

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

DANNY ELLEN MEIRELES LEME

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À
UROPATÓGENOS, TRIAGEM FITOQUÍMICA,
CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Cochlospermum regium (Schrank) Pilger (Bixaceae)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
JULHO/2016**

DANNY ELLEN MEIRELES LEME

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À
UROPATÓGENOS, TRIAGEM FITOQUÍMICA,
CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Cochlospermum regium (Schrank) Pilger (Bixaceae)**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. KELLY MARI PIRES DE
OLIVEIRA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestra em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração Ciência Ambiental.

DOURADOS/MS

JULHO/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

L551a	<p>Leme, Danny Ellen Meireles.</p> <p>Atividade antimicrobiana frente à uropatógenos, triagem fitoquímica, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae). / Danny Ellen Meireles Leme. – Dourados, MS: UFGD, 2016. 60f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Infecção Urinária. 2. Planta Medicinal. 3. Algodãozinho-do-cerrado. 4. Citotoxicidade. 5. Mutagenicidade. I. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.


©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Termo de Aprovação

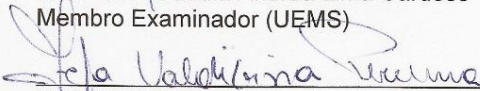
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Atividade antimicrobiana frente à uropatógenos, triagem fitoquímica, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae)”**, de autoria de **Danny Ellen Meireles Leme**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira
Presidente da banca examinadora



Prof.^a Dr.^a Claudia Andrea Lima Cardoso
Membro Examinador (UEMS)



Prof.^a Dr.^a Zefa Valdivina Pereira
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 28 de julho de 2016.

Dedico este trabalho à minha família,
ao meu namorado Junior Chimello,
e a todos que contribuíram
para sua realização.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição, por conduzir minha vida com sabedoria e no tempo certo.

Ao meu namorado Junior Chimello, por seu amor e carinho, por não medir esforços em me ajudar em todos os momentos, por ser meu alicerce nas dificuldades e meu riso na bonança, por me escutar e compreender nos momentos em que mais precisei, por ser esse companheiro maravilhoso e por ser o meu principal motivo de felicidade. Sou grata por cada momento ao seu lado e por fazer parte de minha vida. Te amo pra sempre!

Aos meus pais Ailton Leme e Noemi Leme, que sempre me apoiaram em minhas decisões, que me incentivam a buscar sempre o melhor em minha vida, por possuírem um caráter incrível que seguirei como exemplo e por seus ensinamentos que guardarei em meu coração.

À todos da família Leme, pela torcida, pelo apoio, pelo carinho e orações realizadas em meu favor.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira por sua dedicação e ensinamentos transmitidos, pela oportunidade em trabalhar em sua equipe de laboratório, sou grata pelo seu incentivo em não me deixar esmorecer e por acreditar em minha capacidade. Expresso a você o meu reconhecimento e admiração por sua competência profissional.

À Ma. Fabiana Gomes da Silva Dantas pelo apoio e incentivo às pesquisas, pela ajuda imensurável ao longo dos anos, por transmitir seus conhecimentos e esclarecer dúvidas sempre que precisei, por sua constante parceria, disponibilidade e prestatividade em qualquer situação.

Ao Allan Rodrigues Belarmino, por sua essencial ajuda, pelo conhecimento repassado e por sua parceria nos experimentos realizados.

À Stephanie Iahnn pela prestatividade, por sua parceria nos experimentos, por sua ajuda e colaboração sempre que solicitei.

Aos meus colegas Thaiane Ferreira e Vagner Berres pela parceria nas coletas e preparação de amostras, no auxílio nos experimentos e pelos episódios cômicos que passamos que guardo com carinho na memória.

À Ma. Adriana Araújo pela disponibilidade e o auxílio nos experimentos realizados, pelas dúvidas esclarecidas e pela parceria de trabalho.

À Ma. Renata Araújo por sua ajuda, prestatividade e animação a todo o momento.

Aos meus colegas do Laboratório de Bacteriologia, Andressa Damim, Fernanda Galvão, Melina Sasaki, Pamella Castilho, e Wellinton Jhon, pela parceria e disponibilidade em ajudar sempre que solicitado.

À Ma. Luana Carbonera pela colaboração das amostras solicitadas.

À Profa. Dra. Andréia Sangalli pela sugestão da planta utilizada nos experimentos realizados.

À Profa. Dra. Melyssa Negri da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela parceria nos testes de citotoxicidade.

À Profa. Dra. Claudia Cardoso e Prof. Dr. Jonas Mota da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS), pela parceria e disponibilidade em esclarecer dúvidas nos testes químicos realizados.

À banca examinadora Profa. Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso e Profa. Dra. Zefa Valdivina Pereira pela contribuição com sugestões para melhoria deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) pela Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET), pelo incentivo às pesquisas.

À Universidade Federal da Grande Dourados por possibilitar a realização do experimento nos laboratórios (Multidisciplinar) da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.

Aos apoios financeiros à pesquisa fornecidos pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) e PPSUS (O Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde).

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Deoxyribonucleic Acid/Ácido Desoxirribonucléico

FCBA – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

g – Gramas

h – Horas

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais

km – Quilômetro

m – Massa

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MS – Mato Grosso do Sul

nm – Nanômetros

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Phosphate Buffered Saline

pH – Potencial Hidrogeniônico

S – South/Sul

TSA – Trypticase Soy Agar

TTC – Triphenyl Tetrazolium Chloride

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

ITU – Infecção do Trato Urinário

v – Volume

W – West/Oeste

µg – Microgramas

µL – Microlitros

°C – Grau Celsius

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em µg/mL do extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> frente aos microrganismos associados à infecção urinária.....	34
Tabela 2. Citotoxicidade do extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> com linhagens de células HeLa <i>in vitro</i>	34
Tabela 3. Potencial mutagênico expresso pela média e desvio padrão de colônias revertentes por placa e índice de mutagenicidade na presença de ativação metabólica do extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i>	35
Tabela 4. Potencial mutagênico expresso pela média e desvio padrão de colônias revertentes por placa e índice de mutagenicidade na ausência de ativação metabólica do extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i>	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de Ames para avaliar a presença de mutações de genes em linhagens de <i>Salmonella</i> Typhimurium auxotróficas para o aminoácido histidina (Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Ames_test).....	19
Figura 2. Folhas de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) (Fonte: Sólón et al., 2009) (Fonte: Os autores, 2016).....	45
Figura 3. Raiz e caule fragmentado de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) (Fonte: Sólón et al., 2009) (Sólón et al., 2009).....	45
Figura 4. Flores de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) (Fonte: www.flickr.com) (http://www.utfpr.edu.br).....	46
Figura 5. Semente pilosa de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) (Fonte: Os autores, 2016) (Sólón et al., 2009).....	46
Figura 6. Leitura da concentração inibitória mínima (MIC) do extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) frente à bactéria <i>Escherichia coli</i> , com a adição da solução 0,1% de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) (Fonte: Leme, 2016).....	47
Figura 7. Leitura visual da concentração inibitória mínima (MIC) do extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) frente à levedura <i>Candida tropicalis</i> (Fonte: Leme, 2016).....	47
Figura 8. Confirmação das linhagens das cepas <i>Salmonella</i> Typhimurium TA97a, TA98, TA100 e TA102, auxotróficas para o aminoácido histidina (Fonte: Os autores, 2016).....	48
Figura 9. Teste de Ames pelo ensaio de microssuspensão Kado com o extrato etanólico das folhas de <i>Cochlospermum regium</i> (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) (Fonte: Os autores, 2016).....	48

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) é ocasionada por patógenos que contaminam os tecidos do sistema urinário e está entre as doenças nosocomiais infecciosas mais comuns. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) popularmente conhecida como algodãozinho-do-cerrado, é utilizada para o tratamento de infecções geniturinárias. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a microrganismos associados à infecção urinária e avaliar sua citotoxicidade e mutagenicidade. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Também foi realizada a triagem fitoquímica e a quantificação de flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados. A pesquisa de citotoxicidade foi realizada pela viabilidade celular com MTS (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) e a mutagenicidade pelo teste de Ames. O extrato das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou ação frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Candida tropicalis*, mostrou a presença de ácidos orgânicos, esteróides e triterpenos, flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados e ausência de alcalóides, apresentando para flavonóides 87,4 mg/g; compostos fenólicos 167,2 mg/g; taninos condensados 21,7 mg/g e não mostrou citotoxicidade e mutagenicidade nas concentrações testadas. As folhas de *Cochlospermum regium* demonstraram atividade frente aos microrganismos relacionados à infecção urinária associando esta ação aos compostos encontrados e não apresentou citotoxicidade e mutagenicidade.

Palavras - Chave: Infecção Urinária, Planta Medicinal, Algodãozinho-do-cerrado, Citotoxicidade, Mutagenicidade.

ABSTRACT

A urinary tract infection (UTI) is caused by pathogens that infect the urinary system tissues and is among the most common infectious nosocomial diseases. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) popularly known as Algodãozinho-do-cerrado, is used for the treatment of genitourinary infections. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanol extract of the leaves *Cochlospermum regium* against microorganisms associated with urinary tract infection and assess their cytotoxicity and mutagenicity. The antimicrobial activity was evaluated by microdilution broth method. Phytochemical screening and quantification of flavonoids, phenolics compounds and condensed tannins also was performed. The cytotoxicity study was conducted by MTS cell viability (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboximetoxifenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium) and mutagenicity by the Ames test. The extract of leaves *Cochlospermum regium* presented opposite action to microorganisms *Escherichia coli* and *Candida tropicalis* showed the presence of organic acids, steroids and triterpenoids, flavonoids, phenolics compounds, and condensed tannins and absence of alkaloids, flavonoids having to 87,4 mg/g; phenolics compounds 167,2 mg/g; condensed tannins 21,7 mg/g and showed no mutagenicity and cytotoxicity at the concentrations tested. The leaves of *Cochlospermum regium* demonstrated activity against the microorganisms related to urinary infection linked this action to compounds found and showed no cytotoxicity and mutagenicity.

Key - words: Urinary Infection, Medicinal Plant, Algodãozinho-do-cerrado, Cytotoxicity, Mutagenicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Infecção Urinária.....	13
2.2 O uso popular de plantas medicinais.....	14
2.3 <i>Cochlospermum regium</i>	14
2.3.1 Fitoquímica da espécie <i>Cochlospermum regium</i>	16
2.4 Toxicidade.....	16
2.4.1 Citotoxicidade.....	17
2.4.2 Mutagenicidade	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
4. ARTIGO	28
5. CONCLUSÃO GERAL	44
ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO GERAL

A infecção do trato urinário (ITU) é ocasionada por microrganismos patogênicos que colonizam os tecidos do sistema urinário e está entre as doenças infecciosas mais comuns (TANGI et al., 2015). O uropatógeno mais frequente em infecções urinárias é *Escherichia coli* (MAMANI et al., 2015), bactéria Gram-negativa enteropatogênica que apresenta resistência aos antimicrobianos (DAOUD et al., 2015). Além disso, microrganismos oportunistas como leveduras também são encontrados nestas infecções, dentre os quais se destaca *Candida tropicalis*, relatado como segundo fungo leveduriforme mais encontrado (OZHAK-BAYSAN, et al., 2012; FREITAS et al., 2014). O tratamento para a infecção urinária requer custos econômicos elevados e a ausência desta terapia pode levar o indivíduo à morte (NANGINO et al., 2012).

Plantas medicinais são utilizadas popularmente para o tratamento de diversas infecções (NGEZAHAYO et al., 2015). Segundo Veiga Junior (2008), mais de 90% da população faz uso da fitoterapia. Os compostos naturais encontrados e o conhecimento sobre o seu modo de ação fornecem uma fonte para o desenvolvimento de estratégias alternativas (LÜTHJE & BRAUNER, 2016).

Cochlospermum regium (Schrank) Pilger é um arbusto da família Bixaceae Kunth, popularmente conhecida como “algodãozinho-do-campo”, ou “algodãozinho-do-cerrado” (BATISTA et al., 2014). Por suas propriedades medicinais, é utilizada popularmente para o tratamento de infecções geniturinárias (NUNES et al., 2003; SOLON et al., 2012). Além de sua ação antimicrobiana, as raízes de *C. regium* apresentam efeito analgésico, antiedematogênico e antiinflamatório (CASTRO et al., 1994).

Raízes e xilopódios de *Cochlospermum regium* estão entre as partes de plantas medicinais mais indicadas e comercializadas por vendedores de ervas em centros urbanos para o tratamento de inflamações e infecções, dentre estas infecção geniturinárias (NUNES et al., 2003). Sendo assim, sua exploração tem causado preocupação quanto à conservação de sua espécie, uma vez que a retirada dessas estruturas subterrâneas ocasiona a destruição do arbusto (BRATTI et al., 2013) e conseqüentemente coloca a espécie na lista de plantas medicinais ameaçadas de extinção, e se torna assim prioritário a sua conservação (PEREIRA et al., 2007).

Devido à sua exploração para o uso e comércio, várias pesquisas com *C. regium* vêm sendo realizadas com o objetivo de realizar a germinação e sua conservação *in vitro*, uma vez

que a planta já se torna escassa (VIU et al., 2007; COELHO et al., 2008; CAMILLO et al., 2009; INÁCIO et al., 2011). Para que *Cochlospermum regium* seja utilizado por suas propriedades benéficas no alívio de sintomas causados por infecção urinária, incentivando o uso das folhas da espécie uma vez que a sua retirada não as danifica, mitigando assim os impactos ambientais gerados por sua exploração e resultando em sua conservação, o extrato etanólico das folhas foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana frente à uropatógenos, realizado a triagem fitoquímica e dentre as classes obtidas, quantificado os compostos flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados, e investigado a citotoxicidade e mutagenicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infecção Urinária

As doenças infecciosas atingem milhões de pessoas a cada ano e geram grandes problemas financeiros na saúde pública (LIMA et al., 2010). Dentre as doenças infecciosas mais comuns está a infecção do trato urinário (ITU) (TANGI et al., 2015), que é ocasionada por microrganismos patogênicos que colonizam os tecidos do sistema urinário como uretra, bexiga, ureter e os rins (ALSHAMI & ALHARBI, 2014). Os sintomas geram desconforto sendo os principais, ardência ao urinar, necessidade frequente de urinar com pouca eliminação de urina, dor na uretra, dor na pélvis, dor nas costas na altura dos rins, algumas vezes o indivíduo pode apresentar febre, calafrios e náuseas (GROSSMAN & CARONI, 2009).

O agente etiológico mais frequente em infecção do trato urinário é *Escherichia coli* (KAVITHA & SATISH, 2014; MAMANI et al., 2015), bactéria Gram-negativa de origem entérica, ou seja, presente no intestino de animais endotérmicos, que pode ser responsável desde uma simples cistite até uma pielonefrite crônica (BRUMBAUGH et al., 2015). A ITU atinge principalmente mulheres, pois a anatomia do seu corpo favorece a contaminação, já que existe uma maior proximidade da região genital feminina com o ânus, e também pela uretra ser mais curta que a masculina favorecendo a chegada dos microrganismos patogênicos nestas regiões (LOURA & FERNANDES, 2010). No entanto, apesar de sua prevalência em mulheres, não é ausente em homens e tem crescido os relatos em crianças (YUN et al., 2014) e idosos (COSTA et al., 2015).

Os fungos leveduriformes também podem atuar como uropatógenos, sendo as *Candidas* relatadas como importante causa de infecção do trato urinário (ALENZI, 2016). *Candida tropicalis* é um microrganismo oportunista que se destaca como a segunda espécie de *candida* mais frequente em isolados nestas infecções (OZHAK-BAYSAN et al., 2012). O tratamento para a infecção urinária requer custos econômicos elevados e a ausência de terapia pode levar o indivíduo à morte (NANGINO et al., 2012).

Muitas pessoas utilizam plantas medicinais por optarem por um estilo de vida natural, e acreditam que a fitoterapia é a opção mais saudável e segura para o tratamento de suas enfermidades (LIMA et al., 2014). Sendo assim, por plantas apresentarem propriedades que aliviam os sintomas desagradáveis gerados por infecções, muitas delas vêm sendo utilizadas pela população para o tratamento de infecção urinária (SOUZA et al., 2014).

2.2 O uso popular de plantas medicinais

Planta medicinal pode ser definida como toda espécie vegetal utilizada com o propósito terapêutico para o alívio de sintomas desagradáveis (BRASIL, 2010). Durante muito tempo, grande parte da população não teve fácil acesso aos remédios sintéticos, utilizando as plantas para o controle de suas enfermidades (OLIVEIRA & VIVEIRO, 2012).

O uso de plantas medicinais é considerado tradição da cultura indígena, que retiram os mais diversos remédios e promove a cura e prevenção de suas enfermidades, e repassam seus conhecimentos sobre as plantas medicinais de geração em geração (CLARCK, 2008). Atualmente, o uso da fitoterapia tem se tornado uma medicina alternativa para muitas populações (GONÇALVES et al., 2011; SERPICO et al., 2016). Segundo Veiga Junior (2008), os países com populações mais pobres além do uso das plantas medicinais por tradição, as utilizam devido à ausência de recursos econômicos viáveis, e nos países desenvolvidos essa ação está relacionada com o modernismo de consumo de produtos naturais.

As plantas medicinais utilizadas pela população são encontradas em diversos biomas, como Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, dentre eles se destaca o cerrado, segundo maior bioma do país e a mais rica savana tropical do planeta, com mais de 12.000 espécies de plantas, em que pelo menos 30% são endêmicas (FORZZA et al., 2010). Possui um grande número de interações bioquímicas complexas, porém apesar de sua vasta riqueza de compostos, uma pequena quantidade de espécies foi investigada no aspecto fitoquímico. É necessário intensificar as pesquisas neste bioma, uma vez que tal domínio contém grande fonte de compostos bioativos ainda a serem descobertos (NOVAES et al., 2013).

2.3 *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Algodãozinho-do-Cerrado)

Cochlospermum regium (Schrank) Pilger é um arbusto do gênero *Cochlospermum* Kunt e família Bixaceae, popularmente conhecida como “algodãozinho-do-campo”, ou “algodãozinho-do-cerrado” (BATISTA et al., 2014). É considerada planta nativa do cerrado brasileiro, no entanto há registros de ter sido encontrada em regiões tropicais como África, Austrália e partes da região Sul-Americana como, Paraguai e Bolívia (LIMA et al., 1995; SOUZA & LORENZI, 2008). No Brasil, *C. regium* é caracterizada como planta forrageira, ornamental e medicinal utilizada com frequência nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal e São Paulo (SOLON et al., 2012).

Tresvenzol et al. (2006), citam que *C. regium* é uma das principais plantas medicinais comercializadas em Goiânia (GO) e cidades vizinhas e seus xilópodos são popularmente indicados para infecções ginecológicas, gastrites e úlceras. O chá de suas raízes tem sido utilizadas para o tratamento de infecções geniturinárias (NUNES et al., 2003; SOLON et al., 2012), afecções da pele e leucorréia (PIO CORREA, 1975). Além disso, suas cascas também servem para o tratamento de inflamações e depurativo do sangue, reduzindo o colesterol (PIO CORRÊA, 1975; GUARIN NETO, 1987; LIMA et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1996; RITTO, 1996; NUNES et al., 2003; NUNES & CARVALHO, 2003; ANDRADE, 2008; CAMILLO, 2008). A espécie ainda é utilizada como regulador menstrual e por suas propriedades laxativas (GUARIN NETO & MORAES, 2003). Entretanto, Siqueira (1988) adverte, sobre o cuidado de se evitar tomar doses excessivas no uso da planta, sendo que relata que a infusão da raiz é empregada como um perigoso purgativo.

Em relação a suas propriedades farmacológicas, suas raízes apresentaram efeito analgésico, antiedematogênico e antiinflamatório (CASTRO et al., 1994). E estudos relatam sua atividade antibacteriana frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (OLIVEIRA et al., 1994; SOLON et al., 2012).

As raízes e xilópodos de *Cochlospermum regium*, estão entre as partes de plantas medicinais mais indicadas e comercializadas por vendedores de ervas para o tratamento de inflamações e infecções, dentre essas infecções geniturinárias (NUNES et al., 2003; SOLON et al., 2012). Entretanto, sua exploração se torna preocupante, pois ao se coletar as raízes e xilópodos, que são estruturas essenciais ao desenvolvimento e conservação da planta consequentemente se destrói o arbusto (BRATTI et al., 2013) e diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para sua germinação e conservação *in vitro* (VIU et al., 2007; COELHO et al., 2008; CAMILLO et al., 2009; INÁCIO et al., 2011) uma vez que o seu desenvolvimento natural já está se tornando escasso. Desta maneira, segundo Pereira et al. (2007), *C. regium* está entre as espécies medicinais prioritárias para a conservação. O IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e o Governo do Estado do Paraná divulgaram a lista das plantas medicinais ameaçadas de extinção e dentre elas a espécie *C. regium* foi citada na categoria “Em Perigo” (CAMILLO, 2008).

Desta forma, a pesquisa realizada com suas folhas se torna importante uma vez que a retirada de suas partes aéreas não as danifica, mitigando o impacto ambiental e conservando a

espécie. Entretanto, é necessário que sua citotoxicidade e mutagenicidade sejam avaliadas para que seu uso não ocasione danos à saúde.

2.3.1 Fitoquímica da espécie *Cochlospermum regium*

Como uma resposta natural em se adaptar às agressões ambientais, as plantas produzem substâncias naturais conhecidas como metabólitos secundários ou compostos orgânicos, como por exemplo, os compostos fenólicos, terpenos e esteróides, e os alcalóides (FUMAGALI et al., 2008; KHAN et al., 2009) que em defesa da planta atuam contra a herbivoria e controle de fitopatógenos (HILLEN et al., 2012).

Os compostos orgânicos geralmente atuam com ação antimicrobiana, e a planta que constitui essas propriedades apresenta benefícios no tratamento de infecções, e torna seu uso vantajoso uma vez que existe grande preocupação associada à resistência dos microrganismos (LIMA et al., 2010; ABREU et al., 2012).

Dentre os compostos isolados da raiz de *C. regium*, os principais encontrados são os flavonóides e taninos que são compostos fenólicos (LIMA et al., 1995). Os autores ainda relatam que dentro da classe dos flavonóides foram registradas a presença de apigenina, naringenina, e aromadendrina. Análises fitoquímicas e farmacológicas realizadas por Camillo et al. (2009), confirmaram que as raízes de *C. regium* possuem o flavonóide Kaempferol (F-52), que contém propriedades analgésicas, antiedematogênicas, antibacterianas e antioxidantes.

Além disso, Solon et al. (2012), em sua pesquisa fitoquímica de *C. regium*, detectou sete derivados fenólicos e dois triacilbenzenos conhecidos como Cochlosperminas A e B, e enfatizou que por apresentar derivados fenólicos, como o ácido gálico, associa a sua atividade antimicrobiana, dando suporte do uso da planta no tratamento de infecções.

Ainda, autores em suas pesquisas relatam a presença de compostos da classe dos esteróides e triterpenos como as saponinas; e também apresentam óleos essenciais e alguns açúcares, como glicose, frutose, rafinose e sacarose (KIRIZAWA, 1981; RITTO et al., 1996).

2.4 Toxicidade

Por ser um recurso natural, as populações que utilizam as plantas medicinais acreditam que elas não apresentam quaisquer riscos para a saúde humana, no entanto os vegetais não são isentos de toxicidade (VARANDA, 2006; CUNHA et al., 2009).

Além disso, ao se utilizar as plantas medicinais no tratamento de enfermidades deve se considerar que o preparo adequado, o conhecimento quanto à procedência do vegetal e o armazenamento correto são fatores relevantes na preservação de suas propriedades farmacológicas e que evitam o comprometimento da qualidade das espécies vegetais e possíveis danos aos seus usuários (NUNES et al., 2003; FEIJÓ et al., 2012).

Muitas dessas plantas utilizadas e comercializadas pela população, apesar de apresentarem propriedades terapêuticas, podem causar danos celulares e alterações genéticas (VARANDA, 2006). Portanto, as pesquisas realizadas para avaliar a citotoxicidade e mutagenicidade são importantes com o propósito de se evitar danos à saúde (LOURENÇO et al., 2010; MENEGUETTI et al., 2014).

2.4.1 Citotoxicidade

Citotoxicidade é a propriedade que uma substância possui em causar danos na célula capaz de induzir sua apoptose (RISS & MORAVEC, 2004). Para avaliar a citotoxicidade temos ensaios que são realizados em roedores (Teste do Micronúcleo em Eritrócitos da Medula Óssea de Camundongos) (CASTRO et al., 2004), vegetais (Teste de *Allium cepa*) (SILVA et al., 2010), crustáceo (Teste com *Artemia salina*) (GOMES et al., 2016) e cultura em células (EREN et al., 2015).

Com intuito de avaliar o potencial de citotoxicidade, testes *in vitro* vêm substituindo os ensaios *in vivo*, principalmente pelo seu custo reduzido, alta reprodutibilidade e praticidade na realização (SILVA et al., 2015). A análise por culturas de células *in vitro* torna-se cada vez mais uma prática comum nos laboratórios de controle da qualidade (SILVA et al., 2015). O parâmetro mais utilizado para avaliação da citotoxicidade é viabilidade celular, sendo utilizado para estes métodos corantes específicos que diferenciam células que sofreram danos ou estão em processo de apoptose (ROGERO et al., 2003).

2.4.2 Mutagenicidade

As substâncias presentes em plantas medicinais que causam danos no material genético (adição, substituição ou deleção de base no DNA), que não é reparado no momento da replicação celular e conseqüentemente transferidos para novas células são conhecidas como mutagênicas (EREN et al., 2015). Diversos testes estão à disposição dos pesquisadores para avaliação dos efeitos mutagênicos, e que podem ser realizados em diferentes organismos, como o teste de Ames em microrganismos (AKIN et al., 2016), *Allium cepa* em plantas

(ROBERTO et al., 2016), teste do micronúcleo em eritrócitos com roedores (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015) e ensaio mutagênico em *Drosophila melanogaster* (insetos) (STAMENKOVIĆ-RADAK & ANDJELKOVIĆ, 2016).

Um ensaio muito utilizado para avaliação de mutagenicidade é o teste de Ames (MARON & AMES, 1983). O teste de Ames constitui um método eficiente e rápido para detectar mutações genéticas, e foi incluído como parte da bateria de ensaios internacionalmente propostos para registro de medicamentos, outras drogas e formulações químicas (FDA, 2012; ISO, 2014). O ensaio consiste na utilização de linhagens de *S. Typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina (his⁻), por possuírem diferentes mutações no operon deste aminoácido, essas linhagens são incapazes de sintetizá-lo, e conseqüentemente não crescem e não formam colônias na sua ausência (MORTELMANS & ZIEGER, 2000). Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens sofrem mutações que revertem seu caráter de auxotrofia, passando assim a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (Figura 1) (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Segundo Mortelmans & Zieger (2000) frequentemente se utilizam as linhagens TA97a ou TA1537, TA98 e TA100, TA1535 ou TA102, cada linhagem apresenta características genéticas adicionais que aumentam a sensibilidade na detecção de agentes mutagênicos. As linhagens utilizadas no teste não apresentam enzimas de metabolização, que a exemplo nos mamíferos, são utilizadas para metabolização de compostos para sua redução e assimilação ou eliminação. Para superar essa dificuldade, foi incluída no teste a chamada fração S9, que é adicionada às culturas durante os ensaios. A fração S9 contém enzimas de metabolização obtida a partir do fígado de ratos, esta enzima permite a identificação de compostos com ação indireta (MARON & AMES, 1983). Além da avaliação da atividade mutagênica, o teste de Ames também é utilizado para avaliação da atividade antimutagênica dos compostos (RESENDE et al., 2012). Desta maneira, o teste de Ames é considerado um ensaio que possui grande sensibilidade na detecção do potencial mutagênico de diferentes agentes químicos, sendo um teste padronizado e intensamente utilizado pela comunidade científica internacional (FDA, 2012; ISO, 2014).

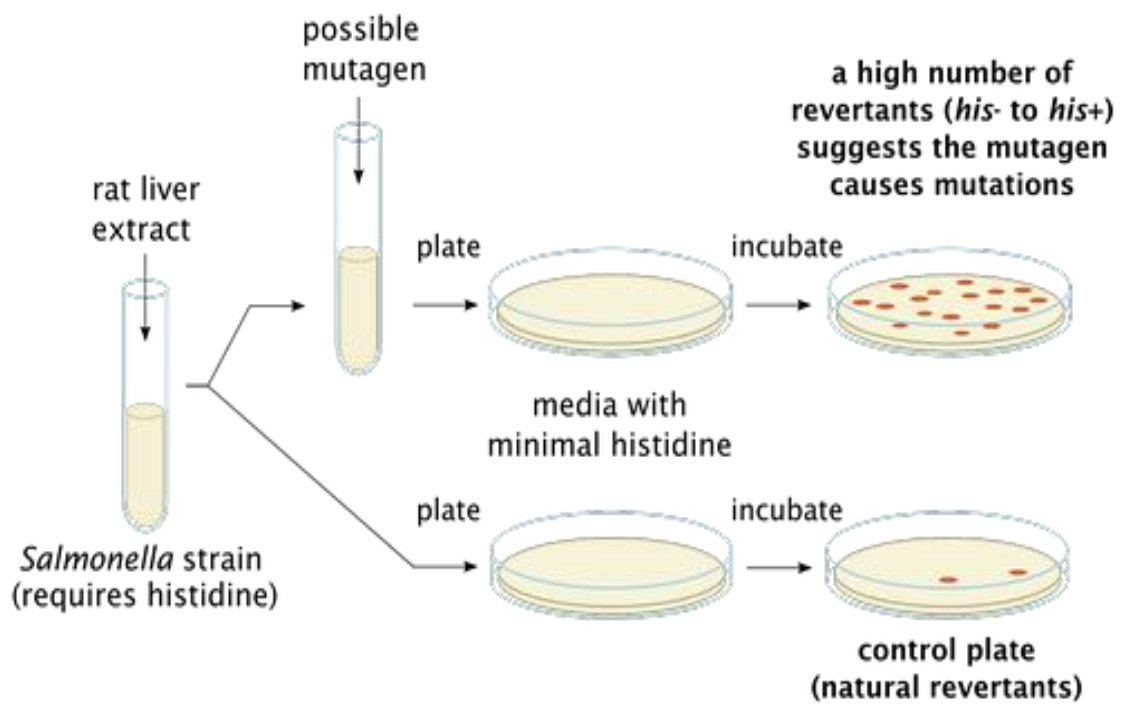


Figura 1. Teste de Ames para avaliar a presença de mutações de genes em linhagens de *Salmonella* Typhimurium auxotróficas para o aminoácido histidina. **Fonte:** https://en.wikipedia.org/wiki/Ames_test

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a microrganismos associados à infecção urinária, realizar a triagem fitoquímica e dentre as classes encontradas quantificar os compostos mais presentes, e investigar a citotoxicidade e mutagenicidade.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade antimicrobiana, bactericida e fungicida do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a microrganismos associados à infecção urinária;
2. Realizar a triagem fitoquímica e quantificar os compostos mais presentes do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*;
3. Avaliar se o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresenta citotoxicidade pelo método de cultura de células;
4. Avaliar se o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresenta mutagenicidade pelo teste de Ames (Método de Microsuspensão Kado).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. C.; McBAIN, A. J.; SIMÕES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, 2012.

AKIN, D.; DURAK, Y.; UYSAL, A.; GUNES, E.; ALADAG, M. O. Assessment of antimutagenic action of *Celtis glabrata* Steven ex Planch. (*Cannabaceae*) extracts against base pair exchange and frame shift mutations on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains by Ames test. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 39, n. 3, p. 312-321, 2016.

ALENZI, F. Q. B. Virulence factors of *Candida* species isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy. *Pakistan Journal Medical Sciences*, v. 32, n. 1, p. 143-146, 2016.

ALSHAMI, I.; ALHARBI, A. E. Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* extract against uropathogenic strains isolated from recurrent urinary tract infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 4, n. 4, p. 317-322, 2014.

ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. and Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. *Brazilian of Journal Biology*, v. 68, n. 1, p. 155-159, 2008.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H. G.; MOURA-COSTA, G. F.; COSTA, M. A.; CAMPOS-SHIMADA, L. B.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L.; KANESHIMA, E. N.; BECKER, T. C. A.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 174, n. 4, p. 293-298, 2015.

BATISTA, P. F.; COSTA, A. C.; MEGGUER, C. A.; LIMA, J. S.; SALES, J. F. Overcoming dormancy and characterization of germination in Cerrado 'algodãozinho' seeds treated with dimethyl sulphoxide. *South African Journal of Botany*, v. 92, p. 89-93, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.

BRATTI, C.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; OLIVEIRA, A. P. A.; MARAFIGA, B. G.; FERNANDES, S. S. L. Levantamento de plantas medicinais nativas da Fazenda Azulão em Dourados-MS. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 4, p. 675-683, 2013.

BRUMBAUGH, A. R.; SMITH, S. N.; SUBASHCHANDRABOSE, S.; HIMPSL, S. D.; HAZEN, T. H.; RASKO, D. A.; MOBLEY, H. L. T. Blocking Yersiniabactin Import Attenuates Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Cystitis and Pyelonephritis and Represents a Novel Target To Prevent Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 4, p. 1443-1450, 2015.

CAMILLO, J. Germinação e conservação do germoplasma de Algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. & Schl.) PILGER] Cochlospermaceae. 2008.113f.

Dissertação (Mestrado em ciências agrárias/Produção Vegetal) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2009.

CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C. CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 6, n. 3, p. 15-19, 2004.

CASTRO, M. S. A., DE SIQUEIRA, J. M., PAZ-VIEIRA, I. C., KASSAB, N. M. Estudos sobre o efeito analgésico e anti-edematogênico de uma flavanona isolada de *Cochlospermum regium*, “algodãozinho”. In: XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. 1994b. Resumos, Fortaleza: UFC. p. 162.

CLARKE, P. Aboriginal healing practices and Australian bush medicine. *Journal of the Anthropological Society of South Australia*, v. 33, p. 3-38, 2008.

COELHO, M. F. B.; SALES, D. M.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Germinação e emergência de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Em diferentes substratos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 10, n. 4, p. 90-96, 2008.

COSTA, F. M.; NUNES, R. S.; SANTOS, J. A. D.; CARNEIRO, J. A. Fatores associados à ocorrência de infecção hospitalar em idosos: uma revisão integrativa. *Revista Norte Mineira de Enfermagem*, v. 4, n. 1, p. 71-86, 2015.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; JUNIOR, R. S. L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 2, p. 403-411, 2009.

DAOUD, Z.; SOKHN, E. S.; MASRI, K.; CHEAITO, K.; HAIDAR-AHMAD, N.; MATAR, G. M.; DORON, S. *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections of Lebanese Patients between 2005 and 2012: Epidemiology and Profiles of Resistance. *Frontiers in Medicine*, v. 2, p. 26, 2015.

EREN, Y.; ÖZATAB, A.; KONUKC, M.; AKYILD, D.; LIMANE, R. A Mutagenicity and Cytotoxicity Study on Limonium effusum Aqueous Extracts by Allium, Ames and MTT Tests. *Cytology and Genetics*, v. 49, n. 2, p. 125–133, 2015.

FEIJÓ, A. M.; BUENO, M. E. N.; CEOLIN, T.; LINCK, C. L.; SCHWARTZ, E.; LANGE, C.; MEINCKE, S. M. K.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. 1, p. 50-56, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 2012. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). *In*: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Expert Working Group. 31. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 16 mai. 2016.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A. CARVALHO, A. A. Jr.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FREITAS, A. R.; BAEZA, L. C.; FARIA, M. G.; DOTA, K. F.; MARTÍNEZ, G. P.; SVIDZINSKI, T. I. Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: antifungal susceptibility and biofilm production. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 31, n. 2, p. 104-108, 2014.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GOMES, J. V. D.; FAITANIN, R. D.; BRASILEIRO, B. G.; SILVEIRA, D.; JAMAL, C. M. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades trombolítica e citotóxica de *cecropia hololeuca* miq. (urticaceae), *lippia alba* (mill.) N.e.br. Ex p. Wilson (verbenaceae) e *zanthoxylum rhoifolium* lam (rutaceae). *Infarma Ciências Farmacêuticas*, v. 28, n. 1, p. 10-15, 2016.

GONÇALVES, N. M. T.; GERENUTTI, M.; CHAVES, D. S. de A.; VILA, M. M. D. C. A tradição popular como ferramenta para a implantação da fitoterapia no município de Volta Redonda – RJ. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, n. 4, p. 346-351, 2011.

GROSSMAN, E.; CARONI, M. M. Infecção urinária na adolescência. *Adolescência & Saúde*, v. 6, n. 4, p. 41-47, 2009.

GUARIM NETO, G. Plantas utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso. Ministério da Ciência e Tecnologia/ CNPQ. Brasília, DF. 58p. 1987.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasílica*, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.14, n.3, p.439-445, 2012.

INÁCIO, M. C.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S. *In vitro* conservation and low cost micropropagation of *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Schrank). *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5, n. 20, p. 4999-5007, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION (ISO). ISO 10993-3: 2014: Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity. Arlington: Association for the Advancement of Medical Instrumentation, 2014.

KAVITHA, K. S.; SATISH, S. Antibacterial activity of seed extracts of *Callistemon lanceolatus* DC on uropathogenic bacteria. *Journal of Acute Medicine*, v. 4, n. 1, p. 6-12, 2014.

KHAN, R.; ISLAM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, A.; ALI, S. M.; SIDDIQUI, M.; KHAN, A. U. Antimicrobial activity of five herbal extracts against Multi Drug Resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, v. 14, n. 2, p. 586-597, 2009.

KIRIZAWA, M. Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger – Cochlospermaceae. 1981. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1981.

LIMA D. P.; CASTRO, M. S. A.; MELLO, J. C. P.; SIQUEIRA, J. M.; KASSAB, N. M. A. Flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. *Fitoterapia*, 66, p.545-546, 1995.

LIMA, D. F.; PEREIRA, D. L.; FRANCISCON, F. F.; REIS, C. do.; LIMA, V. da S.; CAVALCANTI, P. P. Conhecimento e uso de plantas medicinais por usuários de duas unidades básicas de saúde. *Revista Rede de Enfermagem do Nordeste*, v. 15, n. 3, p. 383-390, 2014.

LIMA, L. D. Q.; ANDRADE, E. V.; COELHO, M. E.; SENA, R. S. Assistência fisioterapêutica em um hospital de doenças infecciosas: relato de experiência. *Anais da Jornada de Fisioterapia da UFC*, v. 1, n. 1, p. 29, 2010.

LOURA, M. B.; FERNANDES, M. G. A incidência de infecções urinárias causadas por *E. coli*. *Revista Olhar Científico*, Ariquemes, v. 1, n. 2, p. 411-426, 2010.

LOURENÇO, J. A.; PITANGUI, C. P.; JORDÃO, A. A.; VANNUCCHI, H.; CECCHI, A. O. Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.]. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 4, p. 414-420, 2010.

LÜTHJE, P.; BRAUNER, A. Novel Strategies in the Prevention and Treatment of Urinary Tract Infections. *Pathogens*, v. 5, n. 1, p. 13, 2016.

MAMANI, M.; NOBARI, N.; ALIKHANI, M. Y.; POOROLAJAL, J. Antibacterial susceptibility of *Escherichia coli* among outpatients with community-acquired urinary tract

infection in Hamadan, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 3, n. 1, p. 40-43, 2015.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. *Ciência e Natura*, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

NANGINO, G. O.; OLIVEIRA, C. D.; CORREIA, P. C.; MACHADO, N. M.; DIAS, A. T. B. Financial impact of nosocomial infections in the intensive care units of a charitable hospital in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 24, n. 4, p. 357-361, 2012.

NGEZAHAYO, J.; HAVYARIMANA, F.; HARI, L.; STÉVIGNY, C.; DUEZ, P. Medicinal plants used by Burundian traditional healers for the treatment of microbial diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 173, p. 338-351, 2015.

NOVAES, P.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. *Phytochemistry Journal*, v. 12, n. 4, p. 839-855, 2013.

NUNES, G. P.; SILVA, M. F. da; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. de. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

NUNES, W. B.; CARVALHO, S. de. Evaluation of the potencial of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 4, p. 545-549, 2003.

OLIVEIRA, C. C.; SIQUEIRA, J. M.; SOUZA, K. C. B.; RESENDE, U. M. Avaliação da atividade antibacteriana da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart.) Pilger (algodãozinho). In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 1994. Resumos. Fortaleza: UFC. p. 176.

OLIVEIRA, C. C. de.; SIQUEIRA, J. M. de.; SOUZA, K. C. B.; RESENDE, U. M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium* preliminary results. *Fitoterapia*, v. 67, n. 2, p. 176-177, 1996.

OLIVEIRA, H. W. C.; VIVEIRO, A. A. Cerrado e plantas medicinais: algumas reflexões sobre o uso e a conservação. *Revista Ensino, Saúde e Ambiente*, v. 5, n. 3, p.102-120, 2012.

OZHAK-BAYSAN, B.; OGUNC, D.; COLAK, D.; ONGUT, G.; DONMEZ, L.; VURAL, T.; GUNSEREN, F. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria. *Medical mycology*, v. 50, n. 5, p. 529-532, 2012.

PEREIRA, A. M. S.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; VIEIRA, R. F. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado, p.37-73. In Pereira, A. M. S. (Org) Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do cerrado. Fapesp. Ribeirão Preto, SP. 2007.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio, p.747, 1975.

RESENDE, F. A.; BARBOSA, L. C.; TAVARES, D. C.; CAMARGO, M. S.; REZENDE, K. C. S.; SILVA, M. L. A.; VARANDA, E. A. Mutagenicity and antimutagenicity of (-) - hinokinin a trypanosomicidal compound measured by *Salmonella* microsome and comet assays. *Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, n. 203, p. 1-26, 2012.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, v. 2, n. 1, p. 51-62, 2004.

RITTO, J. L. A.; OLIVEIRA, F. DE.; CARVALHO, J. E. DE.; DIAS, P. C. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, a *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank.) Pilger. *LECTA – USF, Bragança Paulista*, v. 14, n. 2, p. 27-36, 1996.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

ROGERO, S. O.; LUGAO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SERPICO, M.; BOYLE, B.; KEMPER, K. J.; KIM, S. Complementary and Alternative Medicine Use in Children with Inflammatory Bowel Diseases: A Single Center Survey. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2016.

SILVA, E. M. F.; NASCIMENTO, R. B. C.; BARRETO, F. S.; FILHO, M. O. M.; GRIZ, S. A. S.; SANTOS, A. F.; MOUSINHO, K. C. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 36, n. 2, p. 277-283, 2015.

SILVA, L. P.; BOSSO, A. A.; CARDOSO, S. C. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. *Unopar Científica Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 9, n. 1, p. 67-70, 2010.

SIQUEIRA, J. C. Plantas medicinais identificação e uso das espécies dos cerrados. Editora Loyola. São Paulo. 39 p.; 1988.

SOLON, S.; CAROLLO, C. A.; BRANDÃO, L. F. G.; MACEDO, C. S.; KLEIN, A.; DIAS-JUNIOR, C. A.; SIQUEIRA, J. M. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. *Química Nova*, v. 35, n. 6, p. 1169-1172, 2012.

SOUSA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação de famílias fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APGII. 2 ed., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA, A. D. Z. de.; MENDIETA, M. da C.; CEOLIN, T.; HECK, R. M. As plantas medicinais como possibilidade de cuidado para distúrbios urinários. *Revista de Enfermagem da UFSM*, v. 4, n. 2, p. 342-349, 2014.

STAMENKOVIĆ-RADAK, M.; ANDJELKOVIĆ, M. Studying genotoxic and antimutagenic effects of plant extracts in *Drosophila* test systems. *Botanica Serbica*, v. 40, n. 1, p. 21-28, 2016.

TANGI, S. C.; TAJBAKSH, E.; SOLEIMANI, N. A.; SHAHRAKI, M. M. Prevalence of pathogenicity island markers genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 5, n. 8, p. 662-666, 2015.

TREVERZOL, M. I.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATA, D. T. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia – GO e cidades vizinhas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2006.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VIU, A. F. M.; COSTA, E. A. da.; VIU, M. A. de O.; CAMPOS, L. Z. de O.; SANTOS, S. C. Germinação e desenvolvimento de plântulas de [*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger] – (Algodão-do-campo) em diferentes substratos. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. 2, p. 957-959, 2007.

YUN, K. W.; KIM, H. Y.; PARK, H. K.; KIM, W.; LIM, I. S. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 47, n. 6, p. 455-461, 2014.

4. ARTIGO

Atividade antimicrobiana frente à uropatógenos do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger

D. E. M. Leme¹, K. M. P. de Oliveira²

¹ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET) - Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) - Unidade 2 - Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitária, Cx. Postal 533 - CEP 79804-970.

² Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) - Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD - Unidade 2 - Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitária, Cx. Postal 533 - CEP 79804-970.

A infecção do trato urinário (ITU) é ocasionada por patógenos que contaminam os tecidos do sistema urinário e está entre as doenças nosocomiais infecciosas mais comuns. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) popularmente conhecida como algodãozinho-do-cerrado, é utilizada para o tratamento de infecções geniturinárias. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente a microrganismos associados à infecção urinária e avaliar sua citotoxicidade e mutagenicidade. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Também foi realizada a triagem fitoquímica e a quantificação de flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados. A pesquisa de citotoxicidade foi realizada pela viabilidade celular com MTS (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) e a mutagenicidade pelo teste de Ames. O extrato das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou ação frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Candida tropicalis*, mostrou a presença de ácidos orgânicos, esteróides e triterpenos, flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados e ausência de alcalóides, apresentando para flavonóides 87,4 mg/g; compostos fenólicos 167,2 mg/g; taninos condensados 21,7 mg/g e não mostrou citotoxicidade e mutagenicidade nas concentrações testadas. As folhas de *Cochlospermum regium* demonstraram atividade frente aos microrganismos relacionados à infecção urinária associando esta ação aos compostos encontrados e não apresentou citotoxicidade e mutagenicidade.

1. Introdução

A infecção do trato urinário (ITU) é um problema de saúde comum, porém grave, que atinge milhões de pessoas a cada ano [1]. É definida como a colonização de microrganismos patogênicos que contaminam os tecidos como uretra, bexiga, ureter e os rins, ou qualquer parte do sistema urinário causando infecção [2].

A infecção urinária de origem bacteriana, na maioria das vezes é causada por bactérias Gram-negativas entéricas, no qual *Escherichia coli* é o microrganismo mais frequente [3, 4, 5]. Além disso, os fungos leveduriformes também podem contribuir como uropatógenos, e *Candidas* têm sido relatadas como importante causa de infecção do trato urinário [6]. *Candida tropicalis* é um microrganismo oportunista que se destaca como a segunda espécie de *candida* mais frequente em isolados de infecção urinária [7]. Devido aos danos ocasionados por estes uropatógenos, cresce a busca por produtos naturais que possam trazer o alívio ou a cura de infecções [8, 9].

Desde a antiguidade, as plantas medicinais são recursos alternativos utilizados pela população para o uso terapêutico [10]. Estima-se que de modo geral aproximadamente 80% das pessoas já utilizaram a medicina natural para o alívio primário de algum desconforto causado por enfermidades [11, 12, 13]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) [14] incentiva as pesquisas referentes ao uso de plantas medicinais com o objetivo de assegurar que as pessoas que fazem o uso da fitoterapia possam utilizar suas propriedades terapêuticas com segurança evitando danos à saúde e relata que os medicamentos modernos são derivados de plantas previamente utilizadas na medicina popular.

Cochlospermum regium (Schrank) Pilger é um arbusto da família Bixaceae Kunth, popularmente conhecida como “algodãozinho-do-campo”, ou “algodãozinho-do-cerrado” [15]. Suas raízes são utilizadas na medicina popular para o tratamento de inflamações e infecções do trato geniturinário [16, 17], além de sua ação antimicrobiana, também apresenta atividade analgésica, antiedematogênica e antiinflamatória [17, 18, 19].

Segundo os vendedores de ervas medicinais, as raízes e xilopódios de *C. regium* estão entre as partes de plantas medicinais mais procuradas e indicadas para o alívio dos sintomas de infecção geniturinárias na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul [16].

Entretanto, a grande procura dessas partes subterrâneas da planta em função de suas propriedades medicinais tem causado preocupação, uma vez que a retirada dessas estruturas ocasiona a destruição do arbusto [20], e levou *Cochlospermum regium* a entrar para a lista de espécies prioritárias para a conservação, e assim diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas

para sua germinação e conservação *in vitro* [21, 22, 23, 24] uma vez que a planta já se tornou escassa. Diante disso, é necessário mitigar os impactos ambientais gerados por sua exploração preservando a espécie. Desta forma, por suas raízes serem muito comercializadas e haver a carência em pesquisas com as folhas, sendo viável a sua utilização, já que a sua retirada não ocasiona danos que leve a destruição da planta, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresenta ação antimicrobiana frente à uropatógenos, realizar a triagem fitoquímica e dentre as classes encontradas quantificar os compostos mais presentes, e investigar a citotoxicidade e mutagenicidade.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo do extrato etanólico

As folhas de *Cochlospermum regium* foram coletadas na Fazenda Santa Madalena, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, S 22° 13' 41.8'' / W 054° 49' 58.4'', Dourados - MS. A exsicata foi identificada pela Profa. Dra. Zefa Valdivina Pereira e depositada no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS sob o registro DDMS 5001.

O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel para secagem em estufa de ar circulante à 45°C por sete dias. O material botânico seco e triturado (200 g) foi misturado em 1000 mL de álcool etílico absoluto a 95% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e mantidos à temperatura ambiente por 72 h, com agitações ocasionais. As soluções foram filtradas, e posteriormente rotaevaporadas (Rotaevapor R – 215) à 35°C até a completa volatilização do solvente. O extrato vegetal obtido foi liofilizado (E-C MicroModulyo acoplado a bomba de vácuo valuPump VLP80 Savant).

2.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* [25, 26].

Foram testados microrganismos provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida tropicalis* (ATCC 750), 3 isolados de *Escherichia coli* e 3 de *Candida tropicalis* do Laboratório de Microbiologia Aplicada, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

As bactérias foram cultivadas em ágar Triptona de Soja (Himedia) à 37°C por 24 h e a concentração do inóculo foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando o comprimento de onda de 625 nm em espectrofotômetro (Visível Digital Microproce Q898DRM - QUIMIS ISO 8001). Para leveduras, os microrganismos foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia) à 35°C por 48 h e a concentração do inóculo ajustado para $2,5 \times 10^6$ UFC/mL, utilizando o comprimento de onda de 530 nm.

Em todos os poços da microplaca (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark), foram adicionados 100 µL de caldo Müller Hinton (Himedia) para bactérias e para leveduras caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e 100 µL do extrato para a diluição seriada (1,9 µg/mL à 1000 µg/mL). Logo após, foram adicionados os inóculos das bactérias e leveduras incubando-as à 37°C por 24 h e 35°C por 48 h respectivamente. Para o controle do ensaio das bactérias foi utilizado o antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich) e para leveduras o antifúngico fluconazol (Sigma-Aldrich).

Para bactérias, a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM) foi adicionado 50 µL de solução 0,1% de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) (Vetec) e incubado as microplacas à 37°C por 30 minutos. A leitura para leveduras foi determinada visualmente. A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato no qual os microrganismos não apresentaram crescimento visível [27]. O teste foi realizado em duplicata, em três momentos distintos.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM), uma alíquota de 10 µL de todos os poços da placa de microdiluição foi retirada e plaqueada em ágar Müller Hinton (Himedia) à 37°C por 24 h para bactérias, e para leveduras os microrganismos foram plaqueados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco) à 35°C por 48 h. A CBM e a CFM foram definidas como a menor concentração que não houve crescimento de colônias [28].

2.3 Triagem Fitoquímica e Quantificação de Flavonóides, Compostos Fenólicos e Taninos Condensados

Foram realizados testes para rastrear as seguintes classes de compostos: alcalóides [29, 30], esteróides e triterpenóides [29], flavonóides [29], ácidos orgânicos [31], compostos fenólicos e taninos condensados [29]. Entre essas classes foram quantificados os flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados.

A concentração de flavonóides foi determinada utilizando como reagente uma solução de cloreto de alumínio 10% (AlCl_3), e a quantificação foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Lin & Tang [32]. Os resultados foram expressos como equivalentes miligramas de quercetina (QE) por grama do extrato etanólico.

A concentração de compostos fenólicos foi determinada pelo método espectrofotométrico discutido por Djeridane et al. [33], utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos como equivalentes miligramas de ácido gálico (EAG) por grama de extrato etanólico.

A concentração de taninos condensados foi determinada pelo método proposto por Broadhurst & Jones [34] e adaptado por Agostini-Costa et al. [35], sendo utilizada a vanilina em metanol acidificado. Os resultados foram expressos em miligramas de catequina equivalente (CAE) por grama de extrato.

2.4 Ensaio de Citotoxicidade com Linhagem de Células HeLa in vitro (Cultura de Células)

As células HeLa (Henrietta Lacks, linhagem celular de adenocarcinoma de colo do útero) foram cultivadas à 37°C sob 5% de CO_2 em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco) que continha 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/E; Gibco). Depois de atingir 80% de confluência, as células foram separadas utilizando 25% de solução tripsina /EDTA (etilenodiamino tetra-acético) (Gibco). A concentração de células foi ajustada a 2×10^5 células/mL com DMEM fresco sem P/E, e a suspensão foi adicionada às cavidades de uma microplaca de 96 poços (Promega, Madison, WI, EUA) e incubada à 37°C sob 5% de CO_2 por 24 h.

Os poços foram lavados duas vezes com solução de tampão fosfato (PBS) pH 7,0, 0,1 M. Foram adicionados na microplaca com as células, diferentes concentrações do extrato (250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$) e as células tratadas com DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich) foram utilizadas como controle negativo, incubando-as durante a noite à 37°C sob 5% de CO_2 . Após o período de incubação, foi realizado o ensaio com base na redução de MTS ou (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) em DMEM sem vermelho de fenol. Após 3 h de incubação à 37°C, a absorbância de formazan foi medida no comprimento de onda 490 nm, utilizando leitora de microplaca ASYS (Biochrom, Holliston, MA, EUA). Um controle positivo foi realizado medindo a atividade celular de células humanas cultivadas sob as mesmas condições, mas na ausência do extrato. A citotoxicidade do composto é apresentada como a média da triplicata, realizada em

três momentos distintos [36, 37]. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pelo valor da absorbância da amostra, dividido pelo valor da absorbância do branco e multiplicando o resultado por 100, onde o branco é o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio).

2.5 Ensaio de mutagenicidade pelo teste de Ames (Método de Microsuspensão Kado)

A avaliação do potencial efeito mutagênico do extrato foi realizada com cepas de *S. Typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 [38].

Para o preparo do inóculo 0,1 mL da suspensão bacteriana foi inoculada em 20 mL de Caldo Nutriente e incubada à 37°C por 16 h em uma incubadora com agitação orbital. O inóculo foi ajustado no comprimento de onda 650 nm à concentração de aproximadamente 1×10^8 bactérias/mL. Este inóculo foi concentrado 10 vezes por centrifugação à 10.000 g, por 10 minutos, à 4°C e ressuspensas em 4 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7,0, 0,1 M.

Para o teste de microsuspensão Kado as cepas foram expostas às concentrações de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* com e sem a fração microsossomal S9 (Moltox). Para o método com a fração S9, foram adicionados 5 µL da concentração do extrato em estudo, 50 µL da suspensão bacteriana e 50 µL da mistura da fração S9 (Moltox), nos ensaios sem a fração S9, em substituição da mistura fração S9 foi utilizado 50 µL de tampão fosfato e incubados à 37°C por 90 minutos. Após incubação, foi adicionado 2 mL de top ágar nos tubos contendo a presença e ausência de ativação metabólica e vertidos em placas contendo ágar mínimo glicosado (AMG) (Sigma-Aldrich), incubando-os novamente à 37°C por 48-72 horas. Foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa e calculado o índice de mutagenicidade (IM). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3. Resultados

O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos associados à infecção urinária. Para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* a concentração inibitória mínima foi de 1000 µg/mL e para a levedura *Candida tropicalis* 500 µg/mL, e ação fungicida na concentração de 500 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) em µg/mL do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* frente aos microrganismos associados à infecção urinária.

Microrganismos	<i>Cochlospermum regium</i>			AMP	FLU
	CIM	CBM	CFM		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1000	-	*	32	*
<i>Escherichia coli</i> (1)	1000	-	*	>16	*
<i>Escherichia coli</i> (2)	1000	-	*	>16	*
<i>Escherichia coli</i> (3)	1000	-	*	>16	*
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)	500	*	-	*	1
<i>Candida tropicalis</i> (1)	500	*	-	*	1
<i>Candida tropicalis</i> (2)	500	*	-	*	1
<i>Candida tropicalis</i> (3)	500	*	500	*	1

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; (-): Ausência de atividade antimicrobiana; (*): Não testado; AMP: Ampicilina; FLU: Fluconazol.

Os testes indicaram a presença de ácidos orgânicos, esteróides e triterpenos, flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados, e ausência de alcalóides. Os flavonóides quantificados apresentaram ($87,4 \pm 0,9$ mg/g), compostos fenólicos ($167,2 \pm 2,7$ mg/g), e taninos condensados ($21,7 \pm 0,1$ mg/g).

O extrato etanólico das folhas de *C. regium* não apresentou citotoxicidade na concentração de 250 µg/mL e a viabilidade celular foi de 99,28% (Tabela 2), o que mostra que não houve ação citotóxica.

Tabela 2: Citotoxicidade do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* com linhagens de células HeLa *in vitro*.

<i>Cochlospermum regium</i>							
250 µg/mL		500 µg/mL		1000 µg/mL		CP	CN
Med/DP	VC (%)	Med/DP	VC (%)	Med/DP	VC (%)	Med/DP	Med/DP
2,10 ± 0,14	99,28	1,47 ± 0,26	69,58	1,07 ± 0,14	50,35	2,03 ± 0,21	2,12 ± 0,16

VC (%): Viabilidade Celular em Porcentagem; Med/DP: Média e Desvio Padrão; CP: Controle Positivo (Células HeLa sob as mesmas condições de cultivo sem extrato); CN: Controle Negativo (Células com o diluente DMSO).

O extrato etanólico das folhas de *C. regium* não apresentou mutagenicidade, na presença ou ausência do sistema de ativação metabólica (S9), em todas as concentrações testadas e para as cepas de *Salmonella Typhimurium* avaliadas como relatado nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Potencial mutagênico expresso pela média e desvio padrão de colônias revertentes por placa e índice de mutagenicidade na presença de ativação metabólica do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*.

Concentração	<i>Salmonella Typhimurium</i>							
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	Med/DP	IM	Med/DP	IM	Med/DP	IM	Med/DP	IM
2000 µg/mL	131 ± 13	0,93	30 ± 7	1,35	237 ± 15	1,66	528 ± 4	1,32
1000 µg/mL	138 ± 8	0,99	28 ± 6	1,28	237 ± 16	1,66	420 ± 20	1,05
500 µg/mL	141 ± 12	1,01	31 ± 3	1,41	182 ± 20	1,28	509 ± 13	1,27
250 µg/mL	145 ± 7	1,03	29 ± 13	1,31	134 ± 38	0,94	437 ± 18	1,09
125 µg/mL	155 ± 10	1,11	37 ± 6	1,67	117 ± 22	0,82	400 ± 17	1,00
CP	995 ± 11	7,15	790 ± 2	35,90	1108,5 ± 16	7,80	1601 ± 4	4,02
CN	139 ± 8	1	22 ± 5	1	142 ± 5	1	398 ± 9	1

Med/DP: Média de colônias revertentes e Desvio Padrão; IM: Índice de Mutagenicidade; CN (Controle Negativo): DMSO (100 µL placa⁻¹); CP (Controle Positivo): 2-aminoantraceno (1-5 µg placa⁻¹) para TA97a, TA98 e TA100, e 2-aminoantraceno (5-10 µg placa⁻¹) para TA102.

Tabela 4: Potencial mutagênico expresso pela média e desvio padrão de colônias revertentes por placa e índice de mutagenicidade na ausência de ativação metabólica do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium*.

Concentração	<i>Salmonella Typhimurium</i>							
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	Med/DP	IM	Med/DP	IM	Med/DP	IM	Med/DP	IM
2000 µg/mL	133 ± 25	1,14	26 ± 1	0,57	85 ± 34	0,52	432 ± 14	1,18
1000 µg/mL	107 ± 13	0,91	26 ± 1	0,57	116 ± 34	0,70	372 ± 29	1,01
500 µg/mL	138 ± 10	,18	26 ± 1	0,52	89 ± 8	0,54	360 ± 19	0,98
250 µg/mL	112 ± 12	0,95	33 ± 3	0,72	113 ± 37	0,69	442 ± 13	1,21
125 µg/mL	99 ± 21	0,84	32 ± 1	0,70	87 ± 8	0,53	402 ± 86	1,10
CP	968 ± 15	8,27	752 ± 10	16,71	1008,5 ± 4	6,14	1531 ± 38	4,20
CN	117 ± 9	1	45 ± 9	1	164 ± 15	1	364 ± 35	1

Med/DP: Média de colônias revertentes e Desvio Padrão; IM: Índice de Mutagenicidade; CN (Controle Negativo): DMSO (100 µL placa⁻¹); CP (Controle Positivo): 4-nitro-o-fenilenodiamina (10 µg placa⁻¹) para TA97a e TA98, Azida sódica (1,25 µg placa⁻¹) para TA100, e Mitomicina C (0,5 µg placa⁻¹) para TA102.

4. Discussão

O extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou ação antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, na concentração de 1000 µg/mL (Tabela 1). O resultado encontrado para as folhas desta espécie mostra potencial para o tratamento de infecções geniturinárias, uma vez que a bactéria *Escherichia coli* é o microrganismo responsável por 80% dos casos de infecção urinária [5, 39, 40, 41]. Além disso, Chinenye et al. [42] propõem a espécie *Cochlospermum planchonii*, também referente ao gênero *Cochlospermum*, para o tratamento de infecções, no qual apresentou em sua pesquisa a ação antimicrobiana frente à *Escherichia coli* na concentração de 1250 µg/mL.

Para *Candida tropicalis*, as folhas de *C. regium* apresentaram ação antifúngica e fungicida na concentração de 500 µg/mL (Tabela 1). *Candida* é um gênero de fungos leveduriformes, que estão presente nas mucosas, pele, trato gastrointestinal, e compõe a microbiota vaginal e uretra [43]. São consideradas comensais e oportunistas, e se houver um desequilíbrio devido à baixa imunidade, podem prevalecer a microbiota e se tornarem patogênicas [44]. Nos últimos anos a incidência de *Candida tropicalis* vem aumentando em infecções [45], sendo relatado como a segunda levedura mais encontrada em infecções do trato urinário [7, 46, 47].

Segundo Sá et al. [48], a atividade antimicrobiana de um extrato pode ocorrer devido a presença de seus fitoquímicos. Desta forma, a ação antimicrobiana das folhas de *C. regium* frente aos uropatógenos testados pode ser justificada pela presença de seus metabólitos secundários encontrados como, os compostos flavonóides, derivados fenólicos e taninos. Os flavonóides e derivados fenólicos são responsáveis pela ruptura da membrana celular dos microrganismos danificando a membrana citoplasmática, no qual os leva a morte [49, 50]. Com isso, a ação antimicrobiana para *Candida tropicalis* foi observada em uma concentração menor em relação à *Escherichia coli*, uma vez que as leveduras possuem sua estrutura celular menos complexa que bactérias Gram-negativas [51]. No entanto, ambos os resultados encontrados frente aos uropatógenos testados são efetivos, já que *E. coli* normalmente apresenta resistência aos antimicrobianos [52], e desta forma mostra que *Cochlospermum regium* possui potencial terapêutico no tratamento de infecções geniturinárias.

A utilização de plantas medicinais no tratamento de enfermidades requer dados que assegure o uso destes fitoquímicos para a população que opta pelo terapia natural [53] uma vez que os metabólitos secundários são compostos que podem se comportar benéficamente para o organismo, ou de forma tóxica ocasionando danos à saúde [54]. À partir disso, o ensaio de citotoxicidade realizado no presente estudo com as folhas de *C. regium* em células

humanas, não mostrou citotoxicidade, uma vez que sua viabilidade celular foi de 99,28% (Tabela 2). De acordo com Laura et al. [55], em seu estudo com células animais, o extrato do xilopódio de *C. regium*, relataram que a planta não apresentou citotoxicidade, mas que ainda seu uso deve ser cauteloso sugerindo novos estudos na área. No entanto, outros autores relatam que o ensaio com o extrato da raiz de *C. regium* em células ovarianas de hamster [56], e o extrato do rizoma em decréscimo de eritrócitos em camundongos [57], mostrou possível citotoxicidade para a espécie.

O extrato etanólico das folhas de *C. regium* não apresentou mutagenicidade pelo teste de Ames, para todas as cepas e concentrações avaliadas (Tabelas 3 e 4). A amostra é considerada mutagênica quando pelo menos uma das cepas apresenta resposta positiva através da formação de colônias na ausência do aminoácido essencial histidina para seu crescimento [58]. Essa resposta é observada quando o índice de mutagenicidade for maior ou igual a 2, em pelo menos uma das concentrações testadas [59], ou seja, o número de colônias revertentes da amostra deve ser o dobro, ou mais, que o número de colônias do controle negativo [58]. Apesar de estudos relatarem o cuidado na utilização do extrato de *C. regium* [57]. Os autores Nunes & Carvalho [60], avaliaram o potencial mutagênico do extrato da raiz de *C. regium* com *Drosophila melanogaster* e constataram que o extrato não apresentou mutagenicidade.

É recomendado que se utilize as folhas de plantas medicinais, devido ao fato que a sua retirada não ocasiona danos que resulte na destruição da planta. As espécies medicinais que apresentam maior risco de extinção são aquelas cujas partes utilizadas para o preparo dos medicamentos são raízes, caule ou casca do caule, pois, muitas vezes o dano causado à planta pode levar à morte [61]. Segundo Bratti et al. [20], em sua pesquisa referente a um levantamento de plantas nativas da região, 51% relatam que utilizam as folhas para fins terapêuticos e incentiva a preservação ambiental das espécies medicinais através do uso destas partes da planta para o tratamento terapêutico da população.

5. Conclusão

O estudo mostrou que o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos associados à infecção urinária, como *Escherichia coli* e *Candida tropicalis*, e assimila seus compostos orgânicos a esta atividade, além disso, não apresenta citotoxicidade e mutagenicidade pelos testes e concentrações avaliadas. Desta forma, com o presente estudo incentiva o uso das folhas, pois a sua retirada não destrói a planta, mitigando assim os impactos gerados por sua utilização.

Entretanto, são necessários novos estudos quanto à toxicidade para assegurar a saúde da população que utiliza a espécie no tratamento de suas enfermidades.

Agradecimentos

Apoios financeiros: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico); FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) e PPSUS (Programa de Pesquisa para o SUS).

Referências Bibliográficas

- [1] I. Alshami, A. E. Alharbi, “Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* extract against uropathogenic strains isolated from recurrent urinary tract infections”, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol. 4, no. 4, pp. 317-322, 2014.
- [2] K. W. Yun, H. Y. Kim, H. K. Park, W. Kim, and I. S. Lim, “Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children”, *Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 6, pp. 455-461, 2014.
- [3] A. Braoios, T. F. Turatti, L. C. S. Meredija, T. R. S. Campos, F. H. M. Denadai, “Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos”, *Journal Brazilian Pathology Medicine Laboratory*, vol. 45, no. 6, pp. 449-456, 2009.
- [4] K. S. Kavitha, S. Satish, “Antibacterial activity of seed extracts of *Callistemon lanceolatus* DC on uropathogenic bacteria”, *Journal of Acute Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 6-12, 2014.
- [5] M. Mamani, N. Nobari, M. Y. Alikhani, and J. Poorolajal, “Antibacterial susceptibility of *Escherichia coli* among outpatients with community-acquired urinary tract infection in Hamadan, Iran”, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 3, no. 1, pp. 40-43, 2015.
- [6] F. Q. B. Alenzi, “Virulence factors of *Candida* species isolated from patients with urinary tract infection and obstructive uropathy”, *Pakistan Journal Medical Sciences*, vol. 32, no. 1, pp. 143-146, 2016.
- [7] B. Ozhak-Baysan, D. Ogunc, D. Colak, G. Ongut, L. Donmez, T. Vural, and F. Gunseren, “Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria”, *Medical Mycology*, vol. 50, no. 5, pp. 529-532, 2012.
- [8] L. A. R. Oliveira, R. D. Machado, A. J. L. Rodrigues, “Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis”, *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 16, no. 1, pp. 32-40, 2014.

- [9] A. D. Z. de Souza, M. da C. Mendieta, T. Ceolin, R. M. Heck, “As plantas medicinais como possibilidade de cuidado para distúrbios urinários”, *Revista de Enfermagem da UFSM*, vol. 4, no. 2, pp. 342-349, 2014.
- [10] R. C. Dutra, M. M. Campos, A. R. S. Santos, and J. B. Calixto, “Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives”, *Pharmacological Research*, 2016.
- [11] N. M. T. Gonçalves, M. Gerenutti, D. S. de A. Chaves, M. M. D. C. Vila, “A tradição popular como ferramenta para a implantação da fitoterapia no município de Volta Redonda – RJ”, *Revista Brasileira de Farmácia*, vol. 92, no. 4, pp. 346-351, 2011.
- [12] M. D. Quevedo, R. F. Gonçalves, F. Gonzales, “O conhecimento sobre a utilização de plantas medicinais em dois municípios do litoral de São Paulo, SP”, *Revista Ceciliansa*, vol. 3, no. 2, pp. 35-39, 2011.
- [13] V. F. Veiga Junior, “Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, no. 2, pp. 308-313, 2008.
- [14] Organização Mundial da Saúde (OMS). “WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023”, Geneva, December, 2013.
- [15] P. F. Batista, A. C. Costa, C. A. Megguer, J. S. Lima, and J. F. Sales, “Overcoming dormancy and characterization of germination in Cerrado ‘algodãozinho’ seeds treated with dimethyl sulphoxide”, *South African Journal of Botany*, vol. 92, pp. 89-93, 2014.
- [16] G. P. Nunes, M. F. da Silva, U. M. Resende, J. M. de Siqueira, “Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 13, no. 2, pp. 83-92, 2003.
- [17] S. Solon, C. A. Carollo, L. F. G. Brandão, C. S. Macedo, A. Klein, C. A. Dias-Junior, and J. M. Siqueira, “Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*”, *Química Nova*, vol. 35, no. 6, pp. 1169-1172, 2012.
- [18] M. S. A. Castro, J. M. de Siqueira, I. C. Paz-Vieira, N. M. Kassab, “Estudos sobre o efeito analgésico e anti-edematogênico de uma flavanona isolada de *Cochlospermum regium*”, “algodãozinho”. Resumo, 162..in: XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Fortaleza: UFC. 1994.
- [19] C. C. Oliveira, J. M. Siqueira, K. C. B. Souza, U. M. Resende, “Avaliação da atividade antibacteriana da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart.) Pilger (algodãozinho)” Resumos..in: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 13, Universidade Federal do Ceará, 1994.
- [20] C. Bratti, M. C. Vieira, N. A. H. Zárate, A. P. A. Oliveira, B. G. Marafiga, S. S. L. Fernandes, “Levantamento de plantas nativas da Fazenda Azulão em Dourados – MS”, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 15, no. 4, pp. 675-683, 2013.

- [21] J. Camillo, J. E. Scherwinski-Pereira, R. F. Vieira, J. R. Peixoto, “Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo”, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 11, no. 2, pp. 184-189, 2009.
- [22] M. F. B. Coelho, D. M. Sales, M. C. F. Albuquerque, “Germinação e emergência de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Em diferentes substratos, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 10, no. 4, pp. 90-96, 2008.
- [23] M. C. Inácio, B. W. Bertoni, S. de C. França, A. M. S. Pereira, “*In vitro* conservation and low cost micropropagation of *Cochlospermum regium* (Mart. Ex. Schrank)”, *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, no. 20, pp. 4999-5007, 2011.
- [24] A. F. M. Viu, E. A. da Costa, M. A. de O. Viu, L. Z. de O. Campos, S. C. Santos, “Germinação e desenvolvimento de plântulas de [*Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger] – (Algodão-do-campo) em diferentes substratos”, *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 5, no. 2, pp. 957-959, 2007.
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, “Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard”, 3. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [26] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M7-A9 “Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically”; approved standard, 9. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [27] M. Panghal, V. Kaushal, and J. Yadav, “In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases” *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 10, pp. 21-23, 2011.
- [28] R. V. Bagiu, B. Vlaicu, M. Butnariu, “Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae)”, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 2, pp. 1426-1436, 2012.
- [29] M. E. Wall, M. M. Krider, C. F. Krewson, C. R. Eddy, J. J. Willaman, D. S. Corell, and H. S. Gentry, “Steroidal sapogenins VII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents”, *Journal of the American Pharmaceutical Association*, vol. 43, no. 1, pp. 1-7, 1954.
- [30] A. F. Costa, “Fundação Calouste Guibenkian”, *Farmacognosia*, 3 ed., Lisboa, vol. 3, 1032 pages, 1982.
- [31] E. Merck, “Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel” Darmstaadt: Merck, 76 pages, 1980.
- [32] J-Y. Lin, C-Y. Tang, “Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation”, *Food Chemistry*, vol. 101, no. 1, pp. 140-147, 2007.

- [33] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, and N. Vidal, "Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds", *Food Chemistry*, vol. 97, no. 4, pp. 654-660, 2006.
- [34] R. B. Broadhurst, W. T. Jones, "Analysis of condensed tannins using acidified vanillin", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 29, no. 9, pp. 788-794, 1978.
- [35] T. S. Agostini-Costa, D. S. Garruti, L. Lima, S. freire, F. A. P. Abreu, T. Feitosa, "Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju", *Boletim CEPPA*, vol. 17, no. 2, pp. 167-176, 1999.
- [36] I. R. G. Capoci, P. S. B Mendonça, G. S. Arita, R. R. A. Pereira, M. E. L. Consolaro, M. L Bruschi, M. Negri, T. I. E. Svidzinski, "Propolis Is an Efficient Fungicide and Inhibitor of Biofilm Production by Vaginal *Candida albicans*", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015, pp. 1-9, 2014.
- [37] G. Malich, B. Markovic, and C. Winder, "The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines", *Toxicology*, vol. 124, no. 3, pp. 179-192, 1997.
- [38] N. Y. Kado, D. Langley, T. EISENSTAD, "A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay ", *Mutation Research*, vol. 121, no. 1, pp. 25-32, 1983.
- [39] T. J. Hwang, D. C. Hooper, "Association between fluoroquinolone resistance and resistance to other antimicrobial agents among *Escherichia coli* urinary isolates in the outpatient setting: a national cross-sectional study", *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 69, no. 6, pp. 1720-1722, 2014.
- [40] S. Subashchandrabose, T. H. Hazen, A. R. Brumbaugh, S. D. Himpsl, S. N. Smith, R. D. Ernst, D. A. Rasko, H. L. T. Mobley, "Host-specific induction of *Escherichia coli* fitness genes during human urinary tract infection", *Revista de PNAS*, vol. 111, no. 51, pp. 18327-18332, 2014.
- [41] E. F. de Vasconcelos-Pereira, E. A. Figueiró-Filho, V. M. de Oliveira, A. C. O. Fernandes, C. S. de M. Fé, L. R. Coelho, and I. Breda, "Urinary tract infection in high risk pregnant women", *Revista Patologia Tropical*, vol. 42, no. 1, pp. 21-29, 2013.
- [42] O. E. Chinenye, U. Ebere, and A. S. Okechukwu, "In vitro antibacterial activities of *Cochlospermum planchonii* roots crude extracts", *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 115-120, 2015.
- [43] H. Alonso-Valle, O. Acha, J. D. García-Palomo, C. D. fariñas-Alvarez, C. Fernández-Mazarrasa, and M. C. Fariñas, "Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality", *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 22, no. 4, pp. 254-257, 2003.
- [44] J. C. O. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, A. M. Fusco-Almeida, and M. J. S. Mendes Giannini, "*Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options", *Journal of Medical Microbiology*, vol. 62, no. 1, pp. 10-24, 2013.

- [45] A. K. F. Silva, J. E. S. Lisboa, M. P. C. S. Barbosa, A. F. Lima, “Infecções urinárias nosocomiais causada por fungo do gênero *candida*: uma revisão”, *Cadernos de Graduação Ciência Biológicas e da Saúde*, vol. 2, no. 1, pp. 45-57, 2014.
- [46] A. Eusébio, C. Araújo, M. Andrade, A. Duarte, “*Escherichia coli* nas infecções urinárias da comunidade: comensal ou patogênica?”, *Acta Urológica Portuguesa*, vol. 33, no. 2, pp. 37-42, 2016.
- [47] I. Maldonado, A. Arechavala, L. Guelfand, S. Reloso, C. Garbasz, “Infecciones urinarias nosocomiales por levaduras. Estudio multicêntrico de 14 hospitales de la red de micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires”, *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 33, no. 2, pp. 104-109, 2016.
- [48] D. S. Sá, G. E. Ribeiro, L. R. A. Rufino, N. M. S. Oliveira, J. E. Fiorini, “Atividade Antimicrobiana da *Uncaria Tomentosa* (Willd) D. C.”, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 35, no. 1, pp. 53-57, 2014.
- [49] J. P. Dzoyem, H. Hamamoto, B. Ngameni, B. T. Ngadjui, and K. Sekimizu, “Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species”, *Drug Discoveries & Therapeutics*, vol. 7, no. 2, pp. 66-72, 2013.
- [50] T. P. T. Cushnie, A. J. Lamb, “Antimicrobial activity of flavonoids”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 26, no. 5, pp. 343-356, 2005.
- [51] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, “The Bacterial Cell Envelope”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 2, no. 5, pp. 1-16, 2010.
- [52] B. F. F. Lucena, S. R. Tintino, F. G. Figueredo, C. D. de M. Oliveira, J. J. do S. Aguiar, E. do N. Cardoso, P. E. A. de Aquino, J. C. Andrade, H. D. M. Coutinho, E. F. F. Matias, “Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *cymbopogon citratus* (DC.) Stapf”, *Acta biologica Colombiana*, vol. 20, no. 1, pp. 39-45, 2015.
- [53] A. Rezk, A. Al-Hashimi, W. John, H. Schepker, M. S. Ullrich, K. Brix, “Assessment of cytotoxicity exerted by leaf extracts from plants of the genus *Rhododendron* towards epidermal keratinocytes and intestine epithelial cells”, *Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, no. 364, pp. 1-18, 2015.
- [54] F. A. Resende, W. Vilegas, L. C. Dos Santos, E. A. Varanda “Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test”, *Molecules*, vol. 17, no. 5, pp. 5255–5268, 2012.
- [55] A. L. C. Laura, R. J. Oliveira, A. L. C. Barros, J. M. Siqueira, M. C. Vieira, and S. A. Auharek, “Maternal exposure to *Cochlospermum regium*: a toxicological evaluation”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 23, no. 2, pp. 374-378, 2013.
- [56] L. Ceschini, É. G. Campos, “Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, no. 2, pp. 302-305, 2006.

- [57] D. B. Castro, D. B. Santos, H. D. Ferreira, S. C. Santos, L. Chen-Chen, “Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos”, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 6, no. 3, pp. 15-19, 2004.
- [58] D. M. Maron, B. N. Ames, “Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test”, *Mutation Research*, vol. 113, no. 3-4, pp. 173-215, 1983.
- [59] R. R. D. Moreira, L. E. Santos, S. D. Varella, E. A. Varanda, W. Vilegas, “Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 12, no. 1, pp. 11-19, 2002.
- [60] W. B. Nunes, S. de Carvalho, “Evaluation of the potencial of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells”, *Genetics and Molecular Biology*, vol. 26, no. 4, pp. 545-549, 2003.
- [61] V. E. G. Rodrigues, D. A. de Carvalho, “Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais”, *Revista Ciência Agrotecnologia*, vol. 25, no. 1, pp. 102-123, 2001.

5. CONCLUSÃO GERAL

O estudo mostrou que o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos associados à infecção urinária, como *Escherichia coli* e *Candida tropicalis*, e relaciona a presença dos compostos flavonóides, compostos fenólicos e taninos condensados a esta atividade, além disso, não apresenta citotoxicidade e mutagenicidade pelos testes e concentrações avaliadas. Desta forma, com o presente estudo incentiva o uso das folhas, pois a sua retirada não destrói a planta, mitigando assim os impactos gerados por sua utilização. Entretanto, são necessários novos estudos quanto à toxicidade para assegurar a saúde da população que utiliza a espécie no tratamento de suas enfermidades.

ANEXOS

Anexo I



Figura 2 - Folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado).
Fonte: Sólón et al., 2009 (Esquerda) - **Fonte:** Os autores (2016) (Direita).



Figura 3 - Raiz e Caule fragmentado de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) – (Algodãozinho-do-cerrado). **Fonte:** Sólón et al., 2009.



Figura 4 - Flores de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado).
Fonte: www.flickr.com (Esquerda) - **Fonte:** <http://www.utfpr.edu.br> (Direita).



Figura 5 - Semente Pilosa de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado).
Fonte: Os autores (2016) (Esquerda) - **Fonte:** Sólton et al., 2009 (Direita).

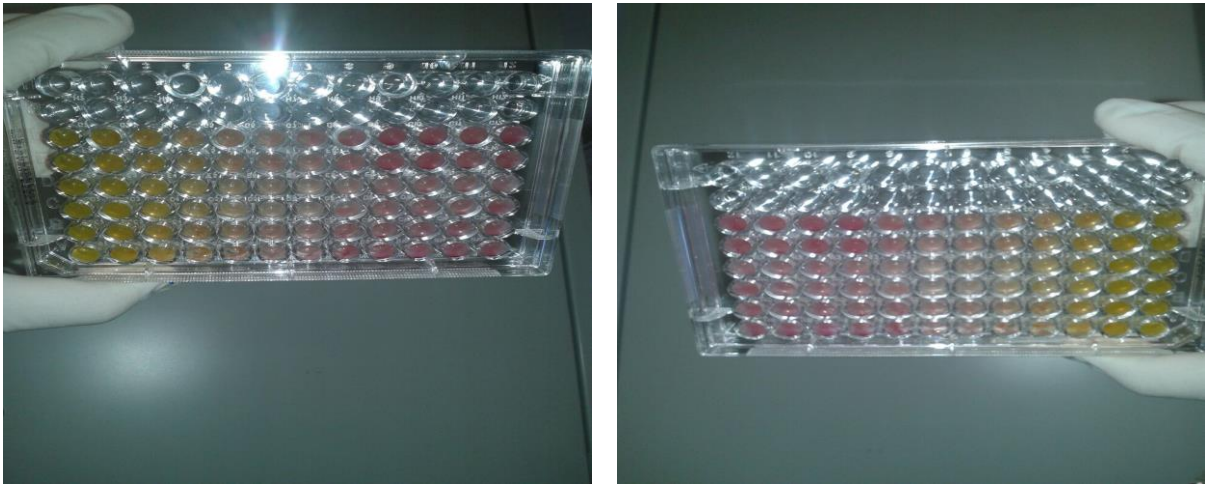


Figura 6 - Leitura da concentração inibitória mínima (MIC) do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) frente à bactéria *Escherichia coli*, com a adição da solução 0,1% de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC). **Fonte:** Leme, 2016.

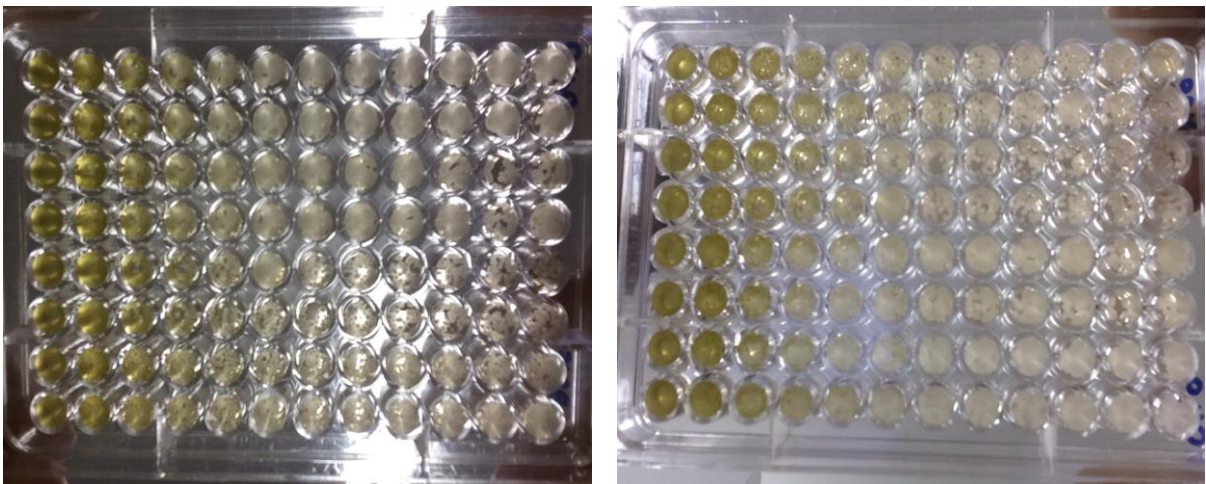


Figura 7 - Leitura visual da concentração inibitória mínima (MIC) do extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado) frente à levedura *Candida tropicalis*. **Fonte:** Leme, 2016.

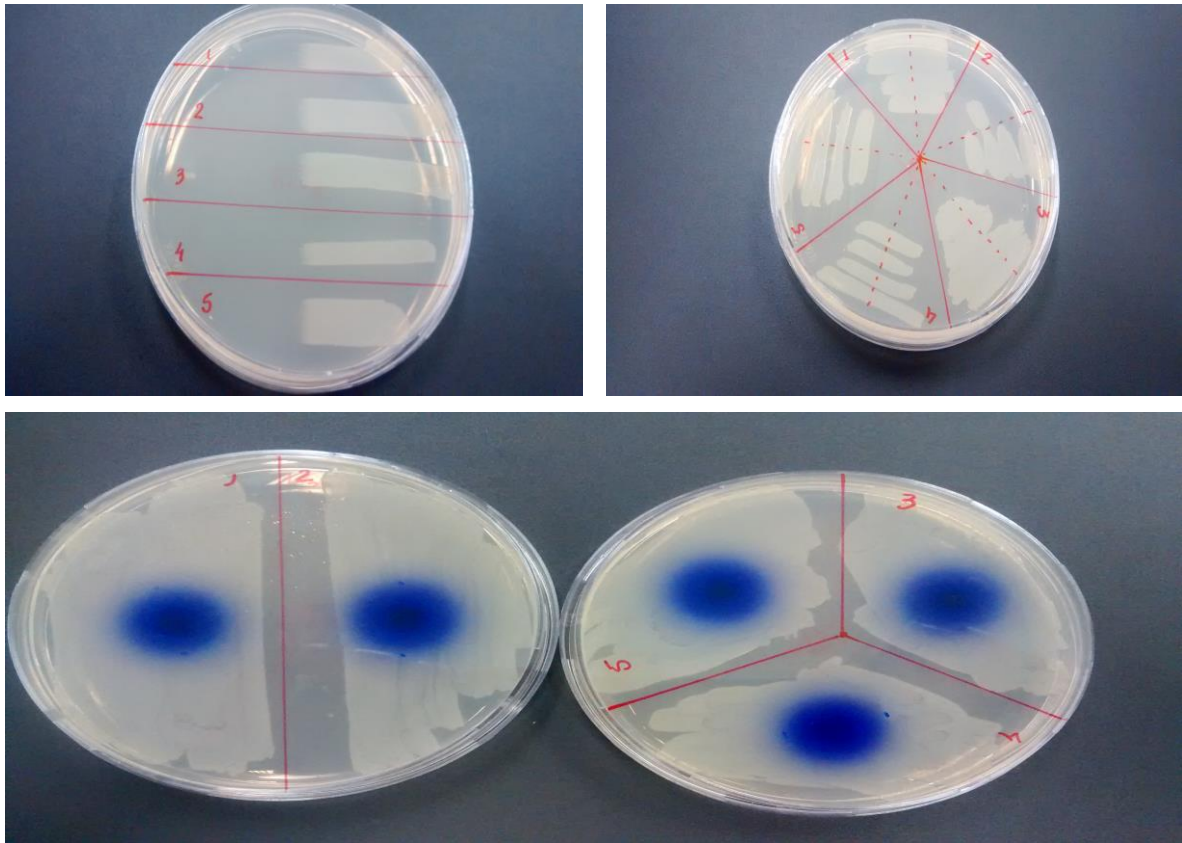


Figura 8 - Confirmação das linhagens das cepas *Salmonella* Typhimurium TA97a, TA98, TA100 e TA102, auxotróficas para o aminoácido histidina. **Fonte:** Os autores, 2016.

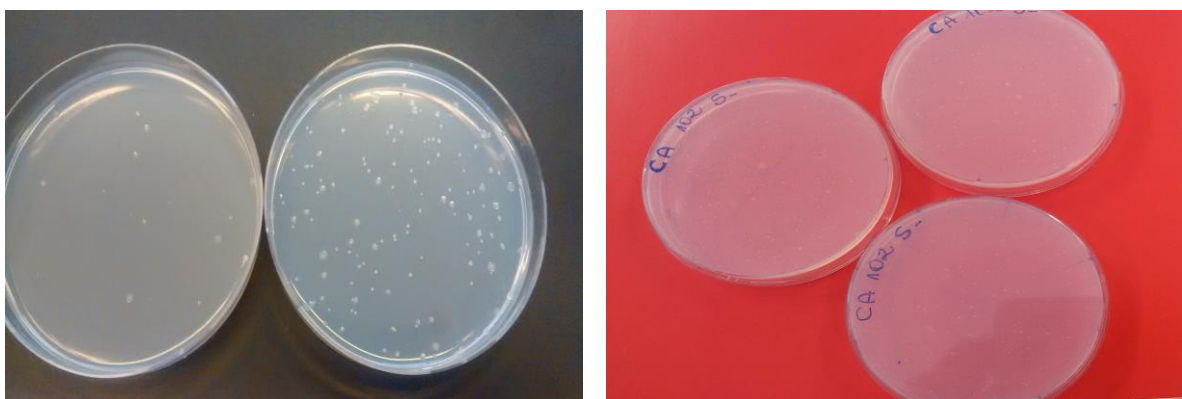


Figura 9 - Teste de Ames pelo ensaio de microssuspensão Kado com o extrato etanólico das folhas de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger (Bixaceae) - (Algodãozinho-do-cerrado). **Fonte:** Os autores, 2016.

Anexo II

THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL

ISSN: 2356-6140 (Print)

1537-744X (On-Line)

QUALIS: Interdisciplinar B1 (2014)

TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Author Guidelines**

DESCRIPTION

The Scientific World Journal is a peer-reviewed, open access journal covering a wide range of subjects in science, technology, and medicine. The journal's Editorial Board as well as its Table of Contents are divided into 98 subject areas that are covered within the journal's scope.

IMPACT FACTOR

2013: 1.219

ABSTRACTING AND INDEXING

The articles of The Scientific World Journal are included in the following databases/resources:

- Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
- Academic OneFile

- Academic Search Complete
- Access to Global Online Research in Agriculture (AGORA)
- AGRICOLA
- Agricultural Economics Database
- Agricultural Engineering Abstracts
- Agroforestry Abstracts
- Animal Behavior Abstracts
- Animal Breeding Abstracts
- Animal Production Database
- Aquatic Science and Fisheries Abstracts (ASFA)
- Biological Sciences
- Biotechnology and BioEngineering Abstracts
- Botanical Pesticides
- CAB Abstracts
- Cabell's Directories
- Calcium and Calcified Tissue Abstracts
- Chemical Abstracts Service (CAS)
- CINAHL Plus with Full Text
- CNKI Scholar
- CSA Engineering Research Database
- CSA Neurosciences Abstracts
- CSA Technology Research Database
- Directory of Open Access Journals (DOAJ)
- EBSCO Discovery Service
- EBSCOhost Connection
- EBSCOhost Research Databases
- Ecology Abstracts
- EMBASE
- Entomology Abstracts
- Environment Abstracts
- Environmental Impact
- Environmental Sciences and Pollution Management
- Forest Science Database

- Genetics Abstracts
- Global Health
- Google Scholar
- Health and Safety Science Abstracts
- Helminthological Abstracts
- HINARI Access to Research in Health Programme
- Horticultural Science Abstracts
- Index Medicus
- INSPEC
- J-Gate Portal
- MEDLINE
- Meteorological and Geostrophysical Abstracts
- Nutrition and Food Sciences Database
- Parasitology Database
- Plant Genetic Resources Abstracts
- Plant Genetics and Breeding Database
- Plant Protection Database
- Pollution Abstracts
- Primo Central Index
- ProQuest Advanced Technologies and Aerospace Collection
- ProQuest Agricultural Science Collection
- ProQuest Natural Science Collection
- ProQuest SciTech Collection
- ProQuest Technology Collection
- Protozoological Abstracts
- PubMed
- PubMed Central
- Review of Medical and Veterinary Entomology
- Review of Medical and Veterinary Mycology
- Risk Abstracts
- Scopus
- Soil Science Database
- Soils and Fertilizers Abstracts

- Sustainability Science Abstracts
- The Summon Service
- Tropical Diseases Bulletin
- Veterinary Bulletin
- Veterinary Science Database
- World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstracts
- WorldCat Discovery Services
- Zentralblatt MATH Database (zbMATH)

All of Hindawi's content is archived in Portico, which provides permanent archiving for electronic scholarly journals, as well as via the LOCKSS initiative.

EDITORIAL BOARD

The Editorial Board of the journal is organized into subject areas that correspond to the different research areas covered by the journal.

- Aerospace Engineering
- Agronomy
- Algebra
- Allergy
- Analytical Chemistry
- Anatomy
- Anesthesiology
- Astronomy
- Atmospheric Sciences
- Atomic and Molecular Physics
- Biochemistry
- Bioinformatics
- Biomaterials
- Biophysics
- Biotechnology
- Botany
- Cardiology

- Cell Biology
- Chemical Engineering
- Civil Engineering
- Communications
- Computational Biology
- Computer Science
- Condensed Matter Physics
- Critical Care
- Dentistry
- Dermatology
- Developmental Biology
- Ecology
- Electronics
- Emergency Medicine
- Endocrinology
- Energy
- Environmental Chemistry
- Epidemiology
- Evolutionary Biology
- Gastroenterology
- Genetics
- Genomics
- Geology
- Geometry
- Geophysics
- Geriatrics
- Hematology
- Hepatology
- High Energy Physics
- Immunology
- Infectious Diseases
- Inorganic Chemistry
- Marine Biology

- Materials Science
- Mathematical Analysis
- Mathematical Logic
- Mechanical Engineering
- Meteorology
- Microbiology
- Molecular Biology
- Molecular Imaging
- Nanotechnology
- Nephrology
- Neurology
- Neuroscience
- Nursing
- Nutrition
- Obstetrics and Gynecology
- Oceanography
- Oncology
- Operations Research
- Ophthalmology
- Optics
- Organic Chemistry
- Orthopedics
- Otolaryngology
- Parasitology
- Pathology
- Pediatrics
- Pharmaceuticals
- Pharmacology
- Physical Chemistry
- Physiology
- Probability and Statistics
- Psychiatry
- Public Health

- Pulmonology
- Radiology
- Rehabilitation
- Rheumatology
- Signal Processing
- Soil Science
- Structural Biology
- Surgery
- Tissue Engineering
- Toxicology
- Urology
- Vascular Medicine
- Veterinary Science
- Virology
- Zoology

AUTHOR GUIDELINES

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact tswj@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication

has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to tswj@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Microarray Data Submission

For any article that includes microarray data, this data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

The Scientific World Journal is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of The Scientific World Journal, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated

after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

International Commission on Zoological Nomenclature

When publishing papers which describe a new zoological taxon name, Hindawi aims to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). Therefore, for all papers that include the naming of a new zoological taxon, authors are requested to contact Zoobank, the online registration system for the International Commission on Zoological Nomenclature, to obtain a Life Science Identifier (LSID). Moreover, authors are requested to insert the following text in the “Materials and Methods” section, in a subsection to be called “Nomenclatural Acts”:

The new names contained in this article are available under the International Code of Zoological Nomenclature. This work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank. Zoobank Life Science Identifier (LSID) for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The LSID registration and any associated information can be viewed in a web browser by adding the LSID to the prefix “<http://zoobank.org/>.”

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects’ understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.