, p. 140-146, 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. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 4, p. 104-111, 2010.
- De Bernardis, F.; Santoni, G.; Boccanera, M.; Spreghini, E.; Adriani, D.; Morelli, L.; Cassone, A. Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 3297-3304, 2000.
- Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, v. 15, p. 61-69, 1988.
- Dharmaratne, H.R.W.; Wijesinghe, W.M.N.M.; Thevanasem, V. Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 339-342, 1999.
- Dhawan, S.; Pal, A.; Ancha, R.; Bawankule, D.U.; Yadav, N.P.; Darokar, M.P.; Khanuja, S.P.S. Efficacy of CIM 1166, a combination of compounds derived from *Mentha* spp. in alleviating experimental vulvovaginal candidiasis in mice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 161-163, 2009.
- Dokkedal, A.L.; Salatino, A. Flavonoids of brazilian species of *Leiothrix* (Eriocaulaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 20, p. 31-32, 1992.

- Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M.; Sartoratto, A.; Rehder, V.L.G.; Delarmelina, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 305-311, 2005.
- Einbond, L.S.; Reynertson, K.A.; Luo, X.D.; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, v. 84, p. 23-28, 2004.
- Eloff, J.N.A. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. *Planta Medica*, v. 64, p. 711-13, 1998.
- Fang, J.J.; Ye, G.; Chen, W.L.; Zhao, W.M. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1279-1286, 2008.
- Fanos, V.; Cataldi, L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *Journal of Chemotherapy*, v. 12, p. 463-470, 2000.
- Farmacopéia Brasileira. 5.ed. São Paulo: Atheneu São Paulo, v. 1, pp. 236, 253, 2010.
- Fidel Jr, P.L.; Cutright, J.L.; Tait, L.; Sobel, J.D. A Murine Model of *Candida glabrata* Vaginitis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 173(2), p. 425-431, 1996.
- Foldvari, M.; Radhi, J.; Yang, G.; He1, Z.; Rennie, R.; Wearley, L. Acute vaginal candidosis model in the immunocompromized rat to evaluate delivery systems for antimycotics. *Mycoses*, v. 43, p. 393-401, 2000.
- Fotakis, G.; Timbrell, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177, 2006.
- Funari, C.S.; Ferro, V.O. Análise de própolis. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 171-178, 2006.

- Furtado, R.A.; Araújo, F.R.R.; Resende, F.A.; Cunha, W.R.; Tavares, D.C. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Toxicology*, v. 30, p. 254-259, 2009.
- García-Alonso, J.; Ros, G.; Periago, M.J. Antiproliferative and cytoprotective activities of a phenolic-rich juice in HepG2 cells. *Food Research International*, v. 39, p. 982-991, 2006.
- Garriott, M.L.; Brunny, J.D.; Kindig, D.E.F.; Parton, J.W.; Schwier, L.S. The in vivo rat micronucleus test: integration with a 14-day study. *Mutation Research*, v. 342, p. 71-76, 1995.
- Georgetti, S.R.; Casagrande, R.; Vicentini, F.T.M.C.; Jr Verri, W.A.; Fonseca, M.J.V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 64, p. 99-106, 2006.
- Giulietti, A.M.; Menezes, N.L.; Pirani, J.R.; Meguro, M.; Wanderley, M.G.L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista das espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v. 9, p.1-151, 1987.
- Giulietti, A.M.; Hensold, N. Synonymization of the genera *Comanthera* and *Carptotepala* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 78, p. 460-464, 1991.
- Giulietti, A.M.; Amaral, M.C.E.; Bittrich, V. Phylogenetic analysis of inter-and infrageneric relationships of *Leiothrix* Ruhland (Eriocaulaceae). *Kew Bulletin*, v. 50, p. 55-71, 1995.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radical in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: University Press. 2007.
- Hassan, N.; Hassan, A. Miconazole Genotoxicity in Mice. *Journal of Applied Toxicology*, v. 17, p. 313-319, 1997.

- Hayashi, M.; MacGregor, J.T.; Gatehouse, D.G.; Adler, I.; Blakey, D.H.; Dertinger, S.D.; Krishna, D.; Morita, T.; Russo, A.; Sutou, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 234-252, 2000.
- He, M.; Du, M.; Fan, M.; Bian, Z. *In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, v. 163, p. 137-143, 2007.
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 572-584, 2002.
- Hostettmann, K.; Queiroz, E.F.; Vieira, P.C. *Princípios ativos de plantas*. São Carlos: EDUFSCAR, 2003.
- Huang, X.; Kojima-Yuasa, A.; Xu, S.; Norikura, T.; Kennedy, D.O.; Hasuma, T.; Matsui-Yuasa, I. Green tea extract enhances the selective cytotoxic activity of *Zizyphus jujuba* extracts in HepG2 cells. *American Journal of Chinese Medicine*, v. 36, p. 729-744, 2008.
- Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Asai, F.; Kobayashi, Y.; Shimano, R.; Miyauchi, K. Antibacterial activity of xanthenes from guttiferaceous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 48, p. 861-865, 1996.
- Itoh, S.; Katoh, M.; Furuhashi, K. *In vivo* photochemical micronucleus induction due to certain quinolone antimicrobial agents in the skin of hair less mice. *Mutation Research*, v. 520, p. 133-139, 2002.
- Jarvis, W.R.; Martine, W.J. Predominant pathogens in hospital infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 29, p. 19-24, 1992.

- Jiao, H.; Shen, W.; Ohe, Y.; Miura, K.; Tamura, T.; Saijo, N. A new 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug-resistant cell lines *in vitro*. *Cancer Immunology Immunotherapy*, v. 35, p. 412-416, 1992.
- Kauffman, C.A.; Carver, P.L. Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developments. *Drugs*, v. 53, p. 539-49, 1997.
- Kitagawa, S.; Sakamoto, H.; Tano, H. Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 52, p. 999-1001, 2004.
- Knobloch, E.; Pauli, A.; Iberl, B.; Wies, N.; Weigand, H. Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria-and fungi in plate tests. *Bioflavour*, v. 87, p. 287-299, 1987.
- Kovalkovicová, N.; Sutiakova, I.; Legath, J.; Legath, L.; Falis, M.; Pistl, J.; Kovac, G. Induction of micronuclei in rat bone marrow after subchronic inhalation exposure to mixture of benzene, cyclohexanone and cyclohexane. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v. 48, p. 341-345, 2004.
- Krishna, G.; Petrere, J.; Anderson, J.; Theiss, J. Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assays. *Mutation Research*, v. 335, p. 331-337, 1995.
- Krishna, G.; Urda, G.; Paulissen, J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutation Research*, v. 453, p. 45-50, 2000.
- Kuete, V.; Ngameni, B.; Simo, C.C.F.; Tankeu, R.K.; TchaleuNgadjui, B.; Meyer, J.J.M.; Lall, N.; Kuate, R.R. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus*

- chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). Journal of Ethnopharmacology, v. 120, p. 17-24, 2008.
- Kwak, J.H.; Kang, M.W.; Roh, J.H.; Choi, S.U.; Zee1, O.P. Cytotoxic phenolic compounds from *Chionanthus retusus*. Archives of Pharmacal Research, v. 32, p. 1681-1687, 2009.
- Lachman, L.; Lieberman, H.A.; Kanig, J.A. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2001.
- Langfield, R.D.; Scarano, F.J.; Heitzman, M.E.; Kondo, M.; Hmmond, G.B.; Neto, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. Journal of Ethnopharmacology, v. 94, p. 279-281, 2004.
- Lazzè, M.C.; Savio, M.; Pizzala, R.; Cazzalini, O.; Perucca, P.; Scovassi, A.I.; Stivala L.A.; Bianchi L. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. Carcinogenesis, v. 25, p. 1427-1433, 2004.
- Letterio, J.J.; Lehrnbecher, T.; Pollack, G.; Walsh, T.J.; Chanock, S.J. Invasive candidiasis stimulates hepatocyte and monocyte production of active transforming growth factor beta. Infection and Immunity, v. 69, p. 5115-5120, 2001.
- Lim, D.Y.; Jeong Y, Tyner AL.; Park, J.H.Y. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 292, p. G66-G75, 2007.
- Lin, Y.; Shi, R.; Wang, X.; Shen, HM. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. Current Cancer Drug Targets, v. 8, 634-646, 2008.
- Livermore, D.M. Interplay of impermeability and chromosomal b-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 36, p. 2046-2048, 1992.

- Low, C.F.; Chong, P.P.; Yong, P.V.C.; Lim, C.S.Y. Ahmad Z, Othman F. Inhibition of hyphae formation and SIR2 expression in *Candida albicans* treated with fresh *Allium sativum* (garlic) extract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p. 2169-2177, 2008.
- Luo, W.; Zhao, M.; Yang, B.; Ren, J.; Shen, G.; Rao, G. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, v. 126, p. 277-282, 2011.
- MacGregor, J.T.; Wher, C.M.; Gould, D.H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, v. 2, p. 509-514, 1980.
- MacGregor, J.T.; Heddle, J.A.; Hite, M.; Margolin, B.H.; Ramel, C.; Salamone, M.F.; Tia, R.R.; Wild, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v. 189, p. 103-112, 1987.
- Manach, C.; Mazur, A.; Scalbert, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, v. 16, p. 77-84, 2005.
- Marrazzo, J.M. Vulvovaginal candidiasis: over the counter doesn't seem to lead to resistance. *British Medical Journal*, v. 326, p. 993-994, 2003.
- Martinez, A.; Regardera, J.; Jimenez, E.; Santos, I.; Gargallo-Viola, D. Antifungal Efficacy of GM237354, a Sordarin Derivative, in Experimental Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 1008-1013, 2001.
- Mbaveng, A.T.; Ngameni, B.; Kuete, V.; Konga Simo, I.; Ambassa, T.; Roy, R.; Bezabih, M.; Etoa, F.X.; Ngadjui, B.T.; Abegaz, B.M.; Meyer, J.J.M.; Lall, N.; Penlap, B.V. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 483-489, 2008.

- Mondello, F.; De Bernardis, F.; Girolamo, A.; Salvatore, G.; Cassone, A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 1223-1229, 2003.
- Mondello, F.; De Bernardis, F.; Girolamo, A.; Cassone, A.; Salvatore, G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*, v. 6, p. 1-8, 2006.
- Mukherjee, A.; Rajasekaran, C. *In-vitro* hemolytic activity of *Allium stracheyi* Baker. *Journal of Pharmacy Research*, v. 3, p. 1160-1162, 2010.
- Munari, C.C.; Resende, F.A.; Alves, J.M.; Sousa, J.P.B.; Bastos, J.K.; Tavares, D.C. Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in Chinese hamster ovary cells. *Planta Medica*, v. 74, 1363-1367, 2008.
- Napolitano, D.R.; Moineo, J.R.; Souza, M.A.; Paula, J.E.; Espindola, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 37-41, 2005.
- Naglik, J.R.; Fidel Jr., P.L.; Odds, F.C. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiology Letters*, v. 283, p. 129-139, 2008.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição*. NCCLS document M27-A2. Vol 22, n.15. Wayne, Pennsylvania 19087-1898, EUA, 2002.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento*

Aeróbico; Norma Aprovada – Sexta Edição. NCCLS document M7-A6. Vol. 23, No.2 Wayne, Pennsylvania 19087-1898, EUA, 2003.

Ogasawara, A.; Komaki, N.; Akai, H.; Hori, K.; Watanabe, H.; Watanabe, T.; Mikami, T.; Matsumoto, T. Hyphal formation of *Candida albicans* is inhibited by salivary mucin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 284-286, 2007.

Ornelas-Aguirre, J.M.; Gomez-Meda, B.C.; Zamora-Perez, A.L.; Ramos-Ibarra, M.L.; Batista-González, C.M.; Zúñiga-Gonzalez, G.M. Micronucleus induction by metronidazole in rat vaginal mucosa. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 47, p. 352-356, 2006.

Pacifico, M.; Napolitano, A.; Masullo, M.; Hilário, F.; Vilegas, W.; Piacente, S.; Santos, L.C. Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. *Industrial Crops and Products*, v. 33, p. 488-496, 2011.

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*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 2720-2722, 2002.

Pappas, P.G. Invasive candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 20, p. 485-506, 2006.

Patel, D.A.; Gillespie, B.; Sobel, J.; Leaman, D.; Nyirjesy, P.; Weitz, M.; Foxman, B. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 190, p. 644-653, 2004.

Pellegrini, N.; Re, R.; Yang, M.; Evans, C.R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-

- 6sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 379-389, 1998.
- Penna, C.; Marino, S.; Vivot, E.; Cruaños, M.C.; Muñoz, J.D.; Cruaños, J.; Ferraro, G.; Gutkind, G.; Martino, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, v. 37-40, 2001.
- Perlroth, J.; Choi, B.; Spellberg, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, v. 45, p. 321-46, 2007.
- Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Ohara, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- Prista, L.N.; Alves, A.C.; Morgado, R.M.R. Tecnologia Farmacêutica. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.
- Ramalho, V.C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, p. 755-760, 2006.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.
- Reed, B.D.; Gorenflo, D.W.; Gillespie, B.W.; Pierson, C.L.; Zazove, P. Sexual behaviors and other risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Journal of Women's Health and Gender-Based Medicine*, v. 9, p. 645-655, 2000.

- Resende, F.A.; Alves, J.M.; Munari, C.C.; Senedese, J.M.; Sousa, J.P.B.; Bastos, J.K.; Tavares, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research*, v. 634, p. 112-118, 2007.
- Repentigny, L. Animal models in the analysis of Candida host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, p. 324-329, 2004.
- Ribeiro, J.F.; Walter, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. *Cerrado: ambiente e flora*. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 87-166, 1998.
- Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. Mutagênese ambiental. 1ª ed., Canoas-RS e UNESP Botucatu-SP, *ULBRA*, p. 173-199, 2003.
- Ricci, C.V.; Patricio, M.B.C.; Salatino, M.L.F.; Salatino, A.; Giuliatti, A.M. Flavonoids of *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae): Taxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 24, p. 577-583, 1996.
- Robert, S.; Baccelli, C.; Devela, P.; Dognéa J.M.; Leclercq, J.Q. Effects of leaf extracts from *Croton zambesicus* Müell. Arg. on hemostasis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 641-648, 2010.
- Rocha-Guzmán, N.E.; Gallegos-Infante, J.A.; Gonzalez-Laredo, R.F.; Reynoso-Camacho, R.; Ramos-Gomez, M.; García-Gasca, T.; Rodríguez-Muñoz, E.; Guzmán-Maldonado, S.H.; Medina-Torres, L.; Luján-García, B.A. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phytophenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chemistry*, v. 115, p. 1320-1325, 2009.
- Rogero, S.O.; Lugão, A.B.; Ikeda, T.I.; Cruz, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, p. 317-320, 2003.

Sader, H.S.; Mendes, R.E.; Gales, A.C.; Jones, R.N.; Pfaller, M.A.; Zoccoli, C.; Sampaio, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. *Jornal de Pneumologia*, v. 27, p. 59-67, 2001.

Samaranayake, Y.H.; Samaranayake, L.P. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, p. 398-429, 2001.

Sanglard, D.; Odds, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Infectious Diseases*, v 2, p. 73-85, 2002.

Sano, P.T. *Actinocephalus* (Koern.) Sano (*Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*), a new genus of Eriocaulaceae, and other taxonomic and nomenclatural changes involving *Paepalanthus* Mart. *Taxon*, v. 53, p. 99-107, 2004.

Santos, L.C.; Andrade, F.D.P.; Vasconcelos, E.C.; Coelho, R.G.; Dokkedal, A.L.; Garcia, A.C.L.; Sano, P.T.; Vilegas, W. Separation of flavonoids and naphthopyranones from Brazilian *Paepalanthus* species by droplet countercurrent chromatography. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 2, p. 43-47. 1999.

Santos, L.C.; Piacente, S.; De Riccardis, F.; Eletto, A.M.; Pizza, C.; Vilegas, W. Xanthonés and flavonoids from *Leiosthrix curvifolia* and *Leiosthrix flavescens*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 853-856, 2001.

Santos, L.C.; Piacente, S.; Riccardis, F.D.; Eletto, A.M.; Pizza, C.; Vilegas, W. Xanthonés and flavonoids from *Leiosthrix flavescens* e *Leiosthrix curvifolia*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 853-856, 2003.

Scartezzini, P.; Speroni, E. Review on some plants tradicional medicine with antioxidant activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.23-43, 2000.

- Scatena, V.L.; Moraes, A.R.S. Anatomia de raízes, folhas e escapos de *Paepalanthus* subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae) da Serra do Cipó - MG. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 39, p. 1021-1035, 1996.
- Scheers, M.E.; Ekwall, B.; Dierickx, J.P. *In vitro* long-term cytotoxicity testing of 27 MEIC chemicals on HepG2 cells and comparison with acute human toxicity data. *Toxicology In Vitro*, v. 15, p. 153-161, 2001.
- Selvendiran, K.; Koga, H.; Ueno, T.; Yoshida, T.; Maeyama, M.; Torimura, T.; Yano, H.; Kojiro, M.; Sata, M. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Research*, v. 66, p. 4826-4834, 2006.
- Senedese, J.M.; Rodrigues, A.R.; Furtado, M.A.; Faustino, V.D.; Berretta, A.A.; Marchetti, J.M.; Tavares, D.C. Assessment of the mutagenic activity of extracts of brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v. 9, p. 1-7, 2008.
- Serafin, C.; Nart, V.; Malheiros, A.; Cruz, A.B.; Monache, F.D.; Gette, M.A.; Zacchino, S.; Cechinel Filho, V. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*. v. 17, p. 578-582, 2007.
- Shahrim, S.; Baharuddin, P.J.N.M.; Yahya, N.A.; Muhammad, H.; Bakar, R.A.; Ismail, Z. The *in vivo* rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) extract. *Tropical Biomedicine*, v. 23, p. 214-219, 2006.
- Sharma, P.; Sharma, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p. 239-243, 2001.

- Silva, F.A.M.; Borges, M.F.M.; Ferreira, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, p. 94-103, 1999.
- Silva, M.A.; Cardoso, C.A.L.; Vilegas, W.; Santos, L.C. High-performance liquid chromatographic quantification of flavonoids in Eriocaulaceae species and their antimicrobial activity. *Molecules*, v. 14, p. 4644-4654, 2009a.
- Silva, E.C.C.; Cavalcanti, B.C.; Amorim, R.C.N.; Lucena, J.F.; Quadros, D.S.; Tadei W.P.; Montenegro, R.C.; Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Nunomura R.C.S.; Nunomura, S.M.; Melo, M.R.S.; Andrade-Neto, V.F.; Silva, L.F.R.; Vieira, P.P.R.; Pohlit, A.M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, p. 48-55, 2009b.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: Editora UFRGS, 2004.
- Sobel, J.D.; Hasegawa, A.; De Bernardis, F.; Adriani, D.; Pellegrini, G.; Cassone, A.; Fidel, P.L.; Haidaris, C.; Gigliotti, A.G.; Harmsen, D.; Fujita, S.; Yamamoto, K.; Makimura, K.; Shibuya, K.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. Selected animal models: vaginal candidosis, pneumocystosis pneumonia, dermatophytosis and trichosporonosis. *Medical Mycology*, v. 36, p. 129-136, 1998.
- Sobel, J.D.; Zervos, M.; Reed, B.D.; Hooton, T.; Soper, D.; Nyirjesy, P.; Heine, M.W.; Willems, J.; Panzer, H. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 34-38, 2003.

- Sojakova, M.; Liptajova, D.; Borovsky, M.; Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. *Mycopathologia*, v. 157, p. 163-169, 2004.
- Souza, P.C.; Storti-Filho, A.; Souza, R.J.S.; Damke, E.; Mello, I.C.J.; Pereira, M.W.; Svidizinski, T.I.E.; Lopes-Consolaro, M.E. Prevalence of *Candida* sp. in the cervical–vaginal cytology stained by Harris–Shorr. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 279, p. 625-629, 2009.
- Spellberg, B.J.; Filler, S.G.; Edwards Jr., J.E.; Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p. 244-251, 2006.
- Splett, S.; Barthlott, W.; Stutzel, T.; Barros, M.A.G. Leaf anatomy of brazilian Eriocaulaceae and its diagnostic significance. *Flora*, v. 188, p. 399-411, 1993.
- Steele, C.; Ratterree, M.; Fidel Jr., P.L. Differential susceptibility of two species of macaques to experimental vaginal candidiasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 180, p. 802-810, 1999.
- Tamaki, M.; Imazeki, Y.; Shirane, A.; Fujinuma, K.; Shindo, M.; Kimura, M.; Uchida Y. Novel gratisin derivatives with high antimicrobial activity and low hemolytic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 21, p. 440-443, 2011.
- Tavares, D.C.; Munari, C.C.; Araújo, M.G.F.; Beltrame, M.C.; Furtado, M.A.; Gonçalves, C.C.; Tiossi, R.F.J.; Bastos, J.K.; Cunha, W.R.; Veneziani, R.C.S. Antimutagenic potential of *Solanum lycocarpum* against induction of chromosomal aberrations in V79 cells and micronuclei in mice by doxorubicin. *Planta Medica*, *in press* 2011.
- Tavanti, A.; Campa, D.; Arancia, S.; Hensgens, L.A.M.; de Bernardis, F.; Senesi, S. Outcome of experimental rat vaginitis by *Candida albicans* isolates with different karyotypes. *Microbial Pathogenesis*, v.49, p. 47-50, 2010.

- Trias, J.; Gordon, E.M. Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. *Current Opinion Biotechnology*, v. 8, p. 757-762, 1997.
- Troillet, N.; Samore, M.H.; Carmeli, Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clinical Infectious Diseases*, v. 25, p. 1094-1098, 1997.
- Valadares, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletronica de Farmácia*, v. 3, p. 93-98, 2006.
- Van Den Berg, R.; Haenen, G.R.M.M.; Van Den Berg, H.; Vander V.W.; Bast, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*, v. 703, p. 391-395, 2000.
- Verpoorte, R.; Collin, A.; Memelink, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Biochemistry Reviews*, v. 1, p. 13-25, 2002.
- Vilegas, W.; Dokkedal, A.L.; Rastrelli, L.; Piacente, S.; Pizza, C. New naphthopyranone glycoside from *Paepalanthus vellozioides* and *latipes*. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 746-749, 1999.
- Walsh, T.J.; Bacher, J.; Pizzo, P.A. Chronic silastic central venous catheterization for induction, maintenance and support of persistent granulocytopenia in rabbits. *Laboratory Animal Science*, v. 38, p. 467-471, 1988.
- Weyermann, J.; Lochmann, D.; Zimmer, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, p. 369-376, 2005.
- Wolfe, K.; Wu, X.; Liu, R.H. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 609-614, 2003.

Wu, B.; Zhang, Q.; Shen, W.; Zhu, J. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 313, p. 125-132, 2008.

Yamamoto, K.; Kikuchi, A. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Research*, v. 71, p. 127-131, 1980.

Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS, p. 483-501, 2001.

Zhang, J.D.; Xu, Z.; Cao, Y.B.; Chen, H.S.; Yan, L.; An, M.M.; Gao, P.H.; Wang, Y.; Jia, X.M.; Jiang, Y.Y. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, p. 76-84, 2006.

Ziarrusta, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 19, p. 22-24, 2002.

Anexos

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 25/2010

Interessado: MARCELO GONZAGA DE FREITAS

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Projeto: Atividade antifúngica de *Syngonanthus nitens*: desenvolvimento de formulação para uso intravaginal para o tratamento de vulvovaginite causada por *Cândida* SP. e avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*

Parecer nº 02/2011 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Atividade antifúngica de *Syngonanthus nitens*: desenvolvimento de formulação para uso intravaginal para o tratamento de vulvovaginite causada por *Cândida* SP. e avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo*", apresentado pelo pós-graduando Marcelo Gonzaga de Freitas, orientado pela Professora Doutora Taís Maria Bauab, do Departamento de Ciências Farmacêuticas desta Faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em outubro de 2011, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 08 de junho de 2011.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA