

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE IN VIVO E IN
VITRO, CITOTOXICIDADE E PROPRIEDADES
ANTIFÚNGICAS DE *Myracrodruon urundeuva* Allemão
SOBRE *Candida spp.* ISOLADAS DE CANDIDIASE
VULVOVAGINAL.**

VANESSA CORREA RORATO

**DOURADOS - MS
2013**

VANESSA CORREA RORATO

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE IN VIVO E IN
VITRO, CITOTOXICIDADE E PROPRIEDADES
ANTIFÚNGICAS DE *Myracrodruon urundeuva* Allemão
SOBRE *Candida spp.* ISOLADAS DE CANDIDIASE
VULVOVAGINAL.**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal da Grande Dourados – Faculdade
de Ciências da Saúde, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: KELLY MARI PIRES DE
OLIVEIRA
Co-orientadora: ANDRÉIA SANGALLI

DOURADOS - MS
2013

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo, a Deus, que me deu saúde, inteligência e perseverança para concluir mais essa etapa na minha vida.

Aos meus pais, Antônio Carlos Rorato e Wanda Correa Gomes Rorato, a quem serei grata por ter chegado até aqui. Nunca poderei retribuir à altura.

Ao meu irmão Willian Correa Rorato, pela paciência, pela força e pela alegria que sempre me transmitiram.

À prof^a Dr^a Andréia Sangalli, que me apresentou a planta a ser estudada e me incentivou no decorrer do caminho.

À prof^a Dr^a Kelly Mari Pires de Oliveira, que nesses dois anos passou a me orientar, me ensinar, a ter paciência e por sempre estar disposta a ouvir e eliminar as minhas dúvidas.

À Adriana Araújo de Almeida e a Fabiana Gomes da Silva pelos valiosos ensinamentos no laboratório, sendo muito importantes para finalizar minhas pesquisas.

À Aline Lima de Barros por me conduzir pelo caminho da toxicidade e por me ensinar a lidar com as valiosas ratinhas, essenciais para a nossa pesquisa.

À Priscila Dourado pela ajuda e a paciência na germinação das cebolas para o teste de genotoxicidade e citotoxicidade.

Ao Allan Belarmino Rodrigues, meu muitíssimo obrigado pela ajuda com a coleta, com a preparação das folhas e casca da aroeira, com a lida e a manutenção das ratas.

À prof^a Dr^a Anelise Samara Nazani Formagio, pela disponibilidade do laboratório e ao Lucas Noboru Trevizan no auxílio do preparo do extrato etanólico e suas frações.

Ao prof^o Dr^o Jonas da Silva Mota, pela preciosa ajuda com a caracterização química dos extratos e suas frações.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de poder cursar o mestrado em Ciências da Saúde e desenvolver está pesquisa.

Aos professores do mestrado de Ciências da Saúde, por nos direcionarem no caminho do aprendizado.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização deste trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. Nunca me esquecerei de vocês.



“Muito, muito grande é o poder que existe
Nas ervas, plantas, pedras e suas reais virtudes:
Pois nenhum ser que na Terra viva é tão vil
Que à Terra um dom especial não dê,
Dentro da casca nascente dessa flor frágil
O veneno tem moradia e o remédio, força.
Shakespeare.

Sumário

Agradecimentos.....	iii
Listas de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e símbolos.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Candidíase	3
2.2 Candidíase vulvovaginal	4
2.3 Tratamento de Candidíase.....	6
2.4 Resistência a antifúngicos.....	7
2.5 Utilizações de produtos fitoterápicos.....	7
2.5.1 Histórico do uso das plantas medicinais.....	7
2.5.2 Plantas medicinais no cerrado brasileiro.....	8
2.6 Busca de novos princípios químicos.....	9
2.6.1 Extração dos Princípios ativos.....	11
2.7 Toxicidade.....	13
2.8 Citotoxicidade e Genotoxicidade.....	14
2.9 <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão.....	14
2.9.1 Descrição Botânica.....	14
2.9.2 Uso Popular.....	16
2.9.3 Atividades Biológicas.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4 REFERÊNCIAS.....	19
5 ANEXOS.....	30
5.1 Artigo.....	30
5.2 Normas da revista International Journal of Molecular Sciences.....	47
5.3 – Fotos da etapa da dissertação.....	54

Lista de Figuras.

Figura 1. Desenho esquemático das classes dos princípios ativos extraídos de vegetais e seus respectivos solventes.....	12
Figura 2. <i>Myracrodruon urundeuva</i>	15

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alguns princípios ativos de plantas medicinais 11

Tabela 2. Plantas tóxicas e sua ação no organismo.....14

ARTIGO

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) dos extratos de *M. urundeuva* frente a isolados de *Candida* de CVV e cepas da AmericanType Culture Collection (ATCC)34

Tabela 2. Concentração de metabólitos secundários no extrato etanólico e aquoso e sua fração acetato de etila da casca de *M. urundeuva* pela técnica de HPLC.....35

Tabela 3. Efeito dos extratos etanólico e aquoso de *M. urundeuva* no crescimento da raiz de *Allium cepa* (mg/mL).....36

Tabela 4. Efeito citotóxico do extrato etanólico e aquoso de *M. urundeuva* em células de *Allium cepa*.....37

Listas de abreviaturas e símbolos

AcOEt	Acetato de Etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CVV	Candidíase Vulvovaginal
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
IPCS	International Programme on Chemical Safety
MeOH	Metanol
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)
MFC	Minimum Fungicidal Concentration (Concentração Inibitória Mínima)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
RCD	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografia de Camada Fina)
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
UV-vis	Espectroscopia UV/visível
UV	Ultravioleta
v/v	Volume do soluto em volume de solução

Resumo

A candidíase vulvovaginal (CVV) é considerada uma das infecções fúngicas oportunistas mais comuns entre as mulheres. Pesquisas demonstram que aproximadamente 75% dessas apresentam pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, onde 40% a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes, devido à resistência aos antifúngicos, o tratamento definitivo da CVV tem representado grande desafio para médicos e pesquisadores. Estes por sua vez estão alavancando pesquisas para encontrar novas substâncias que atuem diretamente nas leveduras que causam a CVV. Em visita a algumas aldeias na região de Dourados – MS observou-se a utilização da casca de *Myracrodruon urundeuva* em banhos de assento por algumas indígenas. Na presente pesquisa, procuramos avaliar através da CIM e da CFM a eficácia do extrato etanólico, aquoso e suas frações de acetato de etila e clorofórmio de *M. urundeuva* sobre culturas de *Candida sp.* isoladas de infecções vulvovaginais e provenientes de cepas da ATCC. A identificação do metabólito secundário foi realizada pela técnica de HPLC com detector de diodos. A toxicidade *in vivo* foi verificada através da toxicidade aguda em ratos *Wistar*, já a toxicidade *in vitro* e a genotoxicidade, foi analisada através do teste de *Allium cepa*. Com base nos resultados, pode-se concluir que *M. urundeuva* apresentou boa atividade frente a leveduras do gênero *Candida*, principalmente *C. krusei* e *C. tropicalis* e ação moderada sobre *C. albicans*. A análise química dos extratos confirmaram a presença de fenóis, taninos e flavonóides do tipo chalconas e flavonol, porém seus extratos etanólico e aquoso apresentaram efeito tóxico e citotóxico sob as células de *Allium cepa* e toxicidade aguda em ratos *Wistas*, mas não foi observada nenhuma alteração histológica nas lâminas observadas. Considerando bom resultado antifúngico seu uso como banho de assento é indicado para o tratamento de candidíase vulvovaginal, mas seu uso interno é desaconselhável, pois apresentou toxicidade aguda em ratos *Wistar* e citotoxicidade em células de *Allium cepa*, sugerimos mais estudos toxicológicos dos extratos da casca e da folha com análises histológicas em outros órgãos, especialmente no sistema nervoso.

Palavras-chave: planta medicinal, *Candida spp.*, toxicidade.

Abstract

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is considered one of the most common opportunistic fungal infections among women . Research shows that approximately 75 % of these have at least one episode of fungal vulvovaginitis in your life , where 40 % to 50 % experience new outbreaks and 5 % become recurrent , due to resistance to antifungal agents , the definitive treatment of VVC has represented large challenge for physicians and researchers . These in turn are leveraging research to find new substances that act directly on the yeast that cause CVV . Visiting some villages in the region of Gold - MS observed the use of the bark of *M. urundeuva* in sitz baths for a few Indians. In this research , we evaluate through the MIC and MFC efficacy of ethanol extract and aqueous fractions of ethyl acetate and chloroform *M. urundeuva* on cultures of *Candida* sp . isolated from vulvovaginal infections and strains from the ATCC . The identification of secondary metabolite was performed by HPLC with diode detector . The in vivo toxicity was measured by the acute toxicity in rats , since the toxicity and genotoxicity in vitro , was analyzed using the *Allium cepa* test . Based on the results, it can be concluded that *M. urundeuva* apesentou good activity against *Candida* species , especially *C. krusei* and *C. tropicalis* and moderate activity against *C. albicans*. Chemical analysis of the extracts confirmed the presence of phenols , tannins, flavonoids and chalcones and flavonol type , but its ethanol and aqueous extracts showed toxic and cytotoxic effect on the cells of *Allium cepa* and acute toxicity in mice *Wistas* but observed no change observed in histological slides . Antifungal good result considering its use as sitz bath is indicated for the treatment of vulvovaginal candidiasis , but its internal use is inadvisable , as it showed acute toxicity in rats and cytotoxicity in cells of *Allium cepa* , suggest further toxicological studies of extracts of bark and histological analyzes of the sheet with other organs , especially in the nervous system.

Keywords: medicinal plant , *Candida* spp . , Toxicity.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

R787i Rorato, Vanessa Correa.
Investigação química, toxicidade in vivo e in vitro,
citotoxicidade e propriedades antifúngicas de
Myracrodruon urundeuva Allemão sobre Candida spp.
isoladas de candidíase vulvovaginal / Vanessa Correa
Rorato – Dourados-MS : UFGD, 2013.
63 f.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Mari Pires de
Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Candidíase vulvovaginal. 2. Plantas medicinais. 3.
Infecção fúngica. I. Oliveira, Kelly Mari Pires de. II.
Título.

CDD: 616.31

1 - INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à história da humanidade e os produtos de origem vegetal são as principais fontes para a produção de novos medicamentos. A ação antifúngica e antimicrobiana de certas plantas medicinais é considerada eficiente e seu uso é difundido em todo mundo, em especial na América do Sul, contribuindo significativamente para a atenção primária a saúde [1].

As propriedades antifúngicas das plantas medicinais são cada vez mais relatadas em diferentes partes do mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que os extratos de diferentes espécies vegetais ou seus princípios ativos são utilizados na medicina popular em terapias tradicionais de 80% da população mundial [2;3]. Porém, a maioria dos extratos vegetais utilizados não tem comprovação científica do seu uso, muito menos sobre seus possíveis efeitos tóxicos. Para assegurar o uso desses produtos, deve-se submetê-los a testes toxicológicos que comprovem seu uso em segurança [4].

Dentre essas diferentes espécies, destaca-se a *Myracrodruon urundeuva* Allemão que pertence à família Anacardiaceae, uma espécie decídua, heliófita e seletiva xerófila, sendo conhecida popularmente como aroeira, aroeira-do-sertão ou urundeúva [5]. Sua distribuição natural corresponde pela região nordeste, sudeste e centro-oeste do Brasil até os charques Bolivianos, Paraguaio e Argentinos [5]. Na medicina popular, a infusão de seu caule é utilizado como anti-inflamatório, antiúlcera, anti-histamínico e cicatrizante de feridas [6, 7, 8], sangramento gengival e desordens ginecológicas [9].

Durante visitas às aldeias indígenas de Dourados – MS - Brasil observou-se o uso de infusões da casca de *Myracrodruon urundeuva* no tratamento de candidíase vulvovaginal, e segundo relato das índias jaguapirunas, a utilização na forma de banho de assento promove ausência de sintomas (comunicação pessoal).

A candidíase vulvovaginal é causada por organismos patógenos oportunistas que podem causar infecções locais e sistêmicas em pessoas predispostas, é considerada uma das infecções fúngicas oportunistas mais comuns entre as mulheres. Pesquisas demonstram que aproximadamente 75% dessas apresentam pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, sendo que 40% a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se

recorrentes [10]. Entre as várias espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é a espécie mais frequente [11], seguida pela *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondi* e *C. parapsilosis*, dentre outras [12, 13, 14].

Na presente pesquisa, procuramos avaliar a eficácia do extrato etanólico, aquoso e suas frações de acetato de etila e clorofórmio de *M. urundeuva* sobre culturas de *Candida spp.* isoladas de infecções vulvovaginais e provenientes de cepas da ATCC, sua investigação química, sua toxicidade *in vivo* e *in vitro* e sua genotoxicidade.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Candidíase

Infecções oportunistas são causadas por fungos de baixa virulência, que podem conviver tranquilamente com o hospedeiro, ma, ao encontrarem um ambiente propício ao seu desenvolvimento podem causar distúrbios do sistema imunodefensivo [15]. Essas leveduras podem causar infecções superficiais tais como aftas e vaginites, no entanto, se a defesa imunitária do hospedeiro ficarem comprometidas, podem causar infecções sistêmicas graves [16, 17].

Algumas dessas leveduras causam a candidíase. Essa é uma infecção fúngica ocasionada pela presença de leveduras do gênero *Candida*, que faz parte da família *Cryptococcaceae*, sendo reconhecidas cerca de 81 espécies, destacando-se *C. albicans* pela sua virulência e potencial para promover doenças [18].

A candidíase é a quarta doença mais comum em todo planeta, dentre as infecções sanguíneas nosocomiais, superando infecções causadas por bactérias Gram-negativas. A frequência de infecções por *Candida* vem aumentando regularmente em hospitais de todo mundo [19]. No Brasil, a candidíase foi a segunda micose que mais matou pacientes HIV positivos entre os anos de 1996 e 2006. As regiões Sudeste e Nordeste foram as que exibiram maior número de mortes, e o Estado que mais apresentou mortes por candidíase foi o Estado de São Paulo [20].

A candidíase vem tornando-se um objeto de constante estudo nas ciências médicas e áreas afins, pois tem-se observado o aumento da evolução terapêutica nas últimas décadas, visto o aumento considerável na sobrevida dos pacientes, particularmente dos imunodeprimidos que se tornou um grupo propício para o desenvolvimento de infecções fúngicas [21, 22].

Os avanços diagnósticos e terapêuticos surgidos nas últimas décadas favoreceram o tempo de sobrevida de pacientes transplantados, de pacientes onco-hematológicos, daqueles que padecem de doenças crônicas, dos recém-nascidos prematuros, dos imunodeprimidos, dos queimados, de pacientes críticos,

traumatizados e cirúrgicos, entre outros. Tais avanços condicionam o aparecimento e o incremento de uma população com alto risco de sofrer infecções fúngicas secundárias [23, 24, 25].

Para realizar a colonização e invasão nos tecidos e evitar o mecanismos de defesa do hospedeiro, *C. albicans* desenvolveu uma série de complexos fatores de virulência [26]. Esses incluem a troca fenotípica com habilidade de mudar a morfologia da célula, ou seja, de levedura para crescimento de hifas; habilidade de adesão à célula hospedeira; e atividade lipolítica e pólitolítica extracelular [27].

É grande o interesse em espécies de *Candida* não-*albicans*, devido ao aumento e a mudança do perfil epidemiológico das candidíases. As espécies emergentes são favorecidas pelo aumento de pacientes imunocomprometidos, pelo uso de novas práticas médicas e pela pressão medicamentosa de certos antifúngicos, por exemplo, o amplo uso de fluconazol que selecionou espécies não suscetíveis (*C. krusei*) ou menos suscetíveis (*C. glabrata*) [28, 29, 30, 31].

2.2 Candidíase vulvovaginal

Espécies de *Candida* habitam normalmente o corpo humano, mas quando passam do seu estado colonizador (assintomático) a agente infeccioso (vaginite sintomática), desencadeiam candidíase vulvovaginal [32]. Candidíase vulvovaginal é uma infecção da mucosa vaginal que atinge principalmente a vulva e a vagina, responsável pelos problemas ginecológicos que atingem mulheres em idade reprodutiva. Aproximadamente 75% das mulheres adultas apresentam pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal em sua vida, sendo que 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes [10].

Entre 85 e 95% dos isolados da vagina são pertencentes à espécie *C. albicans*. Das espécies não-*albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são as mais comuns. Essas espécies não-*albicans* são frequentemente mais resistentes ao tratamento convencional [33] e são responsáveis por mais de 33% dos casos de recorrência da doença [34].

Define-se candidíase vulvovaginal recorrente como uma infecção por *Candida* caracterizada por quatro ou mais episódios no período de 12 meses. Isso ocorre quando a levedura não é completamente eliminada pela vagina,

permanecendo assim baixa a concentração. Já, a reinfecção refere-se ao quadro em que a levedura é completamente erradicada da vagina e novamente é introduzida pelo ato sexual ou pelo trato gastrointestinal [14].

A candidíase vulvovaginal é mais prevalente em mulheres de 25 – 35 anos, sendo caracterizada clinicamente pelos seguintes sintomas: prurido vulvar intenso, produzindo escoriações e até fissuras superficiais, leucorréia escassa e inodora, dispareunia, disúria, edema e eritema vulvovaginal, sendo o prurido o sintoma mais importante [35]. Existem situações que contribuem para o aparecimento da candidíase, dentre elas a gravidez e diabetes em combinação com mudanças normais na flora vaginal, o uso de anticoncepcionais orais com altas doses de estrogênio, o uso de antibióticos, corticosteroides e drogas imunossupressoras [36].

Estimou-se que 55,7% de todas as mulheres terão pelo menos um episódio de vulvovaginite por *Candida* sp. ao longo da vida [37]. No Brasil, foram estimados três milhões de episódios ao ano, gerando gasto anual em torno de 80 a 100 milhões de dólares. Estes índices representam prejuízo social e econômico considerável ao país [38]. Nos Estados Unidos, foram estimados os custos para diagnósticos, tratamentos e as despesas com atestados médicos, de um bilhão de dólares por ano [39]. É importante reduzir o número de casos de candidíase vulvovaginal principalmente nos países em desenvolvimento, pois sua incidência pode causar perda significativa de horas de trabalho, podendo ocorrer danos psicológicos, especialmente nos casos crônicos, causando um encargo financeiro significativo em uma economia fragilizada [36].

Usualmente, empregam-se agentes imidazólicos e triazólicos, entre eles destacam-se a administração do fluconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol e cetoconazol, além dos agentes poliêmicos (nistatina e anfotericina B); entretanto, algumas espécies de *Candida* não - albicans são resistentes à primeira linha de antifúngicos, como o fluconazol, especialmente em grupos de pacientes clinicamente complexos (portadores de HIV); portanto novas terapias antifúngicas são necessárias para um tratamento alternativo [40].

2.3 Tratamento da Candidíase

A escolha do tipo de antifúngico, assim como sua formulação é feita a partir do quadro clínico que o paciente desenvolve. Nas candidíases superficiais, devem ser afastados os fatores que favorecem a patogenicidade da levedura e utilizados fármacos, geralmente de uso tópico, que quase sempre levam a bons resultados. Existem na atualidade agentes orais muito bem absorvidos e que são empregados nas candidíases oral e vaginal. Já, nos processos sistêmicos, utiliza-se a medicação oral ou parenteral. Nas candidíases superficiais, podem-se empregar solução de violeta de genciana, bicarbonato ou borato de sódio, compostos iodados, derivados imidazólicos, como o clotrimazol, miconazol, cetoconazol, oxiconazol, terconazol, e derivados poliêmicos, como a nistatina. Em casos mais extensos, podem-se empregar drogas sistêmicas como o itraconazol ou o fluconazol. Na candidíase sistêmica, a anfotericina B é um dos fármacos de eleição, sendo também empregados a 5-fluorocitosina e os derivados triazólicos como o fluconazol e o itraconazol [18].

O tratamento para a CVV inclui a nistatina e qualquer agente farmacêutico que contém um produto azólico, tais como o miconazol, clotrimazol ou fluconazol, que pode vir na forma de supositórios, comprimidos e cremes vaginais. Usar uma medicação para combater a CVV pode ser caro e o uso, principalmente de cremes vaginais, pode causar irritação local. Uma vez que os sintomas reduzem, o tratamento muitas vezes é interrompido, antes que a doença seja completamente erradicada [41].

O clotrimazol é o principal antifúngico para o tratamento de CVV; o fluconazol só é utilizado em casos em que o paciente não apresenta resposta satisfatória para o clotrimazol [42]. O fluconazol é um agente antifúngico do grupo dos azólicos, este é administrado por via oral por uma única dosagem [43].

Acredita-se que o tratamento inadequado possa contribuir para a persistência da infecção e, conseqüentemente, para a candidíase crônica e recorrente. Além disso, o tratamento sistêmico também apresenta limitações [44].

2.4 Resistência a antifúngicos.

A resistência microbiana é um grande problema que diz respeito aos patógenos humanos, inclusive os fungos. A resistência antifúngica vem sendo monitorada por diferentes grupos de pesquisa em todo mundo, com o aumento da sobre vida em pacientes imunocomprometidos, infecções invasivas devido à *Candida não-albicans* resistentes ao fluconazol pode ser um problema cada vez mais crescente em vários centros médicos [45, 46].

O diagnóstico tardio e o relativo número reduzido de classes de antifúngicos terapêuticamente disponíveis contribuem para a mortalidade, que muitas vezes é atribuída às infecções sistêmicas. Aliado a isso, a resistência fúngica aos agentes disponíveis torna-se problema para alguns grupos de pacientes, principalmente os imunocomprometidos [47].

As taxas de resistência de isolados sanguíneos de *Candida glabrata* ao fluconazol alcançam níveis de 7 a 14% em hospitais dos Estados Unidos e 3,7 a 40% em hospitais europeus [46].

C. glabrata e *C. krusei* apresentam menor susceptibilidade ao fluconazol e tem-se observado aumento nos níveis de colonização e infecção, principalmente por *C. glabrata*, em diferentes grupos de pacientes com exposição prolongada ao fluconazol e a anfotericina B [48]. Leveduras como a *C. lusitanea* e *C. guilhermondii* apresentam resistência primária à anfotericina B [49], *C. krusei* e *C. parapsilosis* apresenta resistência intrínseca aos antifúngicos utilizados na rotina terapêutica [50].

2.5 Utilizações de produtos fitoterápicos

2.5.1 Histórico do uso das plantas medicinais

A utilização de plantas para fins medicinais teve origem nas várias culturas que povoaram o Brasil. Para muitas comunidades e grupos étnicos, as plantas medicinais constituem o único recurso terapêutico para a cura ou o alívio de algumas doenças [51]. Detentores de conhecimentos folclórico ou popular como os

raizeiros, benzedores, xamãs, curandeiros, etc., transmitem sua sabedoria para futuras gerações, para que a fitoterapia possa continuar se desenvolvendo e para que todas as informações tradicionais de vários grupos étnicos não se percam ou sejam incorporadas por outros países mais ricos e mais desenvolvidos [51].

Em 1533, foi criada a primeira cátedra de botânica na Escola de Medicina de Pádua, contribuindo para a ascensão da fitoterapia e a difusão da publicação de herbários. Na Alemanha, em 1545, foi elaborada uma lista com mais de 300 espécies de plantas medicinais, sendo a primeira farmacopeia [52].

A partir do século XIX houve declínio no uso da terapia vegetal. Os cientistas passaram a extrair os princípios ativos mais importantes das plantas, como o mentol (hortelã pimenta) e a aspirina (da bétula, gualtéria e ulmária) [53]. Após a Segunda Guerra Mundial e com o avanço dos medicamentos sintéticos e da indústria farmacêutica, o uso das plantas medicinais foi praticamente esquecido pela população em geral [53].

É importante salientar que a própria história da botânica se confunde com a busca de plantas com interesse medicinal. Muitos dos primeiros trabalhos que buscavam nomear e categorizar os vegetais tinham como objetivo catalogar plantas medicinais. A influência das plantas medicinais na botânica é tão antiga que os primeiros autores da botânica são denominados “herbalistas”, alusão às indicações sobre o uso de ervas [54].

Atualmente, os fitoterápicos são amplamente utilizados em diversos países. Na África, por exemplo, 80% da população depende do uso destes medicamentos, os quais representam alternativa para o tratamento de várias doenças frente ao alto custo dos fármacos sintéticos [55]. Estima-se que cerca de 60% dos fármacos com atividades antitumorais e antimicrobianas, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica, sejam de origem vegetal [57].

2.5.2 Plantas medicinais no Cerrado Brasileiro.

O Brasil possui diversidade de espécies vegetais, sendo que a vegetação se agrupa em seis áreas distintas e de grande abundância de plantas nativas, Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Pradarias, Caatinga e Amazônia. Um dos Biomas de destaque é o Cerrado. Esse complexo vegetacional é de grande

importância por sua diversidade biológica, devendo ser considerada área prioritária para os estudos sobre plantas medicinais [57].

O Bioma Cerrado está localizado no Planalto Central com extensão de 2.036.448 Km², ocupando 23,92% do território nacional [57], sendo um complexo vegetacional que apresenta fisionomias incluindo formações savânicas, florestais e campestres. Apresenta áreas de transição com todos os biomas brasileiros com exceção do bioma Pampa, que ocorre no sul do Brasil [58]. O Estado do Mato Grosso do Sul está inserido nesse bioma. Este possui vasta extensão de cerrado que ocupa mais da metade do seu território, além do Pantanal, das florestas e das diferentes áreas de ecótono. O cerrado é reconhecido mundialmente como um dos 25 “hotspots”, tem grande parte da sua flora composta por espécies endêmicas, o que lhe confere o título de savana mais diversificada do mundo [59].

Estudos abordando a flora medicinal do Mato Grosso do Sul restringem-se a poucos trabalhos, alguns artigos e monografias, os quais ficam pouco disponíveis. As plantas medicinais do Cerrado são discutidas muitas vezes junto com espécies de outros ambientes e por isso não se tem um número exato de quantas são nativas no cerrado sul-mato-grossense [60].

O Brasil é considerado um país rico na sua biodiversidade, mas é extremamente carente nas pesquisas que envolvem o uso medicinal e dos princípios químicos das plantas medicinais usadas popularmente [61].

As plantas do Cerrado têm sido estudadas por suas potencialidades terapêuticas e dentre estas merecem destaque por suas propriedades antifúngicas: *Hyptis suaveolens* (bamburral) [62], *Eugenia uniflora* (pitanga) [63] e *Lafoensia pacari* (dedaleira) [64]. Outras como *Eugenia dysenterica* (cagaita) [65], e *Physosiphon emarhinatus* (sucupira branca) [66], atuaram na inibição do crescimento de *Candida albicans*.

2.6 Busca de novos princípios químicos.

As plantas sintetizam compostos químicos a partir de nutrientes, de água e da luz que recebem. Muitos desses compostos podem provocar reações

biológicas, interagindo com o organismo humano, essas substâncias são os princípios ativos [51].

O ambiente natural é fundamental para a pesquisa do potencial das plantas medicinais, pois as plantas cultivadas podem alterar a concentração dos seus componentes químicos [67].

Para que um princípio ativo seja comprovado cientificamente, é preciso passar por duas etapas, sendo que a primeira consiste em estudos farmacológicos, pré-clínicos e toxicológicos, complementados pelos ensaios clínicos e estudos de toxicologia humana, aguda, subaguda e crônica. Na segunda, faz-se o estudo químico com vista ao isolamento e caracterização do princípio ativo por processo de separação monitorado farmacologicamente [51].

O metabólito primário de uma planta provém de suas funções básicas vitais, tais como sua reprodução, crescimento celular, respiração, estocagem e reprodução [68].

As plantas verdes são de significado primordial, pois são seres autótrofos. No interior de cada uma de suas células, um conjunto de reações químicas está ocorrendo a cada momento. Este mecanismo, conhecido como metabolismo vegetal, é comandado por enzimas específicas que garantem certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Essas reações visam, primeiramente, ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula como energia, poder redutor e biossíntese das substâncias essenciais a sua vida, que é o metabolismo primário [51].

Os metabólitos secundários são compostos micromoleculares selecionadas para conferir vantagens adaptativas às plantas. Essas substâncias participam diretamente das interações bioquímicas de convivência e comunicação entre as plantas e os vários organismos vivos [51] e podem ser definidos como compostos químicos biologicamente ativos e encontrados em pequenas concentrações. Estes são empregados pela planta na defesa contra agentes abióticos e bióticos, pode-se dizer que os metabólitos secundários se aproximam ao sistema imunológico dos mamíferos [69].

Os metabólitos secundários podem sofrer algumas influências ou variações, tais como o desenvolvimento foliar ou o surgimento de novos órgãos

[70]. Entretanto, sabe-se que atualmente as principais funções dos produtos do metabolismo secundário são: atuar como agentes de defesa para combater os organismos patogênicos, insetos fitófagos e herbívoros predadores; e atuar como agente de competição para modificação do comportamento germinativo e do crescimento de espécies vegetais estranhas. Além disso, alguns dos fatores apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influenciar em conjunto no metabolismo secundário, como por exemplo: desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico; temperatura e altitude [71].

Na Tabela 01 estão presentes alguns princípios ativos extraídos de plantas medicinais.

Tabela 01: Alguns princípios ativos de plantas medicinais.

Princípios ativos	Plantas	Autor
β -tujona, cânfora e α -tujona	<i>Artemisia sieberi</i> (Artemísia)	[72]
Quinonas, compostos fenólicos e esteroides	<i>Lippia sidoides</i> (Alecrim pimenta)	[73]
Terpenos, especialmente α -pinemo e canfemo	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Alecrim)	[74]
Mentol, mentofurano, limoneno, felandreno e α -pinemo	mentona, terpineno, cineol, pimenta)	[74]
Mirceno, neral e geraniale.	<i>Cymbopogon citratus</i> (Capim-limão)	[74]
Chalconas enriquecidas, tipo catequético e pirogálico, urundeuva A e B, flavonoides, alfa-pineno, gama-terpineno e beta cariofileno	<i>Myracrodruon urundeuva</i> (Aroeira)	[75, 76, 77, 5]

2.6.1 Extração dos princípios ativos

Para a extração desses princípios ativos utiliza-se a preparação de extratos da parte estudada da planta (folha, casca, raiz ou capítulos florais) geralmente seca, moída em um moinho de facas. Geralmente os extratos são

obtidos por percolação que consiste no processo de extração por solventes aquosos ácidos ou básicos e solventes orgânicos imiscíveis com água (éter, CHCl_3 , AcOEt) [78]. Geralmente em primeira análise é usualmente adequado o preparo do extrato hidroalcoólico (etanol:água 50/50, v/v). Caso a análise desse extrato apresente efeito biológico, cabe agora separar os princípios ativos, nesse caso, para a obtenção do extrato bruto mistura-se com o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos [79].

Posteriormente, esse extrato é submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, como o hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando a purificação das substâncias por meio de suas polaridades [79] (Figura 1).

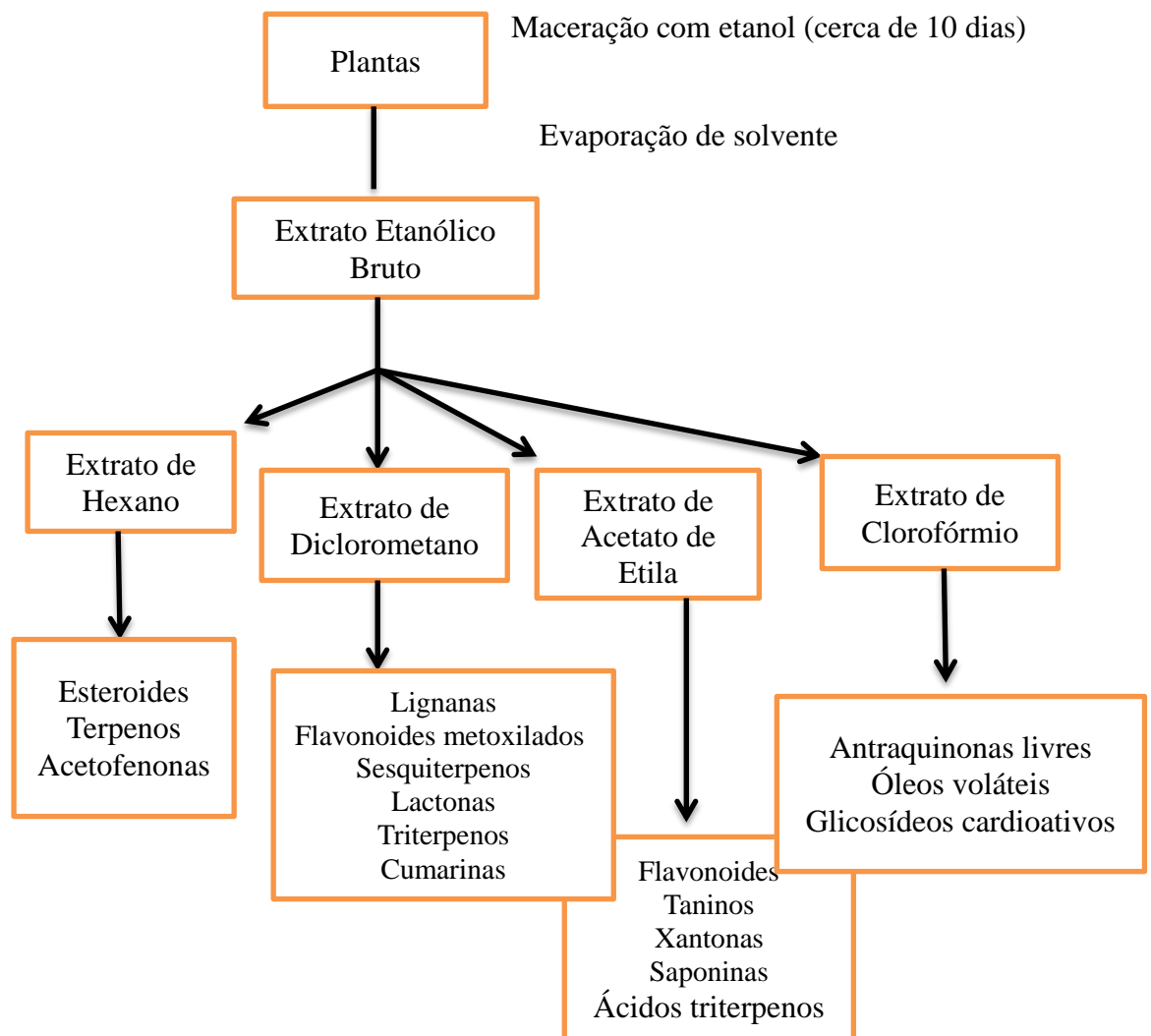


Figura 1: Desenho esquemático das classes dos metabólitos secundários extraídos de vegetais e seus respectivos solventes [79].

O aproveitamento adequado dos princípios ativos extraídos de uma planta exige o preparo correto, ou seja, para cada parte a ser usada ou doença a ser tratada existe uma forma de preparo e uso adequados [80].

2.7 Toxicidade

Os estudos toxicológicos têm por finalidade reavaliar a ideia de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o seu uso seja seguro e totalmente eficaz [51].

Para assegurar a indicação desses produtos, é necessário a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e testes toxicológicos pré-clínicos sendo que estes testes são realizados com animais de laboratório [81]. No Brasil, as normas para a realização de ensaios toxicológicos estão contidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e na Resolução Específica (RE) nº 90/2004, que padroniza os ensaios toxicológicos pré-clínicos [82].

A avaliação toxicológica geral é considerada fundamental como bioensaio preliminar no estudo de substâncias com propriedades biológicas. O primeiro tipo de teste toxicológico é o agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24 a 48 horas) do composto, mas com doses bem mais elevadas que a usual [83].

Os estudos toxicológicos podem ser realizados com camundongos e ratos, machos e fêmeas de linhagens exogâmicas bem definidas e de características fisiológicas conhecidas [84]. Neste modelo de estudos toxicológicos pode-se observar a ocorrência de efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, a exemplo do confrei (*Symphytum officinale*) ou até mesmo observar se esses efeitos ocorrem a longo prazo e de forma assintomática [85].

Considerando a produção de metabólitos das plantas, alguns são considerados tóxicos, podendo gerar reações alérgicas e tóxicas quando em contato com o corpo humano [85].

2.8 – Citotoxicidade e Genotoxicidade

Estima-se que hoje em dia milhões de trabalhadores são expostos em sua rotina de trabalho a compostos químicos, dos quais muitos tem ação mutagênica e carcinogênica comprovada. Podemos citar como exemplo os riscos aos quais estão sujeitos os agricultores excessivamente expostos a pesticidas, agentes químicos que tem demonstrado ação citotóxica e genotóxica em células humanas [86].

A citotoxicidade de uma substância pode ser analisada através de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo que está sendo testado e pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos [87].

A genotoxicidade ou toxicologia genética avalia os efeitos dos agentes químicos e físicos tanto no DNA como nos processos genéticos das células. Algumas mutações despertam interesse pela medicina por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, como o câncer e a arteriosclerose [88].

A detecção de substâncias potencialmente citotóxicas e genotóxicas e seus prováveis efeitos no organismo é muito importante no estudo do impacto que eles podem trazer para um organismo. O emprego de bioindicadores e a utilização de organismos fenotipicamente mais sensíveis a lesões no DNA e que expressem qualquer alteração externa podem ser utilizados para essas avaliações [87].

Um método de análise das alterações cromossômicas pode ser observada com o teste *Allium cepa*. Este método é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade e citotoxicidade de substâncias ambientais [89].

2.9 – *Myracrodruon urundeuva* Allemão

2.9.1 – Descrição Botânica

Myracrodruon urundeuva é conhecida popularmente como aroeira, aroeira-da-serra, aroeira-verdadeira e aroeira-do-sertão (Figura 02) é uma árvore

que pertence à família Anacardiaceae, possui uma larga distribuição geográfica, podendo ser encontrada no México, Argentina, Bolívia e Paraguai. No Brasil podemos encontrá-la no Nordeste, onde é considerada nativa, em São Paulo e Mato Grosso do Sul [90].



Detalhe das folhas



Detalhe do tronco



Visão de um exemplar de *M. urundeuva*

Figura 2 – detalhes de *M. urundeuva*.

Sua madeira apresenta grande resistência mecânica com alta concentração de taninos e é praticamente imputrescível, muito utilizada na construção civil para a obtenção de vigas, ripas, caibros e tacos para assoalho [5].

Juntamente com outras espécies de grande importância econômica, a aroeira tem sido amplamente explorada, resultando a diminuição de exemplares e em alguns casos a extinção [77].

Várias pesquisas estão utilizando o *M. urundeuva*, focando a análise de seus usos farmacológicos, a presença em sistemas agroflorestais, a conservação de seus recursos genéticos, estudos químicos e bioquímicos [91, 92, 93, 94].

2.9.2 – Uso Popular.

A *M. urundeuva* apresenta propriedades medicinais passadas através de gerações. Seu extrato aquoso da casca auxilia no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias e distúrbios no sistema digestório e cicatrização [95, 96]. Sua casca é utilizada como anti-séptico, antiúlcera, anti-inflamatórios, anti-histamínica, anti-bradicina, antidiarreicos, para tratamento de doenças respiratórias e infecções urinárias [97, 75]. Segundo Maia [90] na medicina tradicional nordestina e em algumas tribos indígenas, a infusão da casca de *Myracrodruon urundeuva* é utilizada na forma de semicúpio (banho-de-assento) após o parto.

De acordo com os conhecimentos empíricos, o chá produzido a partir da sua casca combate gripes, bronquite, além de ser tranquilizante e balsâmicos e, quando fervida, sua casca forma uma gelatina que pode substituir o gesso, no caso de fraturas [98]. Machado *et al.* [99] relatam o uso popular da infusão da casca de *M. urundeuva* para o tratamento de sangramento gengival e de doenças ginecológicas.

2.9.3 – Atividades Biológicas

Através dos estudos químicos foram encontrados diversos compostos fenólicos na fração de acetato de etila da casca, dentre eles podemos citar os taninos dos tipos catéuico e pirogálico, chalconas diméricas, taninos condensados e outros flavonóides, que mostraram biologicamente ativo [75]. Seu óleo essencial é extraído da folha e apresenta aproximadamente 16 constituintes, sendo o alfa-pineno, gama-terpineno e o beta-cariofileno apresentam destaque [100].

Souza et al. [101] demonstrou em ratos tratados com o extrato etanólico da casca de aroeira tiveram uma regeneração completa do tecido epitelial, enquanto que o exsudato inflamatório persistiu nos controles e a regeneração do tecido ocorreu através da fibrose, como avaliado no modelo de ácido acético-colite induzida. Alguns estudos científicos comprovaram que extratos da casca da aroeira tem ação anti-inflamatória, cicatrizante, antiúlcera, anti-histamínico e analgésicos [101]. Outro estudo observou-se que o extrato aquoso da casca de *M. urundeuva* reduziu significativamente a formação do biofilme de *Streptococcus mutans* em ratos e o acúmulo de *S. mutans* em esmalte do dente em desmineralização [102].

Montanari *et al* [103] testaram o óleo essencial das folhas de alguns exemplares da família Anacardiaceae, dentre essas espécies *M. urundeuva*. O óleo essencial da folha demonstrou atividade antibacteriana no MIC com as concentrações de 0,31g/L (*E. coli* e *S. aureus*) e 0,63g/L (*B. cereus*).

Sá *et al* [93] analisaram a atividade antifúngica e antibacteriana do cerne de *Myracrodruon urundeuva*. O principal principio ativo do cerne de *Myracrodruon urundeuva*, a lecitina apresentou ação inibitória com a menor concentração do MIC de $0,58\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ sobre o crescimento das seguintes bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium callunae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendo a maior ação inibitória contra a *S. aureus*. Também apresentou ação antifúngica contra os seguintes fungos testados: *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. decemcellulare* e *F. lateritium*.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

- Avaliar a eficácia da *Myracrodruon urundeuva* sobre culturas de *Candida sp.* isoladas de infecções vulvovaginais, sua toxicidade in vivo e in vitro e sua genotoxicidade.

3.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antifúngica e a ação fungicida do extrato etanólico e suas frações de *Myracrodruon urundeuva* diante de leveduras isoladas de candidíase vulvovaginal;
- Analisar o efeito tóxico do extrato etanólico e aquoso da casca e das folhas de *Myracrodruon urundeuva* em ratas Wistar adultas;
- Avaliar a mutagenicidade e a citotoxicidade do extrato etanólico e aquoso da casca e da folha de *Myracrodruon urundeuva*;
- Identificar os principais metabólitos secundários presentes no extrato etanólico, aquoso e acetato de etila da casca de *Myracrodruon urundeuva*.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khan, R.; Islam, B.; Akram, M.; Shakil, S.; Ahmad, A.; Ali, M. S.; 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* **2009**, 14, 586-597.
2. Pereira, R.C.; Oliveira, M.T.R.; Lemos, G.C.S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes – RJ. *Revista Brasileira de farmacognosia* **2004**, 14, 37 – 40.
3. Souza, L.K.H.; Oliveira, C.M.A.; Ferri, P.H.; Santos, S.C.; Júnior, J.G.O.; Miranda, A.T.B.; Lião, L.M.; Silva, M.R.R. Antifungal Properties of Brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology* **2002**, 33, 247 – 249.
4. Almeida, A.C.; Sobrinho, E.M.; Pinho, L.; Souza, P.N.S.; Martins, E.R.; Duarte, E.R.; Santos, H.O.; Brandi, I.V.; Cangussu, A.S.; Costa, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alegrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciências Rural* **2010**, 40, 200 – 203.
5. Lorenzi, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 3ª ed.; São Paulo, Brasil, 1992; pp. 50 – 60.
6. Menezes, A.M.S.; Rao, V.S. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **1988**, 21, 531 – 533.
7. Viana, G.S.B.; Bandeira, M.A.M.; Moura, L.C.; Souza, M.V.P.F.; Matos, F.J.A.; Ribeiro, R.A. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. *Phytotherapy Research* **1997**, 11, 118 – 122.
8. Rodrigues, L.V.; Ferreira, F.V.; Regadas, F.S.P.; Matos, D.; Viana, G.S.B. Morphologic and morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira-do-Sertão). *Phytotherapy Research* **2002**, 16, 267 – 272.
9. Monteiro, M.V.; Melo, A.K.L.; Bertini, L.M.; Morais, S.M.; Nunes, P.D.C. Tropical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. *Journal Ethnopharmacol* **2006**, 111, 378 – 382.

10. Alves, I.A.; Camargo, F.P.; Goulart, L.S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida sp.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **2010**, 43, 575 – 579.
11. Ziarrusta, G.B. Vulvovaginitis candidiásica. Revista Iberoamericana de Micologia **2002**, 19, 22 – 24.
12. Corsello, S.; Spinillo, A.; Osnengo, G.; Penna, C.; Guaschino, S.; Beltrame, A.; Blasi, N.; Festa, A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. European Journal of Obstetrics, gynecology and reproductive biology **2003**, 110, 66 – 72.
13. Álvares, C.A.; Svidzinski, T.I.E.; Consolaro, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial **2007**, 43, 319 – 327.
14. Diba, K.; Namaki, A.; Ayatollahi, H.; Hanifian, H. Rapid identification of drug resistant *Candida* species causing recurrent vulvovaginal candidiasis. Journal of Medical Mycology **2012**, 53, 193 – 198.
15. Trabulsi, L.R.A.F. Microbiologia, 4ª ed.; São Paulo, SP, 2008; pp. 525 – 527.
16. Cruz, M.C.; Goldstein, A.L.; Blakenship, J.R.; Del Poeta, M.; Davis, D.; Cardenas, M.E.; Perfect, J.R.; McCusker, J.H.; Heitman, J. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. The Embo Journal **2002**, 24, 546 – 559.
17. Morschauer, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. Molecular and Cell Biology of Lipids **2002**, 1587, 240 – 246.
18. Zaitz, C.; Campbell, I.; Marques, S.A.; Ruiz, L.R.B.; Framil, V.M.S. Compêndio de Micologia Médica, 2ª ed.; Rio de Janeiro, Brasil, 2010; pp. 271 – 275.
19. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. Clinical Microbiology Reviews **2007**, 20, 133 – 163.
20. Prado, M.; Silva, M. B.; Laurenti, R.; Travassos, L.R.; Tabora, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **2009**, 104, 513 – 521.

21. Maschmeyer, G.; Haas, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2008**, 31, 193 – 197.
22. Sable, C.A.; Strohmaier, K.M.; Chodakewitz, J.A. Advances in antifungal therapy. *Annual Review of Medicine* **2008**, 59, 361 – 379.
23. Galván, B.; Mariscal, F. Epidemiología de la candidemia em UCI. *Revista Iberoamericano de Micología* **2006**, 23, 12 – 15.
24. Melado, E.; Cuenca-Estrella, M.; Rodriguez-Tudela, J.L. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2002**, 20, 523 – 530.
25. Venkatesan, P.; Perfect, J.R.; Myers, S. Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. *Dermatology and Therapy* **2005**, 18, 44 – 57.
26. Schaller, M.; Borelli, C.; Korting, H.C.; Hube, B. Hydrolytic enzymes as virulence factor of *Candida albicans*. *Mycoses* **2005**, 48, 365 – 377.
27. Naglik, J.; Albrecht, A.; Bader, O.; Hube, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **2004**, 6, 915 – 926.
28. Develoux, M.; Bretagne, S. Candidiasis and yeast infections. *EMC – Maladies Infectieuses* **2005**, 2, 119 – 139.
29. Gutiérrez, J.; Morales, P.; Gonzalez, M.A.; Quindós, G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *Journal of Basic Microbiology* **2002**, 42, 207 – 227.
30. Segal, E. *Candida*, still number one – what do we know and where are we going from there? *Mycoses* **2005**, 48, 3 – 11.
31. Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S.M.; Seifer, H.; Wenzel, R.P.; Edmond, M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective Nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* **2004**, 309 – 317.
32. Shinobu, C.S.; Ogatta, S.F.Y.; Bizerra, F.; Furlaneto, L.; Peralta, R.M.; Svidzinski, T.I.E.; Consolaro, M.E.L. Lack of association between genotypes

and virulence factors in *C.albicans* strains isolated from vaginal secretion. Brazilian Journal of Microbiology **2007**, 38, 467 – 471.

33. Sobel, J.D. Candidal vulvovaginitis. Clinical Obstetrics and Gynecology **1993**, 36, 153 – 162.
34. Watson, C.; Calabretto, H. Management of recurrent vulvovaginal candidiasis: Comprehensive review of conventional and non conventional methods of management of recurrent vulvovaginal candidiasis. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology **2007**, 47, 262 – 272.
35. Zimmermann, J.B.; Paiva, O.A.; Costa, A.C.S.S.; Sousa, A.M.G.V.; Chagas, A.R.; Lima, A.A.C. Validade do diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. Revista HU **2009**, 35, 11 – 18.
36. Nouraei, S.; Akbari, S.A.A.; Jorjani, M.; Majd, H.A.; Afrakhteh, M.; Ghafoorian, A.; Harandi, H.T. Comparison between fluconazole with oral protexin combination and fluconazole in the treatment of vulvovaginal candidiasis. International Scholaely Reserch Network **2012**, 01 – 10.
37. Foxman, B.; Barlow, R.; D'Arcy, H.; Gillespie, B.; Sobel, J.D. Candida vaginitis: self-reported incidence and associated costs. Sexually Transmitted Diseases **2000**, 27, 230 – 235.
38. Giraldo, P.C.; Ribeiro Filho, A.D.; Simões, J.A.; Gomes, F.A.M.; Jarbas, M. Vulvovaginites: aspectos habitualmente não considerados. Jornal Brasileiro de Ginecologia, **1997**, 107, 89 – 93.
39. Sobel, J.D. Vulvovaginal candidosis. Lancet **2007**, 369, 1961 – 1971.
40. Yan, Z.; Hua, H.; Xu, Y.; Samaranayake, L.P. Potent antifungal activity of pure compounds from traditional chinese medicine extracts against six oral *Candida* species and the synergy with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2012**, 10, 1 – 6.
41. Patel, D.A.; Gillespie, B.; Sobel, J.D.; Leaman, D.; Nyrjesy, P.; Weitz, M.V.; Foxman, B. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. American Journal of Obstetrics and Gynecology **2005**, 192, 981 – 982.
42. Kariman, N.; Shafayi, Z.; Afrakhteh, M.; Vlaje, N.; Ahmadi, M. Comparison of fluconazole and clotrimazole in the treatment of vulvovaginal *Candida*

- albicans*. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences **2002**, 6, 17 – 19.
43. Martinez, R.C.R.; Franceschini, S.A.; Patta, M.C. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR – 1 and *Lactobacillus reuteri* RC – 14. Letters in Applied Microbiology **2009**, 48, 269 – 274.
44. Carvalho, N.S.; Baracat, E.C.; Naud, P.S.V.; Giraldo, P.C.; Simões, J.A.; Duarte, G.; Linhares, I.M. Estudo multicêntrico comparativo entre fluconazol e itraconazol no tratamento da candidíase vulvovaginal. Revista Brasileira de Medicina **2002**, 59, 244 – 249.
45. Carrilo, M.A.J.; Giusiano, G.; Ezkurra, P.A.; Quindóz, G. Antifungal agentes: Mode of action in yeast cells. Revista Española de Quimioterapia **2006**, 19, 130 – 139.
46. Matta, D.A.; Almeida, L.P.; Machado, A.M.; Azevedo, A.C.; Kusano, E.J.U.; Travassos, N.F.; Salomão, R.; Colombo, A.L. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995 – 2003. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **2007**, 57, 399 – 404.
47. Cannon, R.D.; Lamping, E.; Holmes, A.R.; Niimi, K.; Baret, P.V.; Keniya, M.V.; Tanabe, K.; Niimi, M.; Goffeau, A.; Monk, B.C. Efflux-Mediated Antifungal drug resistance. Clinical Microbiology Reviews **2009**, 22, 291-321.
48. Barbedo, L.S.; Sgarbi, D.B.G. Candidíase. Jornal Brasileiro de Doenças sexualmente transmissíveis 2010, 22, 22-38.
49. Canuto, M.M.; Rodero, F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. The Lancet Infectious Diseases **2002**, 2, 550 – 563.
50. Heyder, C. D. T.; Silva, D. A. K. Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Revista Saúde e Ambiente **2004**, 5, 7 – 12.
51. Ferro, D. Fitoterapia – Conceitos químicos. 1ª ed.; São Paulo, Brasil, 2008; 01 – 03.
52. Franco, L.L. Doenças tratadas com plantas medicinais. 1ª ed.; São Paulo, Brasil, 2003; 01 – 04.

53. Fernandes, T.M.D. Plantas medicinais: memória e história da constituição de sua comunidade científica no Brasil. Tese de doutorado, USP, São Paulo, 2001.
54. Braga, C.M. Histórico da Utilização de Plantas Medicinais. Monografia, UEG, Goiás, 2011.
55. Ponnusamy, K.; Petchiammal, C.; Mohankumar, R.; Hopper, W. *In vitro* antifungal activity of indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R.Br. Journal of Ethnopharmacology **2010**, 132, 349 – 354.
56. Shu, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. Journal of Natural Products **1998**, 61, 1053 – 1071.
57. Embrapa cerrado, <http://www.cpac.embrapa.br/unidade/ocerrado/>, acessado em 21/06/2012.
58. Solórzano, A.; Pinto, J.R.R.; Felfile, J.M.; Hay, J.D.V. Perfil florístico e estrutural do componente lenhoso em seis áreas de cerrado ao longo do bioma Cerrado. Acta Botanica Brasilica **2012**, 2, 328 – 341.
59. Ferreira, M.N.; Freire, N.C. Community perceptions of four protected áreas in the Northern portion of the Cerrado hotspot, Brazil. Journal Cambridge **2009**, 36, 129 – 138.
60. Pereira, Z.V.; Gomes, C.F.; Lobtchenko, G.; Gomes, M.E.S.; Simões, P.D.A.; Saruwatari, R.P.S.; Rigo, V.F.; Cordeiro, W.P. Levantamento das plantas medicinais do Cerrado sensu stricto da fazenda Paraíso – Dourados, MS. Revista Brasileira de Biociências **2007**, 5, 249 – 251.
61. Durte, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Multi Ciência **2006**, 7, 01 – 16.
62. Moreira, A.C.P.; Lima, E.O; Wanderley, P.A.; Carmo, E.S.; Souza, E.L. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology **2010**, 41, 28 – 33.
63. Bezerra, N.A.; Felismino, D.C.; Chaves, T.P.; Alencar, L.C.B.; Dantas, I.C.; Sobrinha, L.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L. Revista de Biologia e Farmácia **2012**, 8, 40 – 48.
64. Silva, S.M.F.Q.; Pinheiro, S.M.B.; Queiroz, M.V.F.; Pranchevicius, M.C.; Castro, J.G.D.; Perim, M.C.; Carreiro, S.C. Atividade *in vitro* de extratos brutos

de duas espécies vegetais do Cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. *Ciência & Saúde Coletiva* **2012**, 17, 1649 – 1656.

65. Costa, T.R.; Fernandes, O.F.L.; Santos, S.C.; Oliveira, C.M.A.; Lião, L.M.; Ferri, P.H.; Paula, J.R.; Ferreira, H.D.; Sales, B.H.N.; Silva, M.R.R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 72, 111 – 117.
66. Bustamante, K.G.L.; Lima, A.D.F.; Soares, M.L.; Fiuza, T.S.; Tresvenzol, L.M.F.; Bara, M.T.F.; Pimenta, F.C.; Paula, J.R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2010**, 12, 341 – 345.
67. Kutchan, T.M. Ecological Arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology* **2001**, 125, 58 – 60.
68. Fumagali, E.; Gonçalves, R.A.C.; Machado, M.F.P.S.; Vidoti, G.J.; Oliveira, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em culturas de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, 18, 627 – 641.
69. Neto, G.G.; Morais, R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasileira* **2003**, 17, 561 – 584.
70. Spring, O.; Bienert, U.J. Should we be concerned about herbal remedies?. *Journal Plant Physiol* **1987**, 130, 441 – 443.
71. Neto, L.G.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* **2007**, 30, 374 – 381.
72. Khosravi, A.R.; Shokn, H.; Kemani, S.; Dakhili, M.; Mandani, M.; Parsa, S. Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal of Medical Mycology* **2011**, 21, 93 – 99.
73. Farias, E.M.F.G.; Ximenes, R.M.; Magalhães, L.P.M.; Chiappeta, A.A.; Sena, K.X.F.R.; Albuquerque, J.F.C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. *Journal of Herbal Medicine* **2012**, 2, 63 – 67.
74. Zago, J.A.A.; Ushimaru, P.I.; Barbosa, L.N.; Junior, A.F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e

Escherichia coli isoladas de casos clínicos humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia **2008**, 19, 828 – 833.

75. Albuquerque, R.J.M.; Leal, L.K.A.M.; Bandeira, M.A.; Viana, G.S.B.; Rodrigues, L.V. Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* are efficacious in guinea pig ovalbumin-induced allergic conjunctivitis. Brazilian Journal of Pharmacognosy **2011**, 21, 953 – 962.
76. Souza, S.M.C.; Aquino, L.C.M.; Milach, A.C.J.; Bandeira, M.A.M.; Nobre, M.E.P.; Viana, G.S.B. Antiinflammatory and antiulcer properties of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. Phytotherapy Research **2007**, 21, 220 – 225.
77. Silva, O.N.; Leite, D.S.; Bernardes, L.A.; Paiva, J.G.A. Morphology, anatomy and histochemistry of the leaves of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas **2011**, 10, 56 – 66.
78. Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Júnior, V.F.V.; Grynberg, N.F.; Echevarria, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova **2002**, 25, 429 – 438.
79. Filho, V.C.; Yunes, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova **1998**, 21, 99 – 105.
80. Arnous, A.; Makris, D.; Kefalas, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidante properties in selected aged regional wines from greece. Journal of Food Composition and Analysis **2002**, 15, 655 – 665.
81. Brasil, Ministério da Saúde RENISUS. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies Vegetais. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/renisus.pdf>. Acesso em: 15 de maio .de 2012.
82. Barros, J.D.; Filho, S.S.; Castro, V.; Torres, V.M.; Higinio, J.S.; Melo, A.F.M. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e determinação da CL₅₀ do extrato bruto seco das folhas da *Vitex agnus Castus* Linn. Revista Eletrônica de Farmácia **2010**, 7, 62 – 71.
83. Klaassen, C.D.; Watkins, J.B. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull. 2ª ed.; Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2012; 134 – 136.

84. Almeida, A.C.; Sobrinho, E.M.; Pinho, L.; Souza, P.N.S.; Martins, E.R.; Duarte, E.R.; Santos, H.O.; Brandi, I.V.; Cangussu, A.S.; Costa, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alegrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciências Rural, Santa Maria* **2010**, 40, 200 - 203.
85. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G. *Farmacognosia – Da planta ao medicamento*, 6^aed.; Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2001; 183 – 185.
86. Santos, F.V. Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado. Tese de doutorado, UNESP, Araraquara, 2006.
87. Borges, C.S.; Cuchiara, C.C.; Silva, S.D.A.; Bobrowski, V.L. Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores. *Tecnologia & Ciências Agropecuária* **2011**, 5, 15 – 20.
88. Bolognesi, C.; Bonatti, S.; Degan, P.; Gallerani, E.; Peluso, M.; Rabboni, R.; Roggieri, P.; Abbondandolo, A. Genotoxic activity of Glyphosate and its technical formulation roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 45, 1957 – 1962.
89. Bagatini, M.D.; Silva, A.C.F.; Tedesco, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, 17, 444 – 447.
90. Maia, G.N. *Caatinga – Árvores e arbustos e suas utilidades*, 2^a ed. São Paulo, 2004; 256 – 257.
91. Nobre – Júnior, H.V.; Oliveira, R.A.; Maia, F.D.; Nogueira, M.A.S.; Moraes, M.O.; Bandeira, M.A.M.; Andrade, G.M.; Viana, G.S.B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochemical Research* **2009**, 34, 1066 – 1075.
92. Gaiano, A.P.S.C.; Silva, A.M.; Moraes, M.A.; Alves, P.F.; Moraes, M.L.T.; Freitas, M.L.M.; Sebbenn, A.M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. *Conservation Genetics* **2010**, 11, 1631 – 1643.
93. Sá, R.A.; Gomes, F.S.; Napoleão, T.H.; Santos, N.D.L.; Melo, C.M.L.; Gusmão, N.B.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G.; Bieber, L.W. Antibacterial and

antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Sci Technol* **2009**, 43, 85-95.

94. Sousa, L.F.; Maurício, R.M.; Moreira, G.R.; Gonçalves, L.C.; Borges, I.; Pereira, L.G.R. Nutritional evaluation of “Braquiaraõ” grass in association with “Aroeira” trees in a silvopastoral system. *Agroforest System* **2010**, 79, 189 – 199.

95. Matos, F.J.A. *Plantas da medicina popular do nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas*, 1ª ed.; Fortaleza, Recife, 1999; 50 – 54.
96. Pacheco, M.V.; Matos, V.P.; Ferreira, R.L.C.; Feliciano, A.L.P.; Pinto, K.M.S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All (Anacardiaceae). *Revista Árvore* **2006**, 30, 359 – 367.

97. Pacheco, M.V.; Matos, V.P.; Ferreira, R.L.C.; Feliciano, A.L.P.; Pinto, K.M.S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All (Anacardiaceae). *Revista Árvore* **2006**, 30, 359 – 367.

98. Amaral, E.A.; Silva, R.M.G. Avaliação da toxicidade aguda de Angico (*Anadenanthera falcata*), Pau-Santo (*Kilmeyera coreacea*), Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e Cipó-de-São-João (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. *Perquirere* **2008**, 5, 01-16.

99. Machado, A.C.; Junior, E.D.; Filho, J.E.G.; Cintra, L.T.A.; Ruvière, D.B.; Zoccal, R.; Damante, C.A.; Junior, E.G.J. Evaluation of tissue reaction to Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) extracts: a histologic and edemogenic study. *Journal of Applied Oral Science* **2012**, 20, 414 – 418.

100. Mors, W.B.; Rixxini, C.T.; Pereira, N.A. *Medicinal plants of Brazil*, R.A. 1ª ed., Algonac, 2000; 20 - 22.

101. Souza, S.M.C.; Aquino, L.C.M.; Milach, A.C.J.; Bandeira, M.A.M.; Nobre, M.E.P.; Viana, G.S.B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. *Phytotherapy Research* **2011**, 21, 220 – 225.

102. Menezes, I.A.C.; Moreira, I.J.A.; Paula, J.W.A.; Blank, A.F.; Antonioli, A.R.; Quintans, L.J.; Santos, M.R.V. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, 62, 215-222.

103. Montanari, R.M.; Barbosa, L.C.A.; Demuner, A.J.; Silva, C.J.; Andrade, N.J.; Ismail, F.M.D.; Barbosa, M.C.A. Exposure to Anacardiaceae volatile oils

and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. *Molecules* **2012**, *17*, 9728-9740.

5.1 Artigo

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO*, CITOTOXICIDADE E PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS DE *Myracrodruon urundeuva* SOBRE *Candida spp.* ISOLADAS DE CANDIDIASE VULVOVAGINAL.

XXXXXX¹; XXXXXXX²; XXXXXXX³.

Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Grande Dourados.

Rodovia Dourados – Itaum Km12. 79800-000 Dourados MS

Resumo: O objetivo foi avaliar a eficácia do extrato etanólico de *Myracrodruon urundeuva* e suas frações sobre culturas de *Candida spp.* isoladas de infecções vulvovaginais, a citotoxicidade e toxicidade *in vivo* e *in vitro*. O extrato etanólico da casca e das folhas e suas frações foram testados em isolados de leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) utilizando a técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). O extrato etanólico e aquoso e sua fração de acetato de etila da casca apresentaram ação antifúngica e fungicida frente às leveduras *C. krusei* e *C. tropicalis* (64µg/mL e 96µg/mL) e sobre *C. albicans* (58µg/mL) isolada de candidíase vulvovaginal. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos extratos e a fração que inibiu o crescimento da grande maioria de leveduras no CIM sugeriram que estes compostos eram constituídos de flavonóides do tipo flavonol e chalconas, taninos e fenóis. Constatou-se toxicidade aguda dos extratos etanólicos da casca e potencial efeito tóxico e citotóxico em testes com *Allium cepa* dos extratos, porém não foi observado efeito mutagênico. Tendo como resultado a inibição do crescimento da maioria das leveduras testadas no CIM, sugerem-se mais estudos toxicológicos principalmente da casca de *M. urundeuva* com análises histológicas em outros órgãos, principalmente no sistema nervoso.

Palavras-chave: *Anacardiaceae*; Candidíase; Toxicidade e Mutagenicidade.

Abstract: The objective was to evaluate the efficacy of ethanol extract of *M. urundeuva* and its fractions on cultures of *Candida* spp. isolated from vulvovaginal infections, cytotoxicity and toxicity in vivo and in vitro. The extract of the bark and leaves and its fractions were tested in isolated *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*) using the technique of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). The aqueous and ethanol extract and its ethyl acetate fraction of the bark showed antifungal and fungicidal front of yeasts *C. krusei* and *C. tropicalis* (64µg/mL and 96µg/mL) and on *C. albicans* (58µg/mL) isolated from vulvovaginal candidiasis. Analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) and the fraction of extracts which inhibited the growth of the yeast on most MIC suggested that these compounds were of the type consisting of flavonoids and chalcones flavanols, tannins and phenolics. It was observed acute toxicity of ethanol extracts of bark and potential toxic effect and cytotoxic tests with extracts of *Allium cepa*, but not mutagenic effect was observed. Resulting in the inhibition of growth of most yeasts tested in the MIC, we suggest further toxicological studies mainly bark *M. urundeuva* with histological analysis in other organs, especially the nervous system.

Keywords: *Anacardiaceae*; candidiasis; Toxicity and mutagenicity.

1. Introdução

Candidíase vulvovaginal (CVV) é causada por uma levedura comensal da microbiota normal da mulher. Embora essa doença não traga risco de vida, alguns sintomas desencadeiam desconforto físico e psicológico causando problema relevante na saúde da mulher. Pesquisas demonstram que está aumentando substancialmente sua incidência nos últimos 20 anos [1]. Entre as várias espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é a mais frequente, seguida pela *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii* e *C. parapsilosis*, dentre outras [2]. Devido à resistência aos antifúngicos, o tratamento definitivo da CVV tem representado grande desafio para médicos e pesquisadores. Este aumento de resistência deve-se ao uso de terapias decorrentes, doses inadequadas ou ao aumento da automedicação, essas medidas inadequadas podem causar a seleção da resistência clínica. O desafio dos pesquisadores é encontrar novos fármacos que atuem diretamente nas leveduras que causam a CVV [3, 4]. Observou-se na região de Dourados – MS a utilização da casca de *M. urundeuva* em banhos de assento por algumas indígenas [Observação pessoal].

Myracrodruon urundeuva, Anacardiaceae, é conhecida popularmente como aroeira, aroeira-do-sertão ou urundeúva [5]; popularmente, decoctos de sua casca são utilizados como antisséptico, anti-inflamatório, antidiarreico, para doenças respiratórias, infecções urinárias e doenças ginecológicas e as folhas são indicadas para o tratamento de úlceras [6, 7, 8, 9, 10]. Cientificamente, podem ser citados

estudos relacionados com atividade anti-inflamatória da casca e no combate à conjuntivite alérgica [11], ação antimicrobiana, antibacteriana e na formação de biofilmes [12, 13, 14, 15].

O uso de princípios ativos com propriedades terapêuticas e questões relacionadas com a segurança do uso de fitoterápicos são relevantes para a saúde do consumidor e considerados importantes para o tratamento de algumas doenças, mas seu uso inadequado pode gerar possível intoxicação [16]. Com o aumento das pesquisas nas universidades e o consumo de produtos fitoterápicos, o governo brasileiro elaborou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (17).

A maioria das plantas medicinais não são submetidas a análises para verificar seu potencial toxicológico e mutagênico. Algumas contêm substâncias tóxicas com potencial de mutações cromossômicas (18), podendo ser avaliadas pelo teste que analisa as alterações mutagênicas e citotóxicas utilizando células de *Allium cepa*. A citotoxicidade, a mutagenicidade e a genotoxicidade podem ser avaliadas por meio de alterações no processo de divisão celular e pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos [19].

Na presente pesquisa, avaliou-se a eficácia do extrato etanólico, aquoso e suas frações de acetato de etila e clorofórmio de *M.urundeuva* sobre culturas de *Candida sp.* isoladas de infecções vulvovaginais e provenientes de cepas da ATCC, sua investigação química, sua toxicidade *in vivo* e *in vitro* e sua genotoxicidade.

2. Resultado e Discussão

2.1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Considera-se que se a atividade do extrato testado na CIM for inferior a 100µg/mL, sua atividade antifúngica será considerada boa, se a atividade antifúngica for de 100 a 500µg/mL é considerada mediana, a partir de 500 a 1000µg/mL a atividade antifúngica é considerada fraca; e mais de 1000µg/mL a ação do extrato é considerada inativa, esses critérios foram determinados por Gibbons [31] para analisar a ação de extratos frente a leveduras na CIM. Com base nesses critérios, o extrato etanólico da casca apresentou um bom efeito frente aos isolados de *C. albicans* (58µg/mL) e a ação mediana frente à fração acetato de etila (185µg/mL).

Os resultados dos ensaios antifúngicos dos extratos e suas frações da casca isoladas neste trabalho demonstraram atividades nos ensaios antifúngicos (Tabela 1). Os valores da CIM para o extrato etanólico da casca e sua fração acetato de etila de *M. urundeuva* foram sensíveis às cepas da ATCC, dentre elas a *C. krusei* e a *C. tropicalis* merece destaque por sua resistência a alguns antifúngicos existentes (64µg/mL e 96µg/mL, respectivamente).

Araujo *et al.* [8] realizaram o MIC do extrato etanólico da folha de *Leiothrix spiralis* e de seus compostos químicos isolados contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Esta planta inibiu o crescimento das leveduras de quase todos os extratos de e suas frações, as flavonas mostraram boa atividade frente a *C. krusei* (15.7µg/mL), *C. parapsilosis* (15.7µg/mL), *C. tropicalis* (31.25µg/mL) e *C. albicans* (62.15µg/mL). Os autores concluíram que *L. spiralis* demonstrou atividade antifúngica, corroborando para a análise dos resultados dos extratos etanólico, aquoso e a fração de acetato de etila de *M. urundeuva*, onde demonstraram atividade a quase todas as amostras que foram testados.

Alves *et al.* [8], analisaram o extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva*, *Malva sylvestris* e a *Psidium guajava* frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, espécies patogênicas nos casos de candidose bucal, principalmente relacionados à imunossupressão. Na avaliação antifúngica observou-se que o extrato de *M. urundeuva* apresentou atividade antifúngica sobre as cepas de *C. albicans* (8mg/mL), *C. tropicalis* (16mg/mL) e *C. krusei* (16mg/mL), comprovando sua atividade antifúngica e reforçando os resultados positivos obtidos nesse trabalho.

2.2. Análise dos extratos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector de arranjo de diodos (DAD).

Cromatografia líquida de alta eficiência, juntamente com um detector de fotodiodo com ferramenta poderosa e econômica para análise de polifenóis, fornecendo uma vasta informação sobre as estruturas dos compostos fenólicos em extratos de plantas. Os espectros de absorção UV vis de compostos fenólicos permitem a identificação de picos cromatográficos e sua classificação [32].

No presente estudo o HPLC foi utilizado para identificar a presença dos principais metabólitos secundários no extrato etanólico, aquoso e sua fração acetato de etila de *M. urundeuva*. A partir dos resultados, constatou-se que os extratos etanólico e aquoso e sua fração apresentaram padrões de flavonoides, taninos e fenóis (Tabela 2). Monteiro *et al.* [6], analisaram o extrato etanólico da casca e da folha de *M. urundeuva* através do método de Folin-Ciocalteu (para fenóis totais) e pelo método da precipitação de caseína (para taninos totais). Analisando os resultados, encontraram uma variação intraespecificamente de taninos em relação às cascas e folhas (7,04 e 10,38%). Não houve diferença entre as quantidades de fenóis totais (7,49 a 12,19%), reforçando, assim o resultado obtido neste estudo.

Sá *et al.* [13] analisaram através da cromatografia de camada delgada os possíveis componentes químicos do extrato etanólico do cerne de *M. urundeuva* e comprovaram a presença de flavonoides, ácido gálico, luteolina, taninos condensados, taninos hidrolisáveis e leucoantocianidinas com menor intensidade, flavonoides, taninos, alcaloides, polifenóis, cumarinas, derivados do ácido

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos de *M. urundeuva* frente a isolados de *Candida* de CVV e cepas da AmericanType Culture Collection (ATCC).

Extratos	E.E.C (µg/mL)		E.A.E.C (µg/mL)		E.C.C (µg/mL)		E.A.C (µg/mL)		E.E.F (µg/mL)		E.A.E.F (µg/mL)		E.C.F (µg/mL)		E.A.F (µg/mL)		F (µg/mL)	
	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC	MIC 100	MFC
<i>C.albicans ATCC</i>	2048	2048	+	+	+	+	2048	2048	+	+	+	+	+	+	+	+	4	4
<i>C.tropicalis ATCC</i>	96	128	384	384	+	+	128	128	+	+	+	+	+	+	+	+	8	4
<i>C.glabrata ATCC</i>	+	+	768	2048	+	+	+	+	+	+	1024	2048	+	+	+	+	32	32
<i>C.krusei ATCC</i>	64	1024	96	768	+	+	640	1024	64	1024	2048	2048	+	+	8	+	16	32
<i>C.parapsilosis</i>	+	+	256	1536	+	+	+	+	+	+	2048	+	+	+	+	+	8	32
<i>C.albicans 01</i>	32	32	64	64	+	+	256	512	+	+	+	+	+	+	+	+	4	64
<i>C.albicans 02</i>	64	16	64	128	+	+	512	1024	+	+	+	+	+	+	+	+	4	4
<i>C.albicans 03</i>	64	32	256	256	+	+	512	1024	+	+	+	+	+	+	+	+	4	64
<i>C.albicans 04</i>	32	64	64	512	+	+	256	512	+	+	+	+	+	+	+	+	4	4
<i>C.albicans 05</i>	16	32	16	64	+	+	256	1024	+	+	+	+	+	+	+	+	4	8
<i>C.albicans 06</i>	4	8	8	8	+	+	512	512	+	+	+	+	+	+	+	+	4	64
<i>C.albicans 07</i>	+	512	16	128	+	+	512	256	+	+	+	+	+	+	+	+	4	64
<i>C.albicans 08</i>	+	256	+	512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	8
<i>C.albicans 09</i>	+	256	+	512	+	+	512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4	64
<i>C.albicans 10</i>	+	256	+	256	+	+	1024	1024	+	+	+	+	+	+	+	+	16	64
<i>C.glabrata 01</i>	+	+	+	512	+	+	+	+	+	+	1024	+	+	+	+	+	16	64
<i>C.glabrata 02</i>	+	+	+	1024	+	+	+	+	+	+	1024	+	+	+	+	+	16	32
<i>C.glabrata 03</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1024	+	+	+	+	+	16	32
<i>C.glabrata 04</i>	+	+	+	512	+	+	+	+	+	+	1024	+	+	+	+	+	4	64
<i>C.glabrata 05</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1024	+	+	+	+	+	4	16

MIC100, Concentração do extrato que inibe 100% do controle do crescimento. *Candida albicans* - ATCC® 90028; *Candida tropicalis* - ATCC® 750; *Candida glabrata* - ATCC® 2001; *Candida krusei* ATCC® 6258; *Candida parapsilosis* - ATCC® 22019; E.E.C – Extrato Etanólico da casca; E.A.E.C – Extrato Acetato de Etila da Casca; E.C.C – Extrato de Clorofórmio da Casca; E.A.C – Extrato Aquoso da Casca; E.E.F – Extrato Etanólico da Folha; E.A.E.F – Extrato de Acetato de Etila da Folha; E.C.F – Extrato de Clorofórmio da Folha; E.A.F – Extrato Aquoso da Folha; F – Fluconazol, + - crescimento positivo da levedura.

cinamico, saponinas, esteroides, iridoides e terpenos. Com isso pode-se sugerir que a casca de *M. urundeuva*, devido à presença de taninos e flavonoides pode contribuir para sua ação antifúngica, corroborando com o resultado desta pesquisa.

Tabela 2. Concentração de metabólitos secundários no extrato etanólico e aquoso e sua fração acetato de etila da casca de *M. urundeuva* pela técnica de HPLC.

	Extrato etanólico	Fração acetato de etila	Extrato hidroalcoólico
Alcaloide	-	-	-
Ácidos orgânico	++	++	++
Fenóis e Taninos	+++	+++	+++
Flavonoides	+++	+++	+++
Esteroides e triterpenos	++	++	-

+++ presença significativa, ++ presença notável, + presença leve, - ausência.

Os cromatogramas mostram que a fração do extrato etanólico e a fração acetato de etila são muito semelhantes. A fração acetato de etila apresentou 7 picos (7.44; 9.73; 10.37; 10.82; 11.49; 12.00; 12.48), como também a fração do extrato etanólico. Na fração hidroalcoólica constataram três substâncias que também estão presentes no extrato etanólico e na fração acetato de etila (picos 5, 6 e 7).

Considerando o espectro de UV, a substância 7 (pico 7) é de um flavonoide (flavonol). Os flavonoides são compostos comuns na natureza, atuando na atração de polinizadores e como co-pigmentos das antocianidinas, apresentam várias atividades biológicas, destacando-se as anti-inflamatórias, antibióticas, antitumorais e antioxidantes [33]. O espectro de UV do restante das substâncias (picos 1-6) são condizentes com flavonóides do tipo chalconas [34]. O isolamento de chalconas foi relatado em algumas pesquisas [35,36,11,37]. Para a *M. urundeuva* também há relatos de taninos [38, 9].

A ação antifúngica está relacionada à composição química da planta que vem sendo investigada e pode ser uma ação secundária de alguns metabólitos; um exemplo disso é o flavonoide. Bhalodia *et al.* analisaram o extrato hidroalcoólico da folha de *Cassia fistula* L. contra leveduras do gênero *Candida sp.*, e atribuiu-se o efeito antifúngico à presença de flavonoides, taninos, saponinas e glicosídeos.

2.4. Toxicidade e citotoxicidade em *Allium cepa*

O teste de *Allium cepa* é importante uma vez que é um excelente modelo *in vitro*, que consiste em uma pré-análise toxicológica e genotoxicológica, onde as raízes crescem em contato direto com a

substância a ser analisada, permitindo uma análise de possíveis danos no DNA [39]. Não ocorreu o desenvolvimento das raízes expostas em todas as concentrações (0,2 mg/mL; 0,3 mg/mL e 0,5 mg/ml) do extrato aquoso da casca e nas concentrações 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL do extrato etanólico da casca (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito dos extratos etanólico e aquoso de *M. urundeuva* no número de raízes de *Allium cepa* em diferentes concentrações (mg/mL).

Extrato	Formol*	Água**	0,2	0,3	0,5	I.S.***
Etanólico da casca	0	26	8	0	0	0,0118
Aquoso da casca	0	10	0	0	0	0
Etanólico da folha	0	17	8	0	0	0,0262
Aquosoda Folha	0	17	8	0	0	0,036

Quantidades de raízes que cresceram em presença dos extratos analisados.*Controle positivo; **Controle negativo; ***Índice de significância utilizando o teste de Mann-Whitney (significativo < 0,05); controle positivo com formol e controle negativo com água.

Na toxicidade *in vitro* da folha, o desenvolvimento das raízes foi completamente inibido nas concentrações de 0,3 mg/mL e 0,5 mg/mL dos extratos aquoso e etanólico das folhas (Tabela 3). Nas três concentrações utilizadas, observou-se o crescimento radicular limitado, implicando toxicidade. Akimboro *et al.* [40] analisaram a toxicidade *in vitro* de *Azadirachta indica*, *Morinda lucida*, *Cymbopogon citratus*, *Mangifera indica* e *Carica papaya*, nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50%. A inibição do crescimento da raiz foi dependente das concentrações testadas e estatisticamente significativa sobre o crescimento das radículas de *Allium cepa*, concluindo a toxicidade *in vitro* das espécies testadas. Esses resultados ilustram a importância do teste primário de toxicidade e corrobora para se analisar o resultado obtido neste trabalho.

Todos os extratos de *M. urundeuva* apresentaram resultados genotóxicos e mutagênicos, com diminuição das células em divisão e do índice mitótico (Tabela 4), no ser humano a ação genotóxica e mutagênica pode desencadear algum tipo de câncer ou deformação cromossômica. Não foi constatada nenhuma alteração cromossômica e ação genotóxica do extrato aquoso da folha e não foram realizadas as análises da mutagenicidade do extrato etanólico da folha devido à formação de tumores.

O índice mitótico é usado como um indicador de proliferação de células biomarcadoras, que mede a proporção de células na fase mitótica do ciclo celular. A diminuição do índice mitótico das células meristemáticas de *Allium cepa* pode ser interpretada como morte celular [27]. Pelos resultados de

citotoxicidade de *M. urundeuva* observou-se que houve a diminuição das células em divisão e do índice mitótico em todos os extratos.

Akintonwa *et al.* [41] investigaram o potencial mutagênico das principais plantas da Nigéria, e constataram que *Azadirachata indica* (10 mg/mL) e *Xylopiya aethiopica* (5 e 10 mg/mL) inibiram o crescimento das raízes de *Allium cepa*; nas demais plantas houve uma redução na concentração do índice mitótico. Os autores sugere que os extratos testados possuem efeito inibitório sobre a divisão celular e no comportamento cromossomal. Confrontando aos nossos resultados, os extratos etanólico e aquoso da casca e da folha *M. urundeuva* inibiram o índice mitótico das raízes de *Allium cepa*, indicando assim que os extratos.

Tabela 4. Efeito citotóxico do extrato etanólico e aquoso de *M. urundeuva* em células de *Allium cepa*.

Extratos (mg/mL)		C.M.	I.S*	I.M.	I.S*
Etanólico da Casca	C.P	27.2	---	2.54	---
	C.N	58.8	---	5.56	---
	0,2	7.6	0.009	0.74	0.009
	0,3	7.8	0.009	0.75	0.009
	0,5	2.9	0.009	0.27	0.009
Aquoso da Casca	C.P	17	---	1.65	---
	C.N	47.8	---	4.70	---
	0,2	0.6	0.009	0.05	0.009
	0,3	2.4	0.009	0.23	0.009
	0,5	5.8	0.036	0.50	0.009
Aquoso da Folha	C.P	56.8	---	2.76	---
	C.N	28.2	---	5.45	---
	0,2	5.2	0.009	0.55	0.009
	0,3	6.4	0.009	0.62	0.009
	0,5	12.6	0.009	1.23	0.009
Fluconazol	C.P	47.6	---	2.23	---
	C.N	22.8	---	4.65	---
	0,2	1.8	0.009	0.17	0.009
	0,3	3.4	0.009	0.33	0.009
	0,5	2.2	0.009	0.21	0.009

Concentração dos extratos em mg; C.P. – controle positivo; C.N. – controle negativo; C.M. – número de células em mitose; I.M. – índice mitótico; I.S*. – índice de significância utilizando o teste de Mann-Whitney (significativo a < 0,05).

2.5. Toxicidade aguda

A mortalidade das cobaias é um sinal claro de toxicidade *in vivo*. Entretanto, outras variáveis podem ser observadas, dentre elas, a avaliação da perda de massa corporal durante o tratamento e a

presença de sinais clínicos de toxicidade, como diarreia, piloereção, variações no comportamento e sangramento [42].

Após a administração do extrato etanólico da casca e da folha de *M. urundeuva*, as ratas de ambos os grupos apresentaram letargia, aumento da frequência respiratória e ausência total de movimentos; após 15 minutos as ratas retornaram lentamente os movimentos, mas permaneceram com a frequência respiratória alta.

No primeiro dia após a administração dos extratos, duas ratas (uma do grupo do extrato etanólico da folha e uma do grupo do extrato etanólico da casca) apresentaram sangramento nasal e dificuldade na respiração, sendo que no segundo dia estas morreram. Realizando exame macroscopicamente nessas duas ratas, observou-se o abdômen inchado e ao fazer a ressecção, seu intestino delgado estava com a coloração amarelada e com formação de bolhas.

Após a administração do extrato aquoso da casca e da folha foi observado apenas uma reação de letargia e dificuldade respiratória em alguns animais. Foi observado também que o grupo que recebeu o extrato aquoso da casca de *M. urundeuva* apresentou diminuição significativa do peso corporal em relação ao grupo controle. Já, em relação ao peso dos órgãos, os animais tratados tanto com o extrato aquoso da folha quanto da casca de *M. urundeuva* apresentaram diminuição significativa do peso relativo do rim.

Considerando o que há na literatura sobre a toxicidade de plantas do cerrado, Ustulin *et al.* relataram possível toxicidade por *M. urundeuva* logo após levantamento bibliográfico e pesquisa exploratória qualitativa. Almeida *et al.* avaliaram a toxicidade de extratos etanólicos das folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), aroeira (*M. urundeuva*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e do farelo da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*), por meio da determinação da dose letal 50% (DL₅₀), utilizando a via intraperitoneal. Demonstraram que a DL₅₀ do extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* foi igual a 0,31 mg mL⁻¹, indicando assim toxicidade aguda na via intraperitoneal.

Na avaliação histopatológica do fígado, pulmão e dos rins não foi evidenciada nenhuma alteração histológica desses órgãos. Desta forma outros estudos de toxicidade *in vivo* de *M. urundeuva* devem ser realizados para uma melhor identificação da sua toxicidade subaguda dessa planta.

3. Seção Experimental.

3.1. Material Vegetal

O trabalho foi realizado nos laboratórios de microbiologia, toxicologia e de plantas medicinais da UFGD e no laboratório de química da UEMS.

As cascas e as folhas da *M. urundeuva* foram coletadas na área da Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados – MS – Brasil, coordenadas S 22°; 14'; 20". Exsiccatas da espécie foram identificadas pela professora Dr. Zefa Valdivina Pereira e depositadas no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados sob número de registro 534.

3.2. Obtenção do extrato etanólico e suas frações da casca e da folha de *M. urundeuva*.

As folhas e a casca de *M. urundeuva* foram secas e moídas em moinho de facas. Exatamente 300 g do material vegetal foram macerados com 600 mL de etanol à temperatura ambiente durante 48 horas; o processo foi repetido duas vezes, concentrados em evaporador rotativo a 35°C e liofilizados em liofilizador E-C MicroModulyo acoplado a bomba de vácuo valuPump VLP80 Savant, obtendo-se 10 g do extrato bruto [20] para fazer a partição líquido – líquido, foram utilizados 6 g do extrato etanólico com solventes de polaridade crescente - acetato de etila e clorofórmio [21] resultando na fração de acetato de etila e de clorofórmio; ao final da partição, resultou a fração aquosa, onde formou-se o extrato aquoso. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e mantidas sob refrigeração até seu uso.

3.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

A concentração inibitória mínima dos extratos etanólico da casca e da folha e as frações de acetato de etila e clorofórmio foram determinadas por meio de técnicas de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) [22]. Foram testados dez isolados clínicos de *Candida albicans* e cinco de *C. glabrata*, proveniente de candidíase vulvovaginal que fazem parte da micoteca da UFGD e cepas do ATCC (American Type Culture Collection) *Candida albicans* (ATCC® 90028), *C. krusei* (ATCC® 6258), *C. tropicalis* (ATCC® 750), *C. glabrata* (ATCC® 2001) e *C. parapsilosis* (ATCC® 22019). Como controle positivo, colocou-se o meio e a levedura e como controle negativo somente o meio.

O extrato de *M. urundeuva* foi resuspenso em 1 mL de DMSO, vertido em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e vertido na placa de microdiluição com 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark®), com concentração inicial de 2048µg/mL e concentração final de 4µg/mL.

Logo após, foi adicionado o inóculo com a concentração ajustada de 108 UFC/mL na escala 0,5 de McFarland. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C por 48 horas. A CIM foi considerada como a mais baixa concentração dos extratos no qual a levedura não mostrou crescimento visível após incubação. A turvação dos poços da placa de microdiluição foi interpretada como crescimento visível da levedura [23]. O teste foi realizado em duplicata.

Após analisar os resultados no CIM, verificou-se a concentração fungicida mínima (CFM), que consiste em remover de cada poço da placa de microdiluição o meio mais o inóculo, que não obteve crescimento visível e perfurar com palitos esterilizados em uma placa de petri contendo agar Sabouraud Dextrose (Difco). As placas foram incubadas durante 24 horas a 35°C. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a mais baixa concentração em que ocorreu o crescimento de UFC sobre o ágar [24].

3.5. Análise dos extratos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise com detector de arranjos de diodos (DAD).

Os extratos etanólico e aquoso e sua fração acetato de etila da casca, que apresentaram boa ação no MIC foram analisados no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) modelo VARIAN 210, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm, Coluna Phenomenex C-18 (diâmetro 4,6 mm x || 250 mm, diâmetro da partícula 10 µm) e pré-coluna (25 mm x 3 mm) de mesma fase da coluna. A eluição foi realizada em sistema gradiente: MeOH/H₂O de 5 a 100% metanol, levando 15 minutos para atingir 100% de metanol, 100% de metanol por 5 minutos e 5 minutos para voltar à condição inicial. O tempo de análise foi de 25 minutos e a vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado de 5 µL. As amostras foram filtradas com um micro-filtro de 0,45 µm [25].

3.6. Toxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade em Allium cepa

Dez bulbos de *Allium cepa* de tamanho pequeno, uniforme, da mesma origem, não brotados e saudáveis foram utilizados para este teste, os quais foram cultivados em água potável à temperatura ambiente por dois a três dias. Quando as raízes alcançaram 2 a 4 cm de comprimento, foram tratadas com concentrações de 0,5; 0,3 e 0,2 g/mL do extrato etanólico e aquoso da casca e da folha de *M. urundeuva*. Como controle positivo foi utilizado formol 3% e como controle negativo, água.

Após 48 horas, os ápices das raízes de cada bulbo de *A. cepa* foram cortadas e fixadas com fixador Carnoy (3:1 de álcool e ácido acético) de 6 a 18 horas. Após esse período os bulbos foram armazenados e refrigerados até o momento da análise.

Para a realização das análises, os bulbos foram submetidos à hidrólise ácida com HCL 1N a 60°C por, aproximadamente, 20 minutos, seguido de lavagem com água destilada. A coloração foi realizada

com Reativo de Schiff, por 2 horas, em local escuro. Duas pontas de cada bulbo foram esmagadas em cada lâmina e tampado cuidadosamente com lamínula, reduzindo a formação de bolhas [26].

No microscópio óptico foram analisadas cinco lâminas por tratamento e contadas 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células por tratamento. Em cada tratamento foram observados os índices mitóticos e as possíveis alterações cromossômicas. Os resultados de cada concentração foram avaliados e comparados com o controle negativo [27].

Para o ensaio de toxicidade *in vitro*, foram usados dez bulbos de *Allium cepa*, colocados em frascos com as concentrações 0,2; 0,3 e 0,5 g/mL do extrato etanólico e aquoso da casca e da folha de *M. urundeuva*, o controle negativo foi a água e o controle positivo, de formol 3%. Mergulhou-se cada bulbo nas concentrações dos extratos etanólico e aquoso e foram mantidos por 72 horas. Após esse período de exposição foram contadas e medidas as raízes de cada bulbo de *Allium cepa* (28).

3.7. Teste de toxicidade

3.7.1. Teste de toxicidade aguda

Foram utilizadas 30 ratas *Wistar* adultas (65 dias de idade, pesando aproximadamente 250g, n=25), provenientes do Biotério da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (12 horas de claro/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C), recebendo água e ração comercial à vontade. O teste de toxicidade aguda foi realizado utilizando protocolo da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), Guideline 425 (29) e as diretrizes da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFGD aprovou o procedimento experimental (protocolo nº 003/2012).

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n=5 animais/grupo) os quais foram tratados com 0 e 2000 mg/kg de peso corporal de extrato aquoso e etanólico da casca e da folha de *M. urundeuva* [43]. Os animais permaneceram em jejum de 12 h antes da administração dos extratos e os tratamentos foram realizados em dose única por via oral (gavage), e foram observados, nas primeiras horas e a cada 24 h durante 14 dias. Foram analisados parâmetros comportamentais, como irritabilidade, contorção, reflexo de endireitamento, tremores, convulsões, piloereção, respiração e morte. Também verificou-se o peso corporal e a quantidade de água e ração consumida pelo grupo durante os 14 dias de avaliação. No 15º todos os animais dos grupos experimentais foram pesados e anestesiados com ketamina (25 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos a eutanásia.

3.7.2. Análise Histológica

Todos os animais foram submetidos à necropsia no fim do experimento para analisar as características macroscópicas do fígado, pulmão e rim. Os órgãos foram retirados cuidadosamente e pesados individualmente e posteriormente fixados em formalina 10% tamponada, seccionados e corados com hematoxilina-eosina por método de rotina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz [30].

3.8. Análise estatística

Para a análise dos resultados obtidos entre os grupos experimentais foram utilizados os testes estatísticos de análise de variância – ANOVA, com teste “a posteriori” de Tukey-Kramer para analisar o teste de toxicidade aguda e o teste de Mann-Whitney para o teste de toxicidade *in vitro* e genotoxicidade. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.0. Conclusão

Baseado em nossos resultados podemos concluir que *Myracrodruon urundeuva* apresentou boa atividade frente a leveduras do gênero *Candida*, principalmente *C. krusei* e *C. tropicalis* e ação moderada sobre *C. albicans*. A análise química dos extratos confirmaram a presença de fenóis, taninos e flavonoides do tipo chalconas e flavonol. Apresentaram efeito tóxico e citotóxico sobre as células de *Allium cepa* os extratos etanólico e aquoso e demonstraram toxicidade aguda em ratos *Wistas*, mas não foi observado nenhuma alteração histológica. O uso observado pelas índias foi comprovado cientificamente, seu uso externo é confiável, mas seu uso interno é contraindicado, pois foi encontrado um alto grau de toxicidade. Considerando um bom resultado antifúngico, sugerimos mais estudos toxicológicos para determinar a toxicidade aguda dos extratos da casca e da folha com análises histológicas em outros órgãos, especialmente no sistema nervoso.

5.0. Bibliografia

1. Dias, L.B.; Melhem, M.S.C.; Szeszs, M.W.; Filho, J.M.; Hahn, R.C. Vulvovaginal candidiasis in Mato Grosso, Brazil: pregnancy status, causative species and drugs tests. *Brazilian Journal Microbiology* **2011**, 42, 1300-1307.
2. Álvares, C.A.; Svidzinski, T.I.E.; Consolaro, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **2007**, 5, 319 – 327.

3. Alves, I.A.; Camargo, F.P.; Goulart, L.S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2010**, 43, 575-579.
4. Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. *Cerrado: Espécies Vegetais Úteis, Planaltina:Embrapa*, 1998.
5. Lorenzi, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 3rd ed.; Publicação: São Paulo, Brasil, 1992; pp. 50 – 60.
6. Monteiro, J.M.; Neto, E.M.L.; Araújo, E.D.; Amorim, E.L.; Albuquerque, U.P. Bark regeneration and tannin content in *Myracrodruon urundeuva* Allemão after simulation of extractive damages-implications to management. *Environ Monit Asses* **2010**, 10, 1770-1773.
7. Monteiro, M.V.; Leite, A.K.M.; Bertini, L.M.; Morais, S.M.; Nunes, P.D.C. Tropical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. *Journal Ethnopharmacol.* **2006**, 111, 378 – 382.
8. Araújo, T.S.S.; Alencar, N.L.; Amorim, E.L.C.; Albuquerque, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal Ethnopharmacol* **2008**, 120, 72-80.
9. Souza, S.M.C.; Aquino, L.C.M.; Milach, A.C.Jr.; Bandeira, M.A.M.; Nobre, M.E.P.; Viana, G.S.B. Anti-inflammatory and antiulcer properties of tannin from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. *Phytotherapy Research* **2007**, 21, 220-225.
10. Albuquerque, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **2006**, 30, 1-10.
11. Albuquerque, R.J.M.; Leal, L.K.A.M.; Bandeira, M.A.; Viana, G.S.B.; Rodrigues, L.V. Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* are efficacious in guinea pig ovalbumin-induced allergic conjunctivitis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2011**, 21, 953 – 962.
12. Alves, P.M.; Queiroz, L.M.G.; Pereira, J.V.; Pereira, M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2009**, 42, 222-224.
13. Sá, R.A.; Argolo, A.C.C.; Napoleão, T.H.; Gomes, F.S.; Santos, N.D.L.; Melo, C.M.L.; Albuquerque, A.C.; Xavier, H.S.; Coelho, L.C.B.B.; Bieber, L.W.; Paiva, P.M.G. Antioxidant, fusarium growth inhibition and *Nasutitermes coniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2009**, 63, 470 – 477.

14. Montanari, R.M.; Barbosa, L.C.A.; Demuner, A.J.; Silva, C.J.; Andrade, N.J.; Ismail, F.M.D.; Barbosa, M.C.A. Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. *Molecules* **2012**, *17*, 9728-9740.
15. Menezes, I.A.C.; Moreira, I.J.A.; Paula, J.W.A.; Blank, A.F.; Antonioli, A.R.; Quintans, L.J.; Santos, M.R.V. Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62*, 215-222.
16. Queiroz, C.R.A.A.; Morais, S.A.L.; Nascimento, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Sociedade de Investigações Florestais* **2002**, *4*, 485-492.
17. Brasil, M.D. Decreto n. 5.813. In: Saúde, M.D. (Ed). Diário Oficial. Brasília; 2006.
18. Bagatini, M.D.; Silva, A.C.F.; Tedesco, S.B. Uso do Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, *17*, 444-447.
19. Borges, C.S.; Cuchiara, C.C.; Silva, S.D.A.; Bobrowski, V.L. Efeitos citotóxicos e alelopáticos de extratos aquosos de *Ricinus communis* utilizando diferentes bioindicadores. *Tecnologia & Ciências Agropecuária* **2011**, *5*, 15 – 20.
20. Ayres, M.C.C.; Brandão, M.S.; Júnior, G.M.V.; Menor, J.C.A.S.; Silva, H.B.; Soares, M.J.S.; Chaves, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 90 – 97.
21. Mahlo, S.M.; McGaw, L.J.; Eloff, J.N. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection* **2010**, *29*, 1529-1533.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3rd ed.; Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
23. Panghal, M.; Kaushal, V.; Yadav, J. In vitro antimicrobial activity of ten medical plants against clinical isolates of oral cancer cases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **2011**, *10*, 21-31.
24. Bagiu, R.V.; Vlaicu, B.; Butnariu, M. Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, *13*, 1426-1436.
25. César, I.C.; Braga, F.C.; Vianna, C.D.S.; Nunan, E.A.; Pianetti, G.A.; Condessa, F.A.; Barbosa, T.A.F.; Moreira, L.M.C. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *Journal of Chromatography B* **2006**, *836*, 74 – 78.

26. Grant, W.F. Chromosome aberrations assays in allium report of the USEPA gene tox program. *Mutation Research* **1982**, *99*, 273 – 291.
27. Ping, K.Y.; Darah, I.; Yusuf, U.K.; Yeng, C.; Sasidharan, S. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules* **2012**, *17*, 7782-7791.
28. Fiskesjo, G. Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* **1985**, *102*, 99 – 112.
29. OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development In: Chemicals, O.G.F.T.T.O. Ed. Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP) Paris, 2008, 27.
30. Mariz, S.R.; Araújo, M.S.T.; Cerqueira, G.S.; Araújo, W.C.; Duarte, J.C.; Diniz, M.F.F.M.; Medeiros, I.A. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 213-216.
31. Gibbons, S. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica* **2008**, *74*, 594 – 602.
32. Yan, Z.; Hua, H.; Xu, Y.; Samaranayake, L.P. Potent antifungal activity of pure compounds from traditional chinese medicine extracts against six oral *Candida* species and the synergy with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, *10*, 1– 6.
33. Dourado, R.S.; Ladeira, A.M. Identificação de flavonoides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **2008**, *31*, 611-620.
34. Paula, A.F. Estudo da foto dimerização de chalconas fluoradas no estado sólido cristalino. Tese de mestrado, Instituto de ciências exatas do programa de pós graduação em química orgânica, Rio de Janeiro, 2007.
35. Mendonça, A.R.J.; Leal, L.K.A.M.; Bandeira, M.A.; Viana, G.S.B.; Rodrigues, L.V. Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* are efficacious in guinea pig ovalbumininduced allergic conjunctivitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 953-962.
36. Nobre – Júnior, H.V.; Oliveira, R.A.; Maia, F.D.; Nogueira, M.A.S.; Moraes, M.O.; Bandeira, M.A.M.; Andrade, G.M.; Viana, G.S.B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochemical Research* **2009**, *34*, 1066–1075.
37. Bandeira, M.A.M.; Matos, J.A.F.; Braz-Filho, R. New chalconoid dimers from *Myracrodruon urundeuva*. *Natural Products Letters* **1994**, *4*, 113-120.

38. Viana, G.S.B.; Bandeira, M.A.M.; Matos, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 189-195.
39. Laghinghouse, H.D.; Prá, D.; Stenico, M.E.S.; Rieger, A.; Frescura, V.D.S.; Fiore, M.F.; Tedesco, S.B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chococcales, Cynobacteria) using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment* **2012**, *432*, 180-188.
40. Akimboro, A.; Bakare, A.A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, *112*, 470-475.
41. Akintonwa, A.; Awodele, O.; Afolayan, G.; Coker, H.A.B. Mutagenic screening of some commonly used medicinal plants in Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, *125*, 461-470.
42. Muller, J.C. Toxicidade reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn. Tese de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
43. Ustulin, M.; Figueiredo, B.B.; Tremea, C.; Pott, A.; Pott, V.J.; Bueno, N.R.; Castilho, R.O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande – MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, *19*, 805-813.

5.2 Normas da revista International Journal of Molecular Sciences

International Journal of Molecular Sciences — Instructions for Authors

Please first read the section '[Aims & Scope](#)' to have an overview, and to assess if your manuscript is suitable for this journal.

Submission of Manuscripts

- **Submission:** Manuscripts should be submitted online at www.mdpi.com by [registering](#) and [logging in](#) to this website. Once you are registered, [click here to go to the submission form](#).
- **Accepted File Formats:**
 - *MS Word:* Manuscript prepared in MS Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in MS Word, the [IJMS Microsoft Word template file](#) must be used. Please do not insert any graphics (schemes, figures, *etc.*) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.
 - *LaTeX:* ensure to send a copy of your manuscript as a PDF file also, if you decided to use LaTeX. When preparing manuscripts in LaTeX, please use the [IJMS LaTeX template files](#).
- **Coverletter:** Check in your cover letter whether you supplied at least [5 referees](#). Check if the [English corrections](#) are done before submission.

Manuscript Preparation

- **Paper Format:** A4 paper format, the printing area is 17.5 cm x 26.2 cm. The margins should be 1.75 cm on each side of the paper (top, bottom, left, and right sides).
- **Formatting / Style:** The paper style of International Journal of Molecular Sciences should be followed. You may download a [template file](#) from International Journal of Molecular Sciences homepage to prepare your paper. The full titles and the cited papers must be given. The style of [Journal of Chemical Information and Computer Sciences](#) is also acceptable. Reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [4] or [1-3], and all the references should be listed separately and as the last section at the end of the manuscript.
- **Reference Formatting:** See the [Reference Preparation Guide](#). References should be numbered according to the order in which they appear in the text.

- **Reference Preparation:** References should preferably be prepared with EndNote®, ReferenceManager™ or a similar bibliography software package. If references are prepared manually they must be checked for integrity and correctness (you may use ISI Web of Knowledge, PubMed/MEDLINE or Google Scholar). The Editorial Office will charge additional CHF 10 per citation for which extensive corrections must be made.
- **Authors List and Affiliation Format:** Authors' full first and last names must be given. Abbreviated middle name can be added. For papers written by various contributors a corresponding author must be designated. The PubMed/MEDLINE format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, country, and email address should be added. All authors who contributed significantly to the manuscript (including writing a section) should be listed on the first page of the manuscript, below the title of the article. Other parties, who provided only minor contributions, should be listed under Acknowledgments only. A minor contribution might be a discussion with the author, reading through the draft of the manuscript, or performing English corrections.
- **Abstract and Keywords:** The abstract should be prepared as one paragraph (about 200 words). A list of three to ten keywords must be given, and placed after the Abstract.
- **Figures, Schemes and Tables:** Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color. Full color graphics will be published free of charge. Figure and schemes must be numbered (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, *etc.*) and a explanatory title must be added. Tables should be inserted into the main text, and numbers and titles for all tables supplied. All table columns should have an explanatory heading. Please supply legends for all figures, schemes and tables. The legends should be prepared as a separate paragraph of the main text and placed in the main text before a table, a figure or a scheme.
- **Abstract/Table of Contents Graphic:** Authors are encouraged to provide a graphical representation of the paper (in either JPEG, GIF, PNG or PDF format) to be used as a graphic of the paper, along with the abstract, on the Table of Contents. The graphic should not exceed 500 pixels width/height. As an example, authors may review the abstract graphic of following papers:
 - <http://www.mdpi.com/1424-8220/9/1/490>
 - <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/1/378>
- **Electronic Supplementary Information (ESI):** Conference slides, video sequences, software, *etc.*, can be included with the submission and published as supplementary material. Please read the information about Supplementary Material Deposit beneath.

Potential Conflicts of Interest

It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section. It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section.

Review / Referees

Authors should suggest at least five potential referees with the appropriate expertise, although the Editor will not necessarily approach them. Please provide as detailed contact information as possible (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should be experts in the field who can provide an objective report - they should not be current collaborators of the authors nor have published with any of the authors of the manuscript within the last 5 years. Proposed referees should be from different institutions than the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential referees. Another possibility is to select referees from among the authors that you frequently cite in your paper

English corrections

This journal is published in English, so it is essential that for proper refereeing and quick publication all manuscripts are submitted in grammatically correct English. For this purpose we ask that non-native English speakers ensure their manuscripts are checked before submitting them for consideration. We suggest that for this purpose your manuscript be revised by an English speaking colleague before submission. Authors can also use the services of [American Journal Experts \(AJE\)](#) for this purpose. Authors of articles submitted to MDPI journals benefit of a one-time 10% discount on AJE's charges. Simply follow the above link to make use of the referral discount.

MDPI Publication Ethics Statement

IJMS is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). MDPI takes the responsibility to enforce a rigorous peer-review together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. MDPI takes such publishing ethics issues very seriously and our editors are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

CrossCheck/iThenticate

IJMS is a member of CrossCheck powered by iThenticate. iThenticate is a plagiarism screening service that verifies the originality of content submitted before publication. iThenticate checks submissions against millions of published research papers, and billions of web content. Authors are encouraged to use iThenticate to screen their work before submission by visiting www.ithenticate.com.

Supplementary Material Deposit

- We wish to encourage the submission of supplementary data in electronic formats, so that important chemical, structural or scientific information is retained in full. Spectral data (NMR, IR, Raman, ESR, *etc.*) can be submitted in JCAMP (.jdx) format.
- 3D coordinate structures (in pdb, mol, xyz or other common formats), if available, should also be submitted.

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title of the Paper (M_Title)

Firstname Lastname ^{1,*}, Firstname Lastname ^{2,†}, Firstname Lastname ^{2,†} and
Firstname Lastname ³

¹ Full Affiliation, Address

² Full Affiliation, Address; E-Mails: author2@email (F.L.); author3@email (F.L.)

³ Full Affiliation, Address; E-Mail: author4@email

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: author1@email;
Tel.: +1-111-111-111 (ext. 123); Fax: +1-111-111-112.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: This is the abstract section. One paragraph only (Maximum 200 words).

Resumo: Esta é a seção abstrato. Um parágrafo único (máximo de 200 palavras).

Keywords: keyword; keyword; keyword (3–10 keywords separated by semi colons)

Palavras-chave: palavras-chave; palavra-chave; palavra-chave (3-10 palavras-chave separados por ponto e vírgula)

1. Introduction

Main text paragraph.

Main text paragraph.

2. Results and Discussion

Main text paragraph.

Main text paragraph.

[add an equation here; use MS Word or MathType equation function] (1)

(Note: all equations should be completed within a two column table with one line, centered, no borders, as example see above).

Main text paragraph.

Main text paragraph.

2.1. *This is Subsection Heading*

Main text paragraph.

Main text paragraph.

2.1.1. This is Subsection Heading

Main text paragraph.

Main text paragraph.

Table 1. Add a descriptive label of the table here.

[add the table here; use MS Word's table function]

Figure 1. (a) Add a descriptive label of the figure here. (b) Add a descriptive label of the figure here. (c) Add a descriptive label of the figure here.

[add the figure here]

3. Experimental Section

Main text paragraph.

Main text paragraph.

4. Conclusions

Main text paragraph.

Main text paragraph.

Acknowledgments

Main text paragraph.

Conflict of Interest

State any potential conflicts of interest here or “The authors declare no conflict of interest”.

References and Notes

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the cited article. *Journal Title* **2007**, *6*, 100–110.
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, Editor 2, Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.
4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. Journal Abbreviation, phrase indicating stage of publication.
5. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).

6. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name*, Year, Volume, (Page range), doi or other identification number. Available online: <http://URL> (accessed on Day Month Year).
8. Title of Site. Available online: <http://URL> (accessed on Day Month Year).

Reference list: We recommend the use of reference management software to prepare the references list (e.g., Endnote, <http://www.mdpi.com/files/word-templates/MDPI.ens>).

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

5.3 Fotos da etapa da dissertação

5.3.1 Coleta

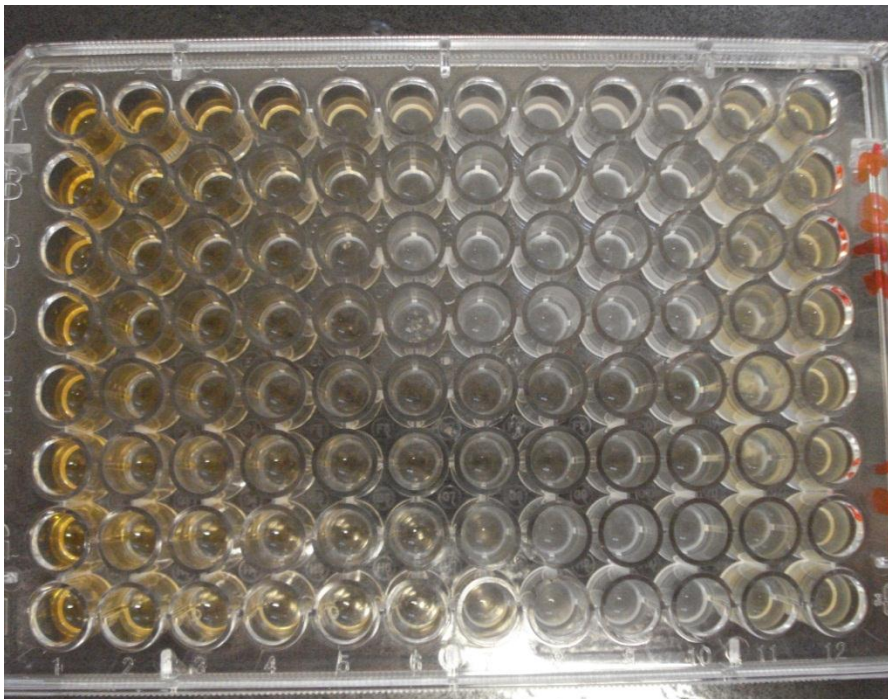


Coleta da casca da *M. urundeuva* – Fazenda Experimental UFGD (Faeca)

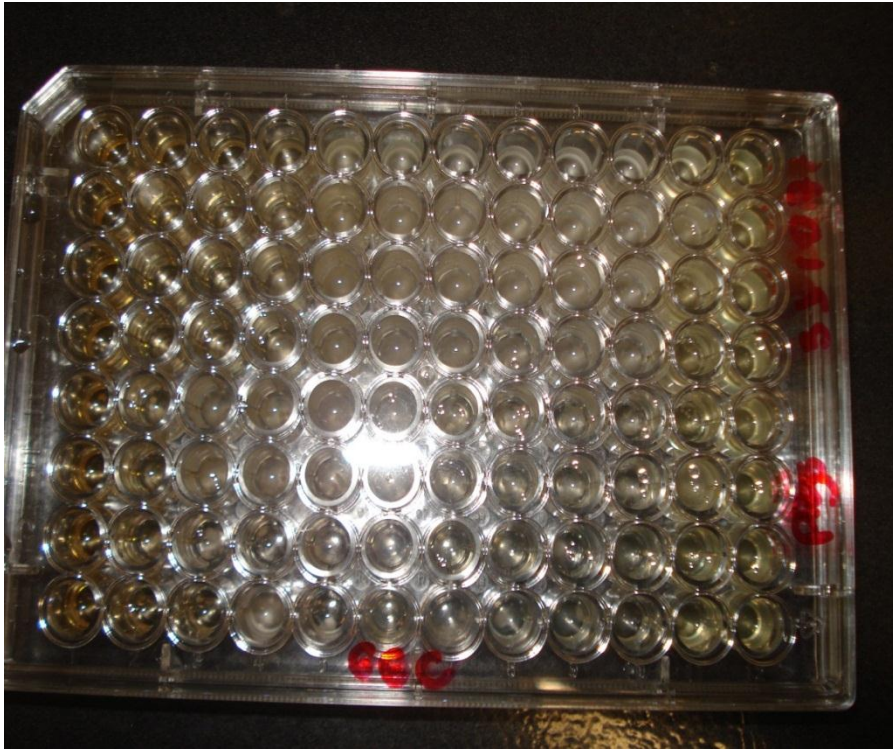
5.3.2 Preparação do Extrato



5.3.3 Concentração Inibitória Mínima



MIC do extrato etanólico da casca de *M. urundeuva*.



MIC do extrato aquoso da casca de *M. urundeuva*.

5.3.3 Ensaio de Toxicidade e Citotoxicidade em *Allium cepa*





Controle negativo



Concentração 0,2 mg do extrato etanólico da casca de *Myracrodruon urundeuva*



Concentração 0,3 mg do extrato etanólico da casca de *Myracrodruon urundeuva*



Concentração 0,5 mg do extrato etanólico da casca de *Myracrodruon urundeuva*

5.3.4 Toxicidade Aguda



Tratamento com o extrato etanólico da casca por gavagem



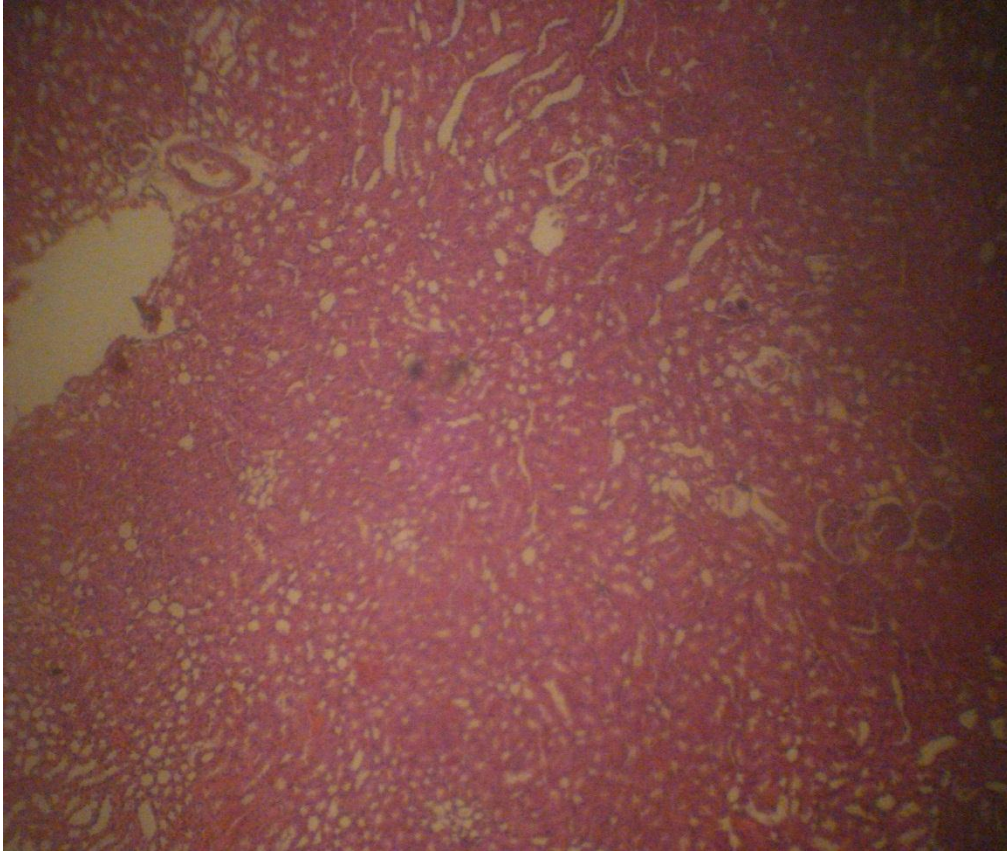
Sangramento nasal da rata tratada com extrato etanólico da casca



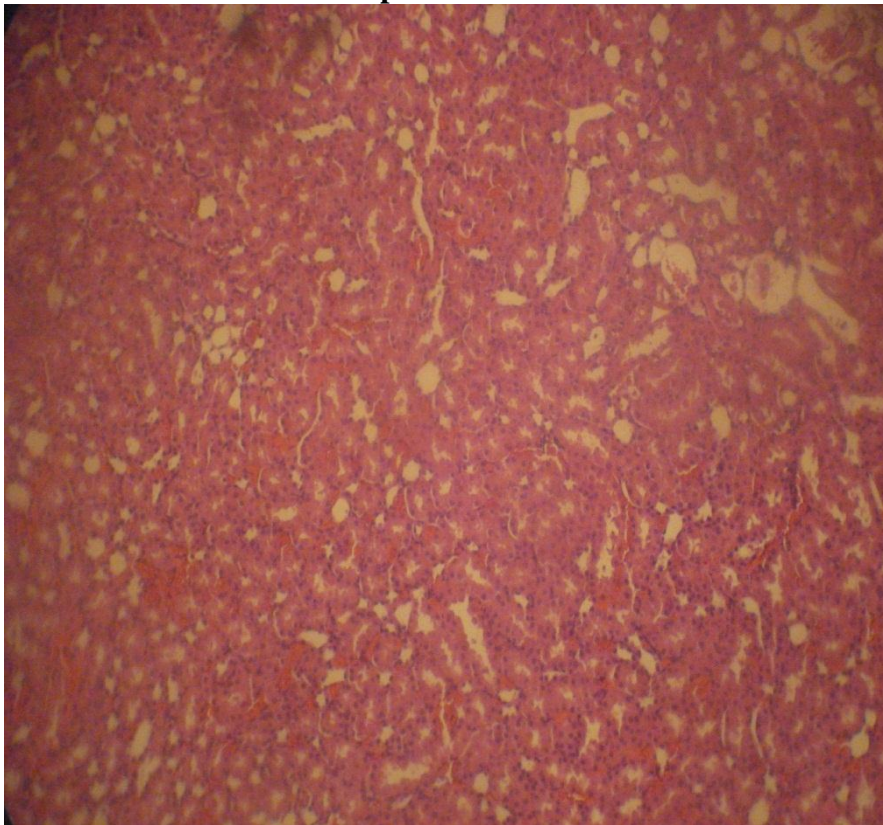
Corte abdominal da rata tratada com extrato etanólico da casca



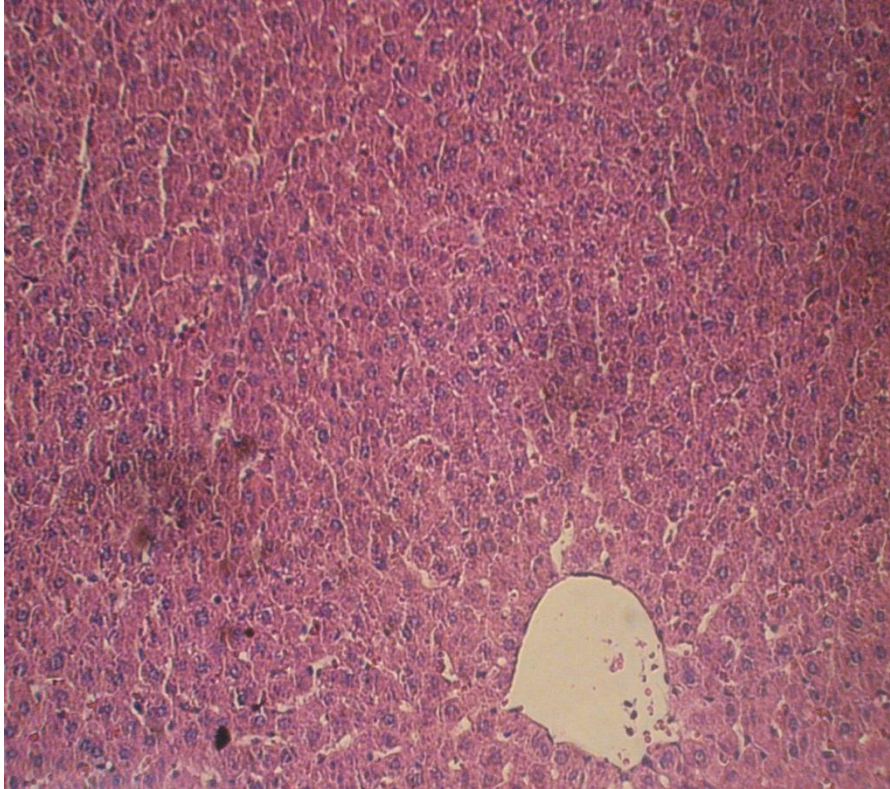
Corte abdominal da rata tratada com extrato etanólico da folha



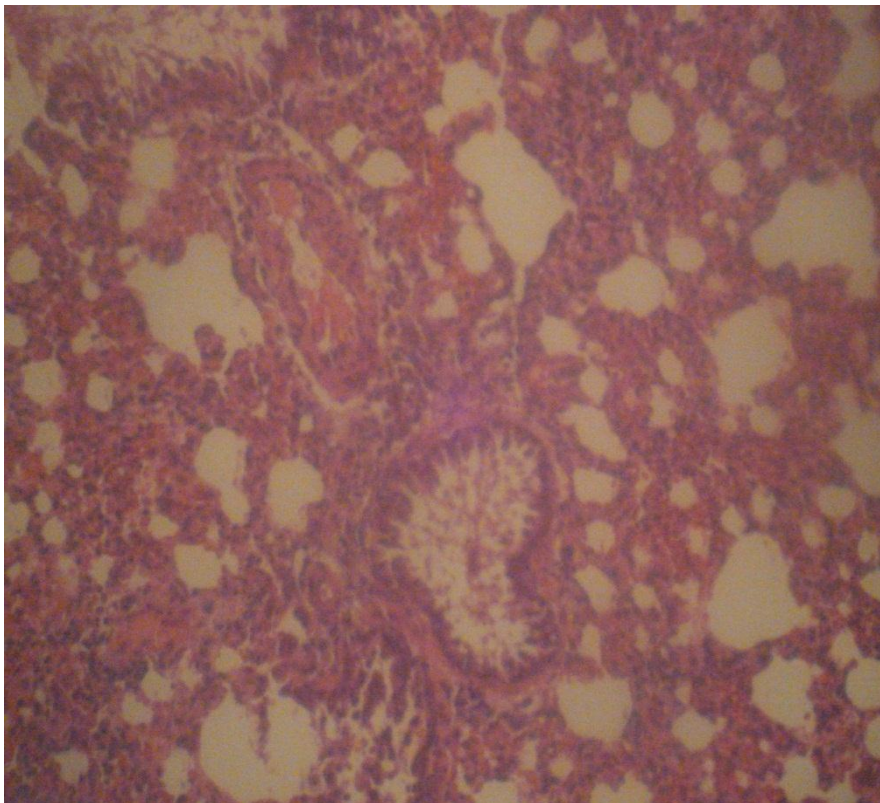
Lâmina do rim direito da rata tratada com o extrato etanólico da casca, aumento do microscópio óptico - 10x.



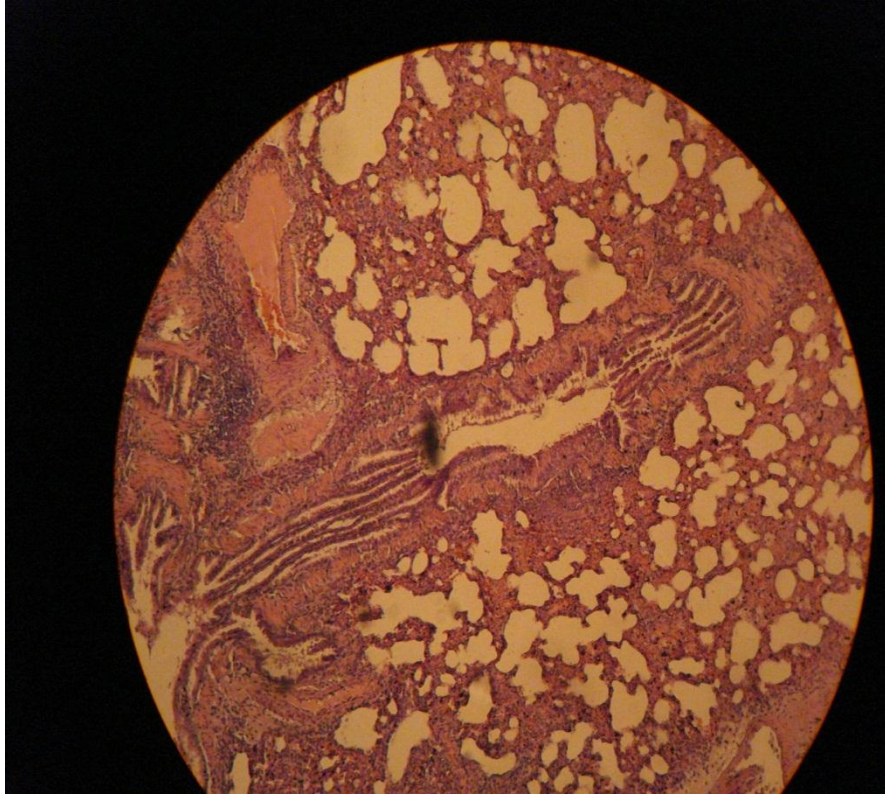
Lâmina do rim direito da rata tratada com o extrato etanólico da casca, aumento do microscópio óptico - 40 x.



Lâmina do fígado da rata tratada com o extrato etanólico da casca, aumento do microscópio óptico – 40x.



Lâmina do pulmão da rata tratada com o extrato etanólico da casca, aumento no microscópio optico – 40x.



Lâmina do pulmão da rata tratada com o extrato etanólico da casca, aumento do microscópio óptico – 10X