

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *LIPPIA SIDOIDES*
CHAM. (VERBENACEAE) PARA OBTENÇÃO DE UM CREME DE
APLICAÇÃO VAGINAL**

Edineide Maria Figueirôa Gomes de Farias

Recife – 2006

Edineide Maria Figueirôa Gomes de Farias

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *LIPPIA
SIDOIDES* CHAM. (VERBENACEAE) PARA OBTENÇÃO DE
UM CREME DE APLICAÇÃO VAGINAL**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Alda de Andrade Chiappeta

Co-orientadora: Profa. Dra. Jane Sheila Higino

Recife – 2006

Farias, Edineide Maria Figueirôa Gomes de.

Avaliação da atividade antifúngica de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) para obtenção de um creme de aplicação vaginal / Edineide Maria Figueirôa Gomes de Farias – Recife: O Autor, 2006.

v, 58 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Antibióticos, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. *Lippia sidoides* Cham. 2. Atividade antifúngica 3. Levedura - *Candida* spp. I. Título.

615.33 CDU (2.ed.)

UFPE

615.329 CDD (22.ed.)

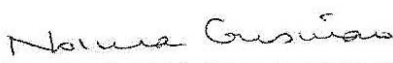
CCB – 2007- 040

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *EDINEIDE MARIA FIGUEIRÔA GOMES DE FARIAS* AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA EM REGIME FECHADO EM 25 DE AGOSTO DE 2006 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:


Dra. JANE SHEILA MIGINO
Departamento de Farmácia - UFPE


Dra. NORMA BUARQUE DE GUSMÃO
Departamento de Antibióticos- UFPE


Dra. IVONE ANTONIA DE SOUZA
Departamento de Antibióticos- UFPE

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei”.

I CORÍNTIOS, 13 (1-2)

Consagro

Os frutos desse trabalho ao **Senhor Deus**,
que na **Sua** infinita bondade,
mostrou-me o caminho a ser percorrido,
enriquecendo com grandes amigos
a minha travessia.

Dedico

Ao meu marido **Luís Alberto**, companheiro e amigo fiel,
com quem divido, ao longo de duas décadas,
alegrias, tristezas, responsabilidades e esperanças.
Refúgio onde encontro forças para a caminhada.

E a meus queridos filhos, **Betinho e Eduardinho**,
Inspiração e razão para tudo o que faço.
Anjos divinos que iluminam
e enchem de paz minha existência.

Ofereço

Ao meu pai, **Jaime Figueirôa**, *in memoriam*,
exemplo de simplicidade e devoção à Deus;

À minha querida mãe, **Edileuza Figueirôa**,
porto seguro onde busco carinho e alento;

A meus irmãos, **Jorge e Edigleide**,
os quais guardo em meu coração

E a meu **Tio Breno**,
por quem tenho grande afeição.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que permitiu a realização desse sonho, a Quem, todos os dias, dou Graças e Confio meus filhos, minha família, meu trabalho, minha vida.

Ao meu marido, **Luís Alberto**, por seu amor, sua compressão, e por me substituir nas tarefas junto aos nossos filhos.

Aos filhos queridos, **Betinho e Eduardinho**, por suportarem e entenderem a minha ausência, sempre demonstrando seu carinho e amor.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Alda de Andrade Chiappeta**, pelo entusiasmo, dedicação, paciência, presteza, e, sobretudo, pela forma amiga de contribuir para o meu aprendizado.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Jane Sheila Higino**, pela tranquilidade na condução dos trabalhos, por sua amizade e por sempre me receber de forma gentil e carinhosa.

À **Profa. Kêsia Xisto**, por sua inestimável colaboração, pela sua amizade, carinho, e por sempre se colocar disponível para a realização dos trabalhos.

A **Profa. Dra. Ivone Souza**, pela paciência, otimismo e perseverança na busca de resultados satisfatórios.

A **Profa. Dra. Julianna Albuquerque**, pela valiosa colaboração nos estudos fitoquímicos, pela amizade e respeito.

À **Profa. Dra. Norma Gusmão**, pelo carinho e por contribuir gentil e eticamente com os trabalhos desenvolvidos.

Ao Departamento de Antibióticos, na pessoa de sua chefe, **Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento** e vice-chefe, **Profa. Dra. Norma Gusmão** pelo apoio, estímulo e por viabilizarem a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Arquimedes Melo**, pelo incentivo e orientações pertinentes nos estudos toxicológicos.

Aos **Prof. Dr. Haroudo Sátiro** e **Prof. Dr. Davi Santana**, por contribuírem com os Padrões de Referência utilizados.

Ao **Dr. Luiz Loureiro** e **Dra. Izolda Moura**, Chefes do Laboratório do Hospital das Clínicas, pela amizade e por proporcionarem, dentro de uma visão administrativa moderna, condições para a conclusão das minhas atividades.

Ao **Dr. Adérito Vieira de Melo**, Gerente de Medicamentos da VISA-RECIFE, pelo apoio e por sempre atender, gentilmente, minhas solicitações.

Ao **Dr. João Bosco**, Diretor da Secretária de Saúde de Jaboatão dos Guararapes, pelo respeito, carinho e pela extraordinária ajuda na fase final da minha jornada.

A **Dra. Terezinha Tabosa**, pela grande amizade, estímulo e colaboração para realização dos testes.

A **Dra. Ana Albertina**, pela disponibilidade no fornecimento de grande parte das linhagens de *Candida* spp estudadas.

Ao **Dr. Aldo César**, por sua presteza e valiosa orientação nos testes de toxicidade.

Ao amigo **Rafael Ximenes**, pela dedicação e empenho na realização dos testes fitoquímicos.

Aos amigos **Rogério e Danielle**, pelo carinho, estímulo e grandes lições de perseverança.

Aos amigos do **Laboratório do Hospital das Clínicas**, que muito contribuíram para o êxito de minha jornada; em especial, **ao Setor de Sorologia** e às amigas **Ilecir, Norma, Mirian, Stefana, Rosário, Glaudicea, Edjane, Gerluse e Elza**.

Aos amigos da **Prefeitura da Cidade do Recife**, pelo carinho e pela presença sempre amiga, especialmente a **Lúcia Fancelino, Patrícia, Soraia, Ângela, Maísa e Cristiano**, pela valiosa colaboração e incentivo.

A **Virgínia e Natália**, que por trabalharem com *Lippia sidoides* em suas monografias, participaram ativamente na realização dos testes.

Aos colegas, mestrandos e estudantes de graduação: **Rosa, Vânia, Fernanda, Samanta, Fábio, Agenor, Paula, Ivanildo, Laurimar, Elis, Jovita, Jaciana, Ivana, Rosilma e Raphael**, pela convivência saudável e colaboração mútua.

A **Suely**, secretária do mestrado, pelo incentivo e gentileza no desempenho de suas atividades.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial a **Manoel, Orlando, Luís Carlos, Fátima, Sr. Zeca, Josa e Suzete**, pela receptividade e grande colaboração.

Enfim, a todos aqueles que **contribuíram** de alguma maneira, **acreditaram** na concretização do sonho, **torceram** pelo êxito do trabalho, **incentivaram-me** nos momentos mais difíceis enviando mensagens de otimismo e que, junto a mim, se **sentirão gratificados** com resultados alcançados...

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	4
2.1 – Objetivo Geral.	4
2.2 – Objetivos Específicos.	4
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 – O Gênero <i>Candida</i>	5
3.2 – Candidíase Vulvovaginal.	8
3.3 – Agentes Antifúngicos.	11
3.4 – Plantas Medicinais e Fitoterapia.	14
3.5 – O Gênero <i>Lippia</i>	20
3.5.1 – <i>Lippia sidoides</i> Cham.	21
3.5.1.1 – Atividade Biológica.	23
3.5.1.2 – Constituintes Químicos Ativos.	27
3.6 – Toxicidade.	30
3.6.1 – Toxicidade Aguda.	32
3.6.2 – Relação Dose-Resposta.	34
3.7 – Formas Farmacêuticas de Uso Tópico.	35
4 – MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 – Material Botânico.	38
4.2 – Microorganismos-teste.	39
4.2.1 – Identificação dos Isolados Clínicos.	39
4.3 – Obtenção dos Extratos Vegetais.	39
4.4 – Avaliação da Atividade Antifúngica “ <i>In Vitro</i> ” dos Extratos Brutos.	41
4.4.1 – Seleção do Extrato Mais Ativo.	41
4.4.2 – Teste de Difusão em Disco de Papel.	42

4.4.2.1 – Meio de Cultura.	43
4.4.2.2 – Padronização dos Inóculos.	44
4.4.2.3 – Semeio.	44
4.4.2.4 - Incubação e Leitura.	44
4.4.3 – Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CMI.	45
4.5 – Avaliação da Toxicidade.	47
4.5.1 – Animais.	47
4.5.2 – Estudo Toxicológico Agudo.	47
4.5.2.1 – Toxicidade Aguda – Ensaios Preliminares.	48
4.5.2.2 – Toxicidade Aguda – Determinação da DL ₅₀	50
4.6 – Estudo Farmacotécnico.	50
4.6.1 – Obtenção do Creme Vaginal.	50
4.6.1.1 – Componentes da Fase Oleosa (Lipofílica) ou Apolar.	51
4.6.1.2 – Componentes da Fase Aquosa (Hidrofílica) ou Polar.	51
4.6.1.3 – Técnica Preparatória do Creme Vaginal.	52
4.7 – Avaliação da Atividade Antifúngica do Produto Acabado.	53
4.7.1 – Padronização dos Inóculos Fúngicos.	53
4.7.2 – Técnica do Poço em Camada Dupla (<i>Well</i>).	53
4.7.2.1 – Preparação das Placas de Petri	53
4.7.2.2 – Diluição do Creme.	54
4.7.3 – Técnica do Ágar <i>Spot Test</i>	55
4.8 – Determinação das Classes de Compostos.	55
4.9 – Análise Cromatográfica.	57
4.10 – Bioautograma.	57
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.	59
5.1 – Obtenção e Identificação dos Isolados Clínicos.	59
5.2 – Obtenção dos Extratos Brutos.	62
5.3 – Avaliação da Atividade Antifúngica de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	63
5.3.1 – Testes Preliminares.	63
5.3.2 – Atividade Antifúngica do Extrato Etanólico Bruto Pilular de Folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	64
5.4 – Concentração Mínima Inibitória – CMI.	69

5.5 – Avaliação da Toxicidade.	70
5.6 – Obtenção do Creme Vaginal.	75
5.7 – Avaliação da Atividade Antifúngica do Produto Acabado.	77
5.8 – Determinação das Classes de Compostos.	78
5.9 – Cromatografia em Camada Delgada.	80
5.10 – Bioautograma.	80
6 – CONCLUSÕES	82
7 – PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS POSTERIORES.	84
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	85

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 3.1 – Exame à fresco de secreção vaginal: Presença de esporos e pseudo-hifas semelhantes a <i>Candida</i> spp.	6
Figura 3.2 – A) Colônias de <i>Candida</i> spp em meio sólido ágar Sabouraud; B) <i>Candida</i> sp ao microscópio.	6
Figura 3.3 – <i>Lippia sidoides</i> Cham. cultivada no Centro de Treinamento de Carpina – PE (CETREINO): aspecto geral da planta.	22
Figura 3.4 – Estrutura química do timol (A) e carvacrol (B), presentes no óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	29
Figura 4.1 – Representação esquemática da obtenção dos extratos vegetais.	40
Figura 4.2 – Representação esquemática do teste de difusão em disco de papel. .	43
Figura 4.3 – Representação esquemática da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).	46
Figura 4.4 – Grupo de camundongos albino Swiss fêmeas (<i>Mus musculus</i>) utilizados no teste de toxicidade aguda: A) Rabo marcado; B) Lombo marcado; C) Cabeça marcada; D) Cabeça e rabo marcados; E) Cabeça, rabo e lombo marcados; F) Sem marca.	48
Figura 4.5 – Aplicação intraperitoneal do extrato bruto selecionado de <i>Lippia sidoides</i> Cham., diluído em solução fisiológica, em camundongo albino Swiss fêmeas (<i>Mus musculus</i>)	49
Figura 5.1 – Identificação de espécies de <i>Candida</i> em meio CHROMagar <i>Candida</i> [®] : A) <i>Candida albicans</i> ; B) <i>Candida tropicalis</i> ; C) <i>Candida krusei</i> ; D) <i>Candida</i> sp.	59
Figura 5.2 – Halo de inibição de uma linhagem de <i>Candida albicans</i> formado pelo extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham., pelo teste de difusão em disco de papel.	66
Figura 5.3 – A) Linhagem de <i>Candida albicans</i> sensível ao fluconazol, com colônias resistentes dentro do halo de inibição; B) Linhagem de <i>Candida albicans</i> resistente ao fluconazol, pelo teste de difusão em disco de papel.	66
Figura 5.4 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e do fluconazol, frente às linhagens 1 a 15 de <i>Candida</i> spp.	67
Figura 5.5 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de	

<i>Lippia sidoides</i> Cham. e do fluconazol, frente às linhagens 16 a 30 de <i>Candida</i> spp.	68
Figura 5.6 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e do fluconazol, frente às linhagens 31 a 45 de <i>Candida</i> spp.	68
Figura 5.7 – Placas de Petri contendo diferentes concentrações do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham., frente a cinco linhagens de <i>Candida</i> spp, isoladas de secreção vaginal: 1) 2.000 µg/mL; 2) 1.000 µg/mL; 3) 500 µg/mL; 4) 250 µg/mL; 5) 125 µg/mL; 6) 62,5 µg/mL; 7) 31,2 µg/mL; 8) 0,0 µg/mL (controle)	69
Figura 5.8 - Curva dose/resposta da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham., aplicado intraperitonealmente em camundongos albino Swiss fêmeas.	75
Figura 5.9 – Creme vaginal formulado com o extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	76
Figura 5.10 – Halos de inibição de <i>Candida albicans</i> (Linhagem nº. 02) pelo creme vaginal à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham.: A) técnica do ágar <i>spot test</i> ; B) técnica do poço em camada dupla (<i>Well</i>)	77
Figura 5.11 – Halos de inibição de <i>Candida albicans</i> (Linhagem nº. 43) pelo creme vaginal à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham.: A) técnica do ágar <i>spot test</i> ; B) técnica do poço em camada dupla (<i>Well</i>)	77
Figura 5.12 – Cromatografia em camada delgada de sílica gel, mostrando idênticos valores de R _f para o timol (T) e o extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham. (E)	80
Figura 5.13 – Halos de inibição de <i>Candida albicans</i> pelo extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e pelo timol, em placa de sílica gel, em revelação biológica, mostrando idênticos valores de R _f s: E) extrato; T) timol.	81

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 3.1 – Patogênese da candidíase vulvovaginal recorrente.	11
Tabela 4.1 – Reagentes de complexação utilizados na prospecção da constituição química do extrato bruto selecionado de <i>Lippia sidoides</i> Cham. . .	56
Tabela 5.1 – Linhagens de isolados clínicos de <i>Candida</i> spp, obtidos de secreção vaginal.	61
Tabela 5.2 – Rendimento dos extratos brutos, etanólico e hidroalcoólico, das várias partes da planta.	62
Tabela 5.3 – Atividade antifúngica dos extratos brutos, etanólico e hidroalcoólico, de diferentes partes de <i>Lippia sidoides</i> Cham., frente a isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> em meio ágar Sabouraud (Halo de inibição em mm)	63
Tabela 5.4 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e fluconazol, frente a isolados clínicos de <i>Candida</i> spp em meio ágar Sabouraud.	65
Tabela 5.5 – Principais reações comportamentais relacionadas às doses administradas por via intraperitoneal, do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham., nos ensaios preliminares da avaliação da toxicidade aguda.	71
Tabela 5.6 – Principais reações comportamentais relacionadas às doses administradas por via intraperitoneal, do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham., nos ensaios definitivos da avaliação da toxicidade aguda.	72
Tabela 5.7 – Número de óbitos em relação às doses testadas, do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham., nos ensaios preliminares e definitivos, destacando-se a D1 (maior dose que não apresentou letalidade) e D2 (menor dose que apresentou 100% de letalidade).	74
Tabela 5.8 – Variações das formulações centesimais de creme vaginal (CRE) à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham. . . .	76
Tabela 5.9 – Principais componentes químicos do extrato etanólico bruto pilular de folhas de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	79

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM. (VERBENACEAE) PARA OBTENÇÃO DE UM CREME DE APLICAÇÃO VAGINAL.

No Brasil, o uso popular de plantas com propriedades curativas é uma prática secular deixada como herança pelos índios, negros e europeus e largamente utilizada na Região Nordeste. *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), freqüente na caatinga nordestina, é utilizada no tratamento de infecções da cavidade oral e da vagina, por apresentar forte atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias. Candidíase vaginal é uma das infecções mais comuns do trato genital feminino. Com o objetivo de encontrar alternativa para o tratamento desta patologia, extratos etanólico e hidroalcoólico de *Lippia sidoides* Cham. foram testados frente a isolados clínicos de *Candida* spp, obtidos de secreção vaginal. O teste de atividade antifúngica foi realizado pelo método de difusão em disco de papel, a uma concentração de 2.000 µg/disco (triplicata) e o extrato mais ativo foi selecionado. Como padrão de comparação utilizou-se Fluconazol a 25 µg/disco. A concentração mínima inibitória (CMI) para as linhagens de *Candida* spp, que apresentaram halos de inibição iguais ou superiores a 14 mm de diâmetro no teste de difusão em disco, foi determinada pelo método de diluições seriadas em meio sólido. Foi avaliada a toxicidade aguda do extrato selecionado, determinando-se a DL₅₀, em camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) por via intraperitoneal. O creme de aplicação vaginal à base de *Lippia sidoides* Cham. foi elaborado pelo método de fusão. A eficácia do produto acabado foi avaliada qualitativamente, frente a duas linhagens de *Candida* spp, pelas técnicas do poço em camada dupla (*well*) e do ágar *spot test*. Foram realizadas técnicas de caracterização que permitem detectar a presença ou ausência de diferentes classes de compostos, análises cromatográficas e bioautograma do extrato selecionado. Das linhagens de *Candida* spp estudadas, 71% foram identificadas como *Candida albicans*. O extrato etanólico bruto pilular das folhas de *Lippia sidoides* Cham. foi selecionado, por apresentar os melhores resultados no teste de difusão em disco, havendo inibido todas as linhagens de *Candida* spp testadas, com halos entre 12 e 20 mm de diâmetro, enquanto que com o fluconazol, oito não foram inibidas; 16 apresentaram halos entre 11 e 20 mm de diâmetro; seis, de 21 a 30 mm e 15, acima de 31 mm. A CMI foi de 250 µg/mL para todas as linhagens. A DL₅₀ foi de 1.329,19 mg/Kg de peso corpóreo. A produção da forma farmacêutica plástica creme vaginal à base de *Lippia sidoides* Cham. apresentou-se viável em escala piloto. O creme inibiu as duas linhagens testadas, com halos de 12,33 a 21 mm de diâmetro. A análise fitoquímica do extrato estudado revelou a presença de fenóis, flavonóis e xantonas, entre outros. A análise cromatográfica revelou a presença do Timol no extrato estudado, cuja atividade anti-*Candida* foi comprovada pelo bioautograma. Considerando-se que o antifúngico utilizado como padrão é um produto puro, com reconhecida ação anti-*Candida*, pode-se concluir que o extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* oferece uma alternativa promissora no tratamento da candidíase vaginal.

Palavras-chave: *Lippia sidoides* Cham.; Atividade antifúngica; Candidíase vaginal - tratamento

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTIFUNGICAL ACTIVITY OF *LIPPIA SIDOIDES* CHAM. (VERBENACEAE) FOR OBTAINING OF A CREAM OF VAGINAL APPLICATION.

In Brazil, the popular use of plants with healing properties is a secular practice left as inheritance by the indians, black and European and broadly used in the Northeast region. *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), frequent in the Northeastern savanna, is used in the treatment of infections of the oral cavity and of the vagina, for presenting strong antimicrobial activity against mushrooms and bacteria. Vaginal candidiasis is one of the more common infection of the feminine genital tract. With the objective of finding alternative for the treatment of this pathology, ethanolic and hidroalchoolic extracts of *Lippia sidoides* Cham. they were tested front to clinicals isolated of *Candida* spp, obtained of vaginal secretion. The test of antifungal activity was accomplished by the diffusion method in paper disk, in the concentration of 2.000 µg/disco (triplicate) and the most active extract was selected. As comparison pattern was used Fluconazole to 25 µg/disk. The concentration minimum inhibitory (CMI) for the lineages of *Candida* spp, that presented inhibition halos same or superior to 14 mm diameter in the diffusion test in disk, it was certain for the method of serial dilutions in solid medium. The acute toxicity of the selected extract was evaluated, being determined DL50, in mice albino Swiss females (*Mus musculus*) for road intraperitoneal. The cream of vaginal application to the base of *Lippia sidoides* Cham. it was elaborated by the coalition method. The effectiveness of the product finishing was evaluated qualitatively, front to two lineages of *Candida* spp, for the techniques of the well in double layer (well) and of the agar spot test. They were accomplished characterization techniques that allow to detect the presence or absence of differents compounds classes, analyses chromathographycs and bioautogram of the selected extract. Between the lineages of *Candida* spp studied, 71% were identified as *Candida albicans*. The ethanolic crude extract *pilular* of the leaves of *Lippia sidoides* Cham. it was selected, for presenting the best results in the diffusion test in disk, having inhibited all of *Candida* spp lineages tested, with halos between 12 and 20 mm diameter, while with the fluconazole, eight were not inhibited, 16 presented halos between 11 and 20 mm diameter, six, from 21 to 30 mm and 15, above 31 mm. CMI went of 250 µg/mL to all of the lineages. DL50 was of 1.329,19 mg/Kg of corporal weight. The production of the plastic pharmaceutical way cream-colored vaginal to the base of *Lippia sidoides* Cham. it came viable in pilot scale. The cream inhibited the two tested lineages, with halos from 12,33 to 21 mm diameter. The analysis phytochemical of the studied extract revealed the presence of phenols, flavonols and xantons, among others. The analysis chromathographyc revealed the presence of Timol in the studied extract, whose activity anti-*Candida* was proven by the bioautogram. Being considered that the antifunical used as pattern is a pure product, with having recognized action anti-*Candida*, it can be concluded that the ethanolic crude extract *pilular* of leaves of *Lippia sidoides* offers a promising alternative in the treatment of the vaginal candidiasis.

Key words: *Lippia sidoides* Cham.; Antifungal activity; Vaginal candidiasis – treatment.

1 INTRODUÇÃO

Importante fonte de substâncias biologicamente ativas, as plantas revelam uma grande diversidade tanto de estrutura, quanto de propriedades físico-químicas e biológicas, muitas das quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL; WANI, 1996).

A flora brasileira, pelo grande número de espécies vegetais, embora constitua um verdadeiro tesouro de produtos naturais, é ainda muito pouco estudada, qualquer que seja o aspecto científico que se queira abordar. Face aos saltos em que caminha a sociedade moderna nos mais variados ramos do conhecimento, levando à extinção de muitos *habitats*, faz-se necessário, por parte dos pesquisadores, um maior discernimento no aprofundamento das pesquisas, para preservar as reservas naturais do nosso planeta.

O *screening* de extratos vegetais para pesquisa de novos medicamentos, ainda permanece como uma prática bastante usual, apesar do rápido desenvolvimento da biotecnologia e da biologia molecular (COSTA, M., 2002). No Brasil e em outros países, a prática de buscar nas plantas medicinais, uma fonte de recursos terapêuticos encontra-se tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos, os quais têm se tornado o suporte da indústria farmacêutica de pequeno e médio porte, agregando-se, desse modo, valor como fonte promissora de recursos econômicos (FARIAS et al., 1994).

Candida spp, um dos agentes etiológicos das micoses oportunistas, é uma levedura que faz parte da microbiota normal da mucosa oral, do trato gastrointestinal, do canal vaginal e da região retal. O espectro de infecções causadas por diferentes espécies de *Candida* inclui doenças localizadas na pele e nas unhas; doenças que afetam as mucosas da boca, vagina, esôfago e árvore brônquica, e doenças que se disseminam acometendo muitos sistemas e órgãos (KONEMAN et al., 2001; MURRAY et al., 2002).

Neste contexto, a ocorrência em plantas superiores, de substâncias capazes de inibir o crescimento microbiano, é uma alternativa que vem sendo pesquisada, não apenas por constituir-se em recurso terapêutico alternativo, mas ainda, devido às perspectivas de isolar substâncias que apresentem eficácia significativa e menor índice de desvantagens, enriquecendo, desse modo, a disponibilidade de produtos naturais com àquelas propriedades (MARTINS; SANTOS, 1995; QUEIROZ, 1998).

Lippia sidoides Cham., espécie ocorrente no Nordeste do Brasil, apresenta em sua composição, princípios ativos antifúngicos e antibacterianos, sendo largamente utilizada na medicina popular, no tratamento de doenças da garganta e da boca ou de outras infecções, como compressas locais e lavagens vaginais (MATOS, 2000). A presença nesta espécie de timol e carvacrol, compostos fenólicos com considerável atividade antibacteriana e antifúngica, referida por diversos autores, fundamenta a investigação dessas propriedades, frente a isolados clínicos de leveduras, em extratos brutos, bem como a possibilidade de incorporação do extrato ativo em formulações farmacêuticas do tipo creme vaginal (MATOS, 2000; MATOS; OLIVEIRA, 1998; NUNES, 1999).

Em face ao exposto, evidencia-se a importância de pesquisar uma alternativa de origem natural e baixo custo, para o tratamento da candidíase vaginal, visando a produção de um creme de aplicação tópica, utilizando como matéria-prima o extrato das folhas de *Lippia sidoides* Cham.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de atividade antifúngica de extratos de *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim pimenta) frente a isolados clínicos de *Candida* spp e desenvolvimento de formulação de um creme vaginal.

2.2 Objetivos Específicos

- ☀ Obter extratos brutos de diferentes partes da planta;
- ☀ Avaliar qualitativa e quantitativamente, o potencial de atividade antifúngica dos extratos obtidos e selecionar aquele com melhor atividade;
- ☀ Determinar a Dose Letal (DL₅₀) do extrato selecionado;
- ☀ Realizar estudo farmacotécnico do extrato selecionado para elaboração de um creme vaginal e avaliar, *in vitro*, a eficácia do produto acabado;
- ☀ Determinar os constituintes químicos do extrato selecionado;
- ☀ Realizar análises cromatográficas para identificação dos marcadores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Gênero *Candida*

Algumas leveduras, embora possam ser isoladas de amostras clínicas sem apresentarem significado patológico, por serem componentes da microbiota da pele, boca, vagina e trato gastrintestinal de humanos, podem causar doença em pacientes imunodeprimidos, por serem microrganismos oportunistas (FERREIRA; ÁVILA, 2001; ZAITZ et al., 1998).

A grande incidência de leveduras no canal vaginal de mulheres aparentemente saudáveis está intimamente relacionada às altas concentrações de progesterona, estradiol e glicogênio, e a alterações do pH vaginal; o controle de seu crescimento depende da presença de outros microrganismos na microbiota vaginal (MENDES et al., 2005).

Algumas espécies de *Candida* apresentam dimorfismo morfológico além de formarem pseudo-hifas, uma forma exagerada de brotamento, onde as células recém-formadas permanecem fixadas à célula-mãe (MURRAY et al., 2002). Seus esporos constituem a forma resistente do fungo e estão associados às colonizações assintomáticas. Por outro lado, os micélios, formas germinativas, têm a capacidade de invadir os tecidos e ocasionar a sintomatologia própria da infecção (Figura 3.1) (ZIARRUSTA, 2002).



Figura 3.1 - Exame à fresco de secreção vaginal: Presença de esporos e pseudo-hifas semelhantes a *Candida* spp (fonte: www.medsobral.ufc.br/).

Quando cultivadas em meios artificiais, as espécies de *Candida* desenvolvem-se bem, apresentando colônias com coloração e aspecto que variam de branco a creme (Figura 3.2-A). Ao microscópio, apresenta-se como uma levedura Gram positiva, de forma oval ou arredondada, parede fina, com brotamento único ou múltiplo, medindo cerca de 0,2 a 0,3 μm de diâmetro (Figura 3.2-B). Possuem odor de levedo e crescem em uma faixa de temperatura entre 20 e 40°C e pH entre 5 e 6 (MENDES, 2005; MENDONÇA; DESLANDES; LEMOS 1989).



A



Esfregaço de tecido corado com Gram. *Candida* sp.

B

Figura 3.2 – A) Colônias de *Candida* spp em meio sólido ágar Sabouraud (fonte: www.Medschool.lsuhsu.edu/Microbiology/mmip/2003mip); B) *Candida* sp ao microscópio (fonte : www.fop.unicamp.br/ddo/microbiologia/aulas/roteiro/Candida_e_candidiase.pdf)

A variabilidade de comportamento das diferentes espécies de *Candida* criou a necessidade de desenvolvimento de métodos rápidos e fáceis para sua identificação. O meio de cultura CHROMagar Candida® mostrou-se um método sensível além de específico para identificação presuntiva das espécies mais comumente isoladas de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* (CROCCO et al., 2004).

Candida albicans é, sem dúvida alguma, a espécie mais freqüentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo. Levedura com potencial patogênico bastante conhecido, apresenta como principais fatores de patogenicidade e virulência, a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, o dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases. Trata-se de uma espécie naturalmente sensível a todos os antifúngicos de uso sistêmico, embora sejam conhecidos casos de resistência adquirida a azólicos, em pacientes expostos a estes medicamentos por tempo prolongado (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; COTTER; KAVANAGH, 2000).

Das cerca de 163 espécies do gênero *Candida* descritas, aproximadamente 20 estão associadas a processos infecciosos no homem (KURTZMAN; FELL, 1998). A proporção de infecções graves atribuídas a diferentes espécies deste gênero e aos fungos filamentosos vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas. Tem sido comprovado, através de culturas do fluido vaginal, que 15% a 25% dos casos

de vaginites são provocados por *Candida* spp, sendo que em 84% desses, *Candida albicans* é o agente responsável, seguida de *Candida glabrata* (11,7%), *Candida tropicalis* (5,3%), *Candida krusei* (2,6%) e outras espécies (2%) (GALLE; GIANINNI, 2004).

3.2 Candidíase Vulvovaginal

Por candidíase ou candidose, entende-se as diferentes relações que ocorrem entre hospedeiro e microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença sistêmica fatal. Leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em pacientes imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos. Devido às diversas formas com que a doença se apresenta, impõe-se a necessidade do estabelecimento de diferentes métodos diagnósticos e esquemas terapêuticos (ZAITZ et al., 1998).

Micoses sistêmicas, diagnosticadas em pacientes imunodeprimidos, representam enfermidades de indiscutível gravidade; no entanto, as vulvovaginites candidiásicas, por sua frequência e difícil tratamento em alguns casos, constituem um importante problema sanitário (ZIARRUSTA, 2002).

A candidíase ou monilíase vulvovaginal é uma das causas mais comuns de infecção do trato genital feminino. É caracterizada por apresentar um exsudato branco caseoso, cuja principal manifestação é o prurido vulvar intenso, causado pela produção de micotoxinas, bem como de etanol, ácido acético e ácido pirúvico,

produtos da fermentação glicídica (MENDONÇA; DESLANDES; LEMOS 1989; MURRAY et al., 2002; RASO; TAFURI, 1992; SOBEL; FARO; FORCE, 1998).

Segundo Galle e Gianinni (2004), candidíase é a segunda causa mais freqüente de vulvovaginite em mulheres na idade adulta. Estudos estatísticos mostram que 75% das mulheres terão, pelo menos, um episódio de candidíase vulvovaginal (CVV) ao longo de suas vidas, sendo que 40% a 50% destas teriam uma segunda infecção e cerca de 5% poderiam adquirir padrão crônico com episódios de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR).

As infecções vaginais são, tradicionalmente consideradas infecções das mucosas, e, portanto, afetadas pelos mecanismos de imunidade celular do hospedeiro. No entanto, estudos recentes sugerem que, mais do que a resposta celular é a resposta local, que protege contra as infecções por *C. albicans*. Tal conclusão está respaldada em estudos clínicos controlados que sugerem que as vaginites por *Candida* spp, não são mais freqüentes em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), não havendo, portanto, correlação com o decréscimo das células CD4 (CLARK et al., 1995; FIDEL JUNIOR; SOBEL, 1996; WHITE, 1996).

A presença de lactobacilos produtores de peróxido (bacilo de Döderlein) na microbiota vaginal, os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, propicia uma acidez adequada (pH 4,5) do ambiente vaginal, dificultando a proliferação da maioria dos patógenos. No entanto, por crescer bem em meio ácido, *Candida* spp encontra

nestas condições, ambiente adequado à sua proliferação (VAL; ALMEIDA FILHO, 2001).

A patogênese de *Candida* spp se processa em três etapas: (1) Inicialmente ocorre a adesão vaginal, essencial para a sobrevivência dos esporos. A maior frequência de *Candida albicans* neste tipo de infecção, justifica-se pela maior capacidade de aderência da mesma, em relação a outras espécies. Um ambiente hiperestrogênico (gravidez e uso de anticoncepcionais orais), uma microbiota vaginal comprometida (diminuição dos lactobacilos), promovem ou facilitam o processo de fixação. (2) Uma vez aderidos, os esporos germinam e desenvolvem hifas e micélios, tornando-se capazes de penetrar e invadir o epitélio vaginal; a penetração das hifas é facilitada pela produção de proteases, as quais têm o poder de destruir proteínas com função defensiva ao nível de mucosa vaginal. (3) A invasão epitelial ocasiona a liberação de uma série de substâncias (prostaglandinas, bradiquininas) com capacidade de induzir reações inflamatórias locais como edema, eritema, aumento do fluxo vaginal (ZIARUSTA, 2002).

Candidíase vulvovaginal recorrente, é caracterizada por quatro ou mais episódios de candidíase em um período de 12 meses. Hipóteses têm sido formuladas para explicar tais episódios: (1) A re-infecção, quando a *Candida* é completamente erradicada da vagina e re-introduzida a partir de reservatórios endógenos (trato digestivo, trato urinário, etc) ou por transmissão sexual (DST); (2) A recorrência/recidiva, baseada na semelhança de biótipos das cepas detectadas em sucessivos episódios. Diferentes fatores estão relacionados, em ambas as hipóteses (Tabela 3.1), incluindo aqueles que fazem referência ao agente infeccioso e ao

hospedeiro. A ausência de uma completa erradicação por um tratamento inadequado ou pela existência de cepas resistentes, pode ocasionar uma falha terapêutica e, portanto, uma recidiva (VAL; ALMEIDA FILHO, 2001; ZIARRUSTA, 2002).

Tabela 3.1 – Patogênese da candidíase vulvovaginal recorrente (ZIARRUSTA, 2002).

HIPÓTESE	FONTE	CAUSA	COMENTÁRIOS
Re-infecção	Digestiva DST	Anal Parceiro	A re-infecção pode ou não, ser causada pela mesma cepa
Recorrência	Virulência da <i>Candida</i> Dimorfismo Fatores do hospedeiro	Resistência antimicóticos Modulação antigênica Imunológica Não imunológica	a Espécies de <i>Candida</i> Não- <i>C. albicans</i> . Imunidade humoral e celular Flora bacteriana local; Nível de estrógenos

3.3 Agentes Antifúngicos

Por focalizarem a membrana citossólica dos fungos, os agentes antifúngicos convencionais, são tóxicos para as células do hospedeiro ou são fungistáticos, apresentando limitado espectro de atividade, o que dificulta a sua utilização terapêutica (MURRAY et al., 2002).

Enquanto se dispõe de uma grande diversidade de antibióticos antibacterianos, o número de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas é relativamente

pequeno; isto decorre do fato de que os fungos, como os mamíferos, são organismos eucariotos (apresentam núcleo individualizado), o que dificulta o desenvolvimento de compostos específicos para células fúngicas (MURRAY et al., 2002).

Os agentes antifúngicos de uso clínico estão classificados em três grupos, todos interagindo ou inibindo o ergosterol, principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos, a saber: (1) Antibióticos polienos, metabólitos secundários de espécies de *Streptomyces* (anfotericina B, nistatina), ligam-se ao esterol da membrana fúngica aumentando a sua permeabilidade, levando à morte celular; (2) Compostos azólicos, antibióticos sintéticos (miconazol, cetoconazol, fluconazol, etc.), atuam na biossíntese do ergosterol; e (3) Análogos de nucleosídeos (5-fluorocitosina), alilaminas (terbinafinas) e tiocarbamatos, inibem a formação do lanosterol, precursor do ergosterol (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1994, 1996; MURRAY et al., 2002).

O ergosterol é indispensável na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana, garantindo a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática. A ausência do ergosterol e o acúmulo de seus precursores afetam a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes, tornando o fungo vulnerável a danos (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1994, 1996).

O surgimento de cepas resistentes, principalmente às substâncias azólicas, tem dificultado a escolha da terapêutica mais eficaz na candidíase. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja

previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral. Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade. A elaboração da metodologia M27-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997) é o resultado de um esforço para a padronização desses testes (MARTINEZ; ALBRECHT, 1998; REX et al., 2000).

Candida albicans é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e de orofaringe, porém espécies não-*C. albicans* têm aumentado em número e em importância nas candidíases vaginal e sistêmica. Muitas das espécies não-*C. albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções (CROCCO et al., 2004). O uso indiscriminado de antifúngicos, especialmente o fluconazol, tem favorecido a emergência destas espécies. A eficácia deste triazol na prevenção e tratamento da candidíase, assim como a sua baixa toxicidade, o tornou o antifúngico de escolha para essas patologias; no entanto, a erradicação completa da infecção é dificultada pela ocorrência de re-infecções, alguns meses após a conclusão do tratamento. Nas recidivas pode-se verificar o surgimento de isolados de *C. albicans* com susceptibilidade diminuída ao fluconazol, *in vivo* e *in vitro*; a substituição de uma estirpe de *C. albicans* sensível por outra estirpe resistente e ainda, por espécies não-*C. albicans*, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* (COLEMAN et al., 1998).

Os antimicóticos vêm sendo a forma de intervenção terapêutica mais amplamente utilizada no combate a infecções candidisíacas; desta forma, o estudo

dos mecanismos genéticos que levam à resistência é fundamental para a adequada utilização desta droga. O aumento destas infecções é em parte, consequência do uso constante e inadequado de antimicóticos e inibidores celulares em geral, levando à seleção de isolados fúngicos resistentes. Tal fato tem levado à busca de novos agentes antifúngicos, menos tóxicos e mais ativos sistematicamente, inclusive de origem vegetal (GEORPAPADOKOU; WALSH, 1994, 1996; MURRAY et al., 2002).

3.4 Plantas Medicinais e Fitoterapia

As plantas, através do seu metabolismo secundário, dão origem a um grupo de compostos químicos que, por vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies. Tais substâncias apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e marcantes atividades biológicas, possuindo grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agro-químicos, além de constituírem uma inesgotável fonte de prospecção para o planejamento racional de novos fármacos (COSTA, M., 2002; MONTANARI; BOLZANI, 2001; PINTO et al., 2002; SIMÕES et al., 2002).

Os compostos fenólicos flavonóides são metabólitos secundários amplamente encontrados em materiais vegetais, principalmente nos óleos essenciais. Muitas funções específicas desses metabólitos, têm sido demonstradas em plantas, incluindo proteção contra radiações ultra-violeta, insetos, fungos, vírus e bactérias (HARBORNE, 1991; MARKHAM, 1989; NASCIMENTO et al., 2000).

O uso de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, remonta aos primórdios da origem do homem. O conhecimento das propriedades curativas e nutritivas das plantas deve ter sido adquirido através de dois caminhos: (1) A experimentação, de onde devem ter sido originados também diversos alimentos; (2) O instinto, isto é, uma forma irracional de relacionamento homem-natureza, à semelhança dos animais silvestres que procuram remédios em plantas, como se soubessem “racionalmente” do seu valor terapêutico (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Informações transmitidas de geração a geração, foram se acumulando gradativamente, até o surgimento de documentos escritos em placas, papiros e outras relíquias, fazendo referência a listas de plantas medicinais constantes de “farmacopéias” ligadas a antigas culturas. Talvez o mais famoso desses achados arqueológicos seja o *Papyrus de Ebers*, datado do século XVI a.C., contendo mais de oitocentas fórmulas e prescrições de fármacos usadas na região Mesopotâmica. Outra interessante fonte de informações sobre plantas medicinais é a Bíblia, onde são citadas cerca de trezentas espécies (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JUNIOR, 2000; OGA; SIQUEIRA, 2003; THOMSON, 1981).

No decorrer dos séculos, o homem foi estreitando cada vez mais, sua relação com as plantas. Com o início das migrações, surgiram as trocas de experiências e de espécies vegetais entre diferentes grupos étnicos. Vestígios arqueológicos descobertos em Shanidar, norte do Iraque, mostram que o homem de Neanderthal, há 60 mil anos, já tinha o conhecimento de pelo menos oito plantas utilizadas como medicamento (ARRUDA, 2002).

No Brasil, o uso de plantas para fins medicinais está historicamente ligado à cultura indígena, africana e européia. Esta última, representada pelos colonizadores portugueses e jesuítas que trouxeram uma nova concepção de saber e prática de saúde, semelhante à encontrada na Europa Medieval (ALVES, 2005; ARRUDA, 2002).

O bioma vegetal brasileiro é constituído por cerca de 350.000 e 550.000 espécies, das quais, mais de 55.000 já foi catalogada, constituindo a maior diversidade genética vegetal do mundo (DIAS, 1996). Considerando que mais da metade dessas espécies se encontra nas florestas tropicais, essas regiões devem ser consideradas como prioritárias no estabelecimento de programas de conservação, *in situ*, do germoplasma vegetal. A devastação antrópica de tais florestas acarreta a migração das populações a elas associadas, normalmente para centros urbanos, provocando uma interrupção no fluxo de conhecimento adquirido e acumulado ao longo do tempo, sobre a utilização medicinal tradicional de suas plantas (SIMÕES et al., 2002). A rica diversidade de nossa flora tem sido progressivamente destruída e a medicina tradicional brasileira, baseada em plantas tropicais, está sendo alterada pela cultura moderna (AMOROZO; GELY, 1988). Esse processo foi denominado por Schultes (1994) de “queima da biblioteca”, o qual propôs a sua conservação etnobotânica como forma de proteger o conhecimento dessas comunidades.

Com o reconhecimento da fitoterapia pela Organização Mundial de Saúde (OMS), na Conferência de Alma-Ata (DECLARAÇÃO DE ALMA-ATA, 1978), o

aproveitamento de plantas medicinais foi ressaltado como parte do “Programa Saúde Para Todos No Ano 2000”, recomendando-se inclusive, a realização de mais estudos e a propagação do uso das plantas medicinais regionais nos Programas de Atenção Primária à Saúde. Esta prática pode se constituir numa alternativa muito útil, devido a sua eficácia aliada a um baixo custo operacional, a relativa facilidade para aquisição das plantas e a compatibilidade cultural do programa com a população atendida (AMORIM, 1999; MATOS, 1994; TORRES et al., 2005).

Segundo a OMS, em documento divulgado na década de 90, as plantas medicinais constituem a única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde em 65-80% da população dos países em desenvolvimento. Tendo recomendado, portanto, aos países membros, dentre eles o Brasil, para que considerem a tradição e o uso secular amplamente distribuído de plantas, como um lastro de experimentação suficiente para respaldar o seu uso oficial em terapêutica (OMS, 1991; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

O emprego de plantas na cura de diversas doenças vai desde as formas mais simples de tratamento local, usadas na medicina popular, até a obtenção de formas farmacêuticas através de metodologias tecnologicamente sofisticadas, utilizadas nas indústrias de medicamentos. Há um ponto comum em ambos os casos: o homem percebeu a presença, nas plantas, de “algo” que, administrado sob forma de mistura complexa (extrato) ou de substância pura isolada, por qualquer via, tem a propriedade de provocar reações benéficas, capazes de levar à recuperação da saúde. Este “algo” é o princípio ativo ou marcador, que pode ser representado por uma única substância da planta ou por um conjunto delas; estas substâncias atuam

sinergicamente, quer empregadas ainda dentro da própria planta ou em seus extratos, quer extraídas e incorporadas a comprimidos, soluções, pomadas ou cápsulas, etc, pela indústria farmacêutica (ALVES, 2005).

As pesquisas com plantas medicinais possuem, geralmente, propósitos voltados ao desenvolvimento de fármacos para emprego na medicina humana. Segundo Pinto et al. (2002), isto pode ser observado a nível mundial, como por exemplo, no período compreendido entre 1983 e 1994, foram aprovados 529 novos fármacos, dentre os quais 39% são produtos naturais ou derivados semi-sintéticos.

Nos últimos anos, um número significativo de estudos tem sido conduzido em diferentes países para comprovar a eficácia de extratos vegetais. No entanto, as propriedades farmacológicas das plantas medicinais da flora brasileira, propagadas por usuários ou comerciantes, ainda possuem pouca comprovação científica. Muitas dessas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. A pesquisa etnofarmacológica é, portanto, um grande desafio em nosso país (BRITO A. R.; BRITO A. A., 1999; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A composição química e o aspecto farmacológico de diversas plantas do Nordeste brasileiro vêm sendo investigados por vários pesquisadores. Muitas dessas plantas são, há muito, empregadas na medicina popular em virtude de seus conhecidos poderes curativos contra infecções. Entre as mais utilizadas destacam-se: hortelã-da-folha-miúda (*Mentha x villosa* Huds), romã (*Punica granatum* L.), melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), capim-santo (*Cymbopogon*

citratus Stapf.) e alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) (CARVALHO et al. 1998; CRAVEIRO et al., 1981; DUARTE et al., 2005; MEDEIROS FILHO; PIRES; FREIRE, 1997; PASCUAL et al., 2001).

Segundo a OMS, “planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. O estudo prévio quanto a aspectos agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e o desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas, constituem a fundamentação científica necessária ao desenvolvimento de um produto fitoterápico, o que o diferencia das preparações utilizadas na Medicina Popular (PETROVICK; GONZÁLEZ ORTEGA; BASSANI, 1997).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº. 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004a), que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, em seu Anexo: REGULAMENTO TÉCNICO PARA MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS, o qual abrange medicamentos cujos princípios ativos são exclusivamente derivados de drogas vegetais, define:

Droga vegetal - planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada; Derivado de droga vegetal - produtos de extração da matéria prima vegetal: extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros; Fitoterápico - medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

Em fevereiro de 2005, o Ministério da Saúde divulgou resumo executivo da Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares (PMNPC), no qual evidencia a intenção de oficializar e regulamentar o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS). Dentre as principais diretrizes está a garantia do acesso aos seus usuários de um ou mais dos seguintes produtos: planta medicinal “*in natura*”, planta medicinal seca (droga vegetal), fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado.

3.5 O Gênero *Lippia*

O taxon genérico *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídas principalmente entre os países da América Central e do Sul e territórios da África Tropical. Esse gênero, em geral, apresenta um consistente perfil, quanto ao seu uso popular, composição química e propriedades farmacológicas. Sua utilização mais comum é como medicamento no tratamento de desordens respiratórias, na forma de decocto, podendo também ser utilizado como condimento na preparação de alimentos. Algumas espécies também apresentam atividade analgésica, anestésica, antiespasmódica, antiinflamatória,

antisséptica, antimicrobiana, antimalárica, citostática, anti-hipertensiva, entre outras (LEAL et al., 2003; LORENZI; MATOS, 2002; PASCUAL et al., 2001).

A composição química dos óleos essenciais de várias espécies de *Lippia* tem sido investigada por meio de técnicas cromatográficas. Os componentes mais freqüentemente encontrados são: limoneno, β -cariofileno, ρ -cimeno, cânfora, linalool, α -pineno e timol (PASCUAL et al., 2001).

3.5.1 *Lippia sidoides* Cham.

Originária de climas tropicais e subtropicais, *Lippia sidoides* Cham. (syn. *L. multicapitata* Mart.), popularmente conhecida no Brasil como “alecrim-pimenta”, “alecrim do nordeste”, “estrepa-cavalo” e “alecrim-bravo”, apresenta-se como um grande arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, de 2-3 m de altura, próprio da vegetação do semi-árido nordestino. Possui folhas com forte odor de cânfora e sabor picante, com 2-3 cm de comprimento e inflorescências pequenas, esbranquiçadas, presentes durante quase todo o ano (Figura 3.3). Após sua introdução nos programas de fitoterapia em atenção primária à saúde, passou a ser cultivada em vários estados do Sul e Sudeste, em solos de alta fertilidade, produzindo plantas com folhas muito maiores (LEAL et al., 2003; LORENZI; MATOS, 2002; NUNES, 1999).



Figura 3.3 – *Lippia sidoides* Cham. cultivada no Centro de Treinamento de Carpina – PE (CETREINO): aspecto geral da planta.

Juntamente com as flores, as folhas constituem a parte medicinal desta espécie, usada na forma de chá do tipo abafado (infusão) em lavagens nasais no tratamento de rinites alérgicas e na forma de tintura, como loção tópica para lavagens e compressas em ferimentos infectados. A tintura diluída é também utilizada na forma de gargarejo ou bochecho, nas infecções da garganta e inflamações da gengiva, e nas lavagens vaginais, como desodorante e antisséptico íntimo. Estas preparações são também muito eficientes como medicação de uso externo para tratar acne, sarna infectada, pano branco, impigens, caspa, bem como para combater o mau cheiro das axilas e dos pés (LORENZI; MATOS, 2002; MATOS, 2000; PASCUAL et al., 2001).

Seu óleo essencial tem forte atividade contra *Streptococcus mutans*, principal agente causador da cárie dental, podendo ser usado como medicação anticárie preventiva na forma de creme dental e colutório; pode também ser adicionado a produtos cosméticos, como antisséptico contra a microflora cutânea (MENDONÇA et al., 1990; NUNES, 1999).

Folhas, flores e frutos secos e triturados constituem excelente mistura para tempero de carnes e pizzas, que pode ser usado no lugar do tomilho (*Thymus vulgaris* quimiotipo *thymolifera*) (LORENZI; MATOS, 2002).

3.5.1.1 Atividade Biológica

O óleo essencial e o extrato etanólico de *Lippia sidoides* Cham. têm demonstrado fortíssima atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra: *Staphylococcus aureus*, em infecções de pele e garganta; *Streptococcus mutans*, responsável pela cárie dentária; *Corynebacterium xerosis*, causador do mau cheiro nas axilas e nos pés; *Candida albicans* e *Candida* spp, encontradas em aftas e no corrimento vaginal; *Trichophytum rubrum* e *Trichophytum interdigitale*, agentes causadores de micoses na pele; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* e uma pequena atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (LACOSTE et al., 1996; LEMOS et al., 1990; LORENZI; MATOS, 2002).

Brito A. R. e Brito A. A. (1993) relataram uma atividade anestésica local do óleo essencial de *Lippia sidoides*, devido à presença de timol em sua composição, além de significativa atividade antiespasmódica e efeitos sedativos. Relataram ainda um efeito anti-hipertensivo da água residual da destilação a vapor de folhas de *Lippia sidoides*.

Lacoste et al. (1996) avaliaram as propriedades antibacteriana e antifúngica de duas amostras do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e, comparativamente, do timol e carvacrol (princípios ativos majoritários), frente aos microrganismos que

colonizam as axilas e os pés. O *Corynebacterium xerosis*, responsável pelo odor característico das axilas, foi especialmente inibido por ambos (óleo essencial e princípios ativos); enquanto que, sobre a microbiota dos pés, as propriedades inibidoras foram menos expressivas.

Em ensaios de atividade de vários óleos essenciais de plantas nordestinas contra a placa bacteriana, realizados por Moraes et al. (1996), *Lippia sidoides* foi a que apresentou melhores resultados. Fernandes Filho et al. (1998) prepararam e avaliaram clinicamente um antisséptico bucal à base do óleo essencial desta espécie, o qual foi testado em soldados do Hospital Geral de Fortaleza, que fizeram uso exclusivo do produto como agente de limpeza durante sete dias, resultando na inibição de 12% e redução de 6% da formação da placa bacteriana, demonstrando, que o antisséptico bucal preparado com óleo essencial de *Lippia sidoides* constitui um excelente coadjuvante na assepsia bucal.

Queiroz (1998), através da técnica de difusão em ágar, avaliou a susceptibilidade de 14 cepas de leveduras do gênero *Candida*, isoladas de cavidade bucal, incluindo *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis* frente aos extratos e óleo essencial, obtidos de plantas medicinais, nas concentrações que variaram entre 156 a 5.000 µg/mL e 0,02 mL/disco, respectivamente. Os resultados obtidos com os extratos revelaram atividade antifúngica a partir das concentrações de 2.500 µg/mL para a maioria das espécies vegetais. Para o óleo essencial proveniente das folhas de *Lippia sidoides*, cerca de

71,4% das cepas incluídas no teste foram inibidas, mostrando boas perspectivas para avaliações farmacológicas mais abrangentes.

Nunes (1999) desenvolveu preparações cosméticas de uso odontológico (creme dental e enxaguatório bucal) a partir do macerado hidroalcoólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. As preparações foram avaliadas clinicamente e comparadas a um produto de referência do mercado (enxaguatório bucal Kolynos Ah!®), quanto a sua eficiência como coadjuvante no controle da placa bucal, em 84 (oitenta e quatro) voluntários do Comando Militar do Nordeste, obtendo resultados satisfatórios para os produtos formulados.

O óleo essencial e a água residual da destilação a vapor de *Lippia aff sidoides* Cham. apresentaram atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, o mais importante hospedeiro de *Schistosoma mansoni* no Brasil (CRAVEIRO et al., 1981; PASCUAL et al., 2001).

A biocompatibilidade do extrato hidro-alcoólico de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) frente ao tecido subcutâneo de ratos foi avaliada por Couto et al. (2000). Ao final dos experimentos, os autores constataram que o extrato estudado promoveu no tecido subcutâneo dos ratos, em todos os períodos analisados, um processo inflamatório crônico que variou de moderado a discreto, e que o mesmo foi bem tolerado pelo tecido subcutâneo dos animais, pois decorridos 60 dias, a área implantada com o material teste apresentou-se em fase final do processo de cicatrização.

Girão et al. (2003) avaliaram o efeito de um antisséptico bucal preparado à base do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre a gengivite marginal de cães, nos quais foi aplicada a preparação por dois dias durante duas semanas. Os resultados mostraram significativa redução nos índices da placa bacteriana, cálculo, gengivite e infiltração inflamatória dos cães.

Carvalho et al. (2003) avaliaram a atividade larvicida do óleo essencial e do hidrolato (solução saturada de óleo essencial em água) de *Lippia sidoides* Cham., contra larvas de *Aedes aegypti*. Os bio-ensaios foram realizados com o óleo essencial, com o hidrolato puro e diluído, e com os seus principais constituintes, timol e carvacrol. Os resultados comprovaram a atividade larvicida das amostras testadas, sendo o timol, derivado fenólico alquilado, o princípio-ativo responsável por essa ação; este resultado sugere que o óleo essencial de *Lippia sidoides* é um larvicida natural promissor, mais seletivo e biodegradável.

Da mesma forma, Costa J. et al. (2005) estudaram a atividade larvicida do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, obtendo excelentes resultados quanto ao potencial ativo, que em concentrações de até 100 ppm apresentaram um percentual de morte total das larvas (100%), produzindo uma CL₅₀ de 19,5 ppm para larvas de *Aedes aegypti* e 16,6 ppm para *Culex quinquefasciatus*, apontando para uma perspectiva de elaboração de formulações que possam funcionar como alternativa natural ao combate de larvas de mosquitos.

Nunes et al. (2005) caracterizaram *Lippia sidoides* Cham. como matéria-prima para uso em produtos farmacêuticos através de ensaios físico-químicos: perda por dessecação, teor de óleo essencial e perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada – CCD.

3.5.1.2 Constituintes Químicos Ativos

Analizando a composição química de várias espécies de *Lippia*, inclusive *L. sidoides*, Lemos et al. (1990, 1992) encontraram diferentes concentrações de timol e carvacrol. Exemplos de uma mesma espécie, coletados em diferentes sítios, também apresentaram essas diferenças. Além do estudo fitoquímico, foi avaliada ainda a atividade antimicrobiana do óleo essencial dessas espécies frente a fungos e bactérias patogênicas.

As folhas de *Lippia sidoides* produzem cerca de até 4% de óleo essencial contendo como principais constituintes, o timol, cujo teor tem variado entre 34,2 a 95% em várias determinações, e carvacrol (seu isômero de posição), monoterpenos fenólicos dotados de fortíssima atividade antibacteriana e antifúngica, inclusive contra *Candida albicans*, isolada de fluido vaginal (LEAL et al., 2003; LORENZI; MATOS, 2002). Além destes, foram encontrados: p-cimeno, α -terpineno (monoterpenos) e β -cariofileno, α -copaeno e α -humuleno (sesquiterpenos). A ação antisséptica de seu extrato etanólico está relacionada com a presença de flavonóides e quinonas, componentes químicos fixos referidos por diferentes autores (MACAMBIRA et al., 1986; NUNES, 1999). O teor de timol encontrado na planta

apresenta uma variação sazonal e uma redução em torno de 30,7%, no rendimento da extração do óleo essencial das folhas de *Lippia sidoides*, após cinco meses de seu armazenamento (NUNES, 1999).

O timol (Figura 3.4A), cuja nomenclatura química é 5-metil-2-(1-metil-etil) fenol ($C_{10}H_{14}O$), componente químico majoritário no óleo essencial de *Lippia sidoides*, é encontrado principalmente em espécies da família Lamiaceae como *Thymus vulgares* L. e *Monarda punctata* L., ocorrendo também em diversas espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae). Apresenta-se em forma de cristais grandes ou de pó de coloração branca e cristalina com um aroma forte e irritante (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; THE MERCK INDEX, 1996). Utilizado como princípio ativo de várias formulações anti-sépticas, para o tratamento de infecções da boca, garganta e pele. Sua utilização em farmácia é limitada pela pouca solubilidade em água. Quando adicionado ao meio de cultura, inibe totalmente o crescimento de fungos como *Aspergillus flavus* e *A. vesicolor* em concentrações inferior a 0,4 mg/mL (NUNES, 1999).

O carvacrol (Figura 3.4B), de nomenclatura química 2-metil-2-(1-metil-etil)-fenol ($C_{10}H_{14}O$), é isômero de posição do timol e tem características químicas e atividade semelhantes. Possui aroma forte e irritante, é pouco solúvel em água e bastante solúvel em álcool. Este composto possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antineoplásicas comprovadas cientificamente (THE MERCK INDEX, 1996).



Figura 3.4 – Estrutura química do timol (A) e carvacrol (B), presentes no óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (THE MERCK INDEX, 1996).

Estudando o extrato etanólico de *Lippia sidoides*, Costa S. et al. (2002) isolaram e elucidaram as estruturas de 13 compostos, utilizando detalhada análise espectroscópica, principalmente RMN de hidrogênio e carbono 13. Dentre eles, encontram-se um flavonóide e uma lignana, identificados como taxifolina e isolariciresinol.

Leal et al. (2003) avaliaram o teor de timol, princípio ativo usado como marcador nas tinturas das folhas de *Lippia sidoides*, preparadas com material coletado antes, durante e após floração, concluindo que o melhor momento para a coleta da planta parece ser após a sua floração, o qual apresentou maior teor do marcador; embora os resultados obtidos mostrem apenas uma discreta diferença nas concentrações de timol, nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta.

Os processos de secagem pós-colheita de plantas medicinais influenciam no rendimento de óleos essenciais e/ou concentrações dos componentes ativos; baseados nessa informação e objetivando reduzir o tempo necessário para completar o processo de secagem, Randünz et al. (2001) avaliaram a influência da temperatura do ar, no tempo de secagem em estufa sobre folhas de “alecrim-

pimenta” (*Lippia sidoides* Cham.), operando com temperaturas de 40, 50, 60, 70° C e temperatura ambiente. Os resultados mostraram que o aumento da temperatura proporcionou uma redução significativa no tempo gasto na secagem, não apresentando, porém, diferenças significativas no teor de óleo essencial, exceto para a amostra seca à temperatura ambiente, que apresentou menor rendimento, inclusive inferior ao do material fresco.

A viabilidade de processos de extração de produtos naturais usando dióxido de carbono (CO₂) pressurizado, próximo ao ponto crítico ou sob condições supercríticas, técnica bastante difundida na indústria, especialmente no campo de alimentos, cosméticos e medicina, como forma de reduzir o gasto de energia, levou Sousa et al. (2002) a utilizar um sistema de extração através de fluidos pressurizados (SFE) para a obtenção do óleo essencial de *Lippia sidoides*, cujo maior componente, o timol, é um potente antisséptico do grupo fenol.

3.6 Toxicidade

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano e/ou morte. Desta forma, toda substância, pode ser considerada um agente potencialmente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição, a via pela qual é administrada, bem como das condições fisiológicas do indivíduo que recebe a dose. Por outro lado, todas as substâncias podem ser usadas de forma segura, desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de tolerância (OGA; SIQUEIRA, 2003).

Os organismos vivos apresentam a capacidade de se adaptarem às condições adversas de exposição aos xenobióticos (substâncias químicas estranhas ao organismo), através de modificações bioquímicas, morfológicas e mecanismos fisiológicos; no entanto, quando os mecanismos de adaptação são ultrapassados, manifesta-se o efeito tóxico. No caso de medicamentos em particular, deve-se distinguir os efeitos colaterais (não desejados, porém toleráveis) da toxicidade, ou seja, efeitos lesivos de maior gravidade, às vezes, letais (OGA; SIQUEIRA, 2003).

Por ser uma substância estranha ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas, a planta medicinal utilizada em medicamentos é um xenobiótico, e os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos. Portanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros; faz-se necessário que se estabeleça a relação risco/benefício do seu uso, através de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos de medicamentos (SIMÕES et al., 2002).

Quando comparada aos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade das plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial; entretanto, isto não é verdadeiro, chegando mesmo a constituir um sério problema de saúde pública. Efeitos adversos dos fitomedicamentos e possíveis adulterações que podem levar a toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação) com outras drogas, ocorrem corriqueiramente. Pesquisas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos, assim como o controle da comercialização pelos órgãos

oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais, são ainda incipientes no Brasil (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A Resolução - RE Nº 90/2004 da ANVISA (BRASIL, 2004b), determinou a publicação do GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica, requeridos para o registro e renovação de registro dos fitoterápicos. Estes testes, devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido. A referida resolução, estabelece os seguintes tipos de ensaios: Toxicidade Aguda (dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas); Toxicidade de Doses Repetidas (longa duração – 90 dias); Estudo Especial - Genotoxicidade e Avaliação Toxicológica de Medicamentos Fitoterápicos de Uso Tópico.

3.6.1 Toxicidade Aguda

Toxicidade aguda de uma substância é definida como efeitos adversos que ocorrem após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de um período de 24 horas, e tem como objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da Dose Letal Média (DL_{50}). Este parâmetro representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos indivíduos de uma população experimental. A DL_{50} é uma ferramenta útil na identificação da toxicidade relativa de qualquer substância, e sua correlação com a Dose Efetiva ou

Eficaz Média (DE₅₀), permite determinar o Índice Terapêutico (I.T.) da droga, ou seja, a sua margem de segurança (OGA; SIQUEIRA, 2003; SILVA P., 2002).

Lippia sidoides demonstrou baixa toxicidade dos constituintes hidrossolúveis arrastados por vapor d'água durante a extração de óleo essencial de suas folhas, em ensaio toxicológico agudo pré-clínico. Além disso, o teste de reação por contato, feito com a aplicação de óleo essencial a 1% na pele dos animais, não causou alergia (MENDONÇA et al., 1990; VIANA; MATOS; CRAVEIRO, 1978).

Estudos para a determinação da alergenicidade cutânea e oftálmica do óleo essencial de *Lippia sidoides* em coelhos foram efetuados através de diluições do óleo a 10% com variação de 1/5 à 1/100, onde na concentração de 1/100 ocorreu ausência de reação alérgica (SOUZA et al., 1991).

Carvalho et al. (2003) avaliaram a toxicidade aguda do hidrolato puro e diluído de *Lippia sidoides*, em camundongos utilizando a via intraperitoneal (i.p.). Os resultados mostraram que as injeções, por via intraperitoneal, do hidrolato puro não causaram nenhum efeito adverso ou mortalidade.

3.6.2 Relação Dose-Resposta

A relação dose/resposta é representada por uma curva Gaussiana teórica, calculada estatisticamente a partir de observações de mortalidade após exposição a doses relacionadas da substância a ser testada (OGA; SIQUEIRA, 2003).

A constituição física e química da substância farmacêutica – particularmente a solubilidade lipídica, o grau de ionização e o tamanho molecular – determina, em grande parte, a capacidade de levar a cabo sua atividade biológica. A resposta biológica a um fármaco é o resultado de sua interação com os receptores celulares ou sistemas enzimáticos importantes. Para qualquer substância farmacologicamente ativa, na faixa de sensibilidade da estrutura afetada pela droga (biofase), a magnitude do efeito é diretamente proporcional à sua concentração no local de ação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JUNIOR, 2000; SILVA P., 2002).

A regra principal da posologia é que ela deve ser suficiente para produzir o efeito terapêutico desejado, com a menor quantidade possível de medicamento e, se possível, sem se observarem reações adversas e efeitos colaterais (OGA; SIQUEIRA, 2003).

Na avaliação da toxicidade de uma droga através da determinação da dose letal, deve-se levar em consideração a variação individual de sensibilidade às drogas, portanto, os testes devem ser realizados com um grande número de animais. Silva P. (2002) relata que Trevan, em 1927, sugeriu que se considerasse

como dose letal àquela que matasse 50% dos animais injetados (DL_{50}), isto porque os valores em torno da DL_{50} variam menos que aqueles ao redor da DL_1 ou DL_{99} . Estes valores quando interpolados em gráfico (colocando-se em ordenadas a percentagem de animais mortos e em abcissas as doses empregadas) resultam numa curva sigmóide.

3.7 Formas Farmacêuticas de Uso Tópico

Pomadas, cremes, sistemas transdérmicos de liberação de fármacos, loções e soluções são as formas farmacêuticas dermatológicas, tópicas, usadas com maior frequência; entretanto, outras preparações, tais como pastas, linimentos, pós, géis, tinturas e aerossóis também são usados. As preparações são aplicadas à pele ou mucosas, por seus efeitos físicos, ou seja, sua capacidade de agir como protetores, lubrificantes, emolientes, secantes, etc., ou devido ao efeito específico de seus princípios ativos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JUNIOR, 2000).

Os cremes e pomadas vaginais são bastante empregados principalmente no combate às infecções que ocorrem no sistema genito-urinário feminino, para restaurar a mucosa vaginal e para contracepção. Em infecções vaginais, os organismos patogênicos comumente envolvidos são *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* ou outras espécies de *Candida* e *Haemophilus vaginalis*. (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JUNIOR, 2000).

As preparações farmacêuticas vaginais são tamponadas com pH ácido em torno de 4,5, semelhante ao pH da vagina normal. Essa acidez inibe a maioria dos

organismos patogênicos e, ao mesmo tempo, proporciona um ambiente favorável para uma eventual re-colonização da mucosa vaginal pelos *Lactobacillus* spp, produtores de ácidos de ocorrência natural na vagina (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JUNIOR, 2000).

Os cremes são definidos como emulsões líquidas viscosas ou semi-sólidas do tipo água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A). Podem ser preparadas de duas maneiras: por incorporação e por fusão. A escolha do método usado em uma determinada preparação depende basicamente da natureza dos seus compostos. No método de incorporação, os componentes do creme são misturados por vários meios (em almofariz ou com espátula em uma placa de vidro ou mármore), até obtenção de uma preparação uniforme. Já no método de fusão, todos os componentes da fase oleosa ou apolar (fase A) são fundidos/aquecidos a uma temperatura de aproximadamente 70°C; na fase B (fase polar), composta de líquidos, promove-se o aquecimento à mesma temperatura; em seguida misturam-se ambas as fases, na mesma temperatura, evitando-se a precipitação de compostos. As substâncias termolábeis ou os componentes voláteis devem ser acrescentados por último, quando a temperatura da mistura for suficientemente baixa para não provocar decomposição ou volatilização de tais substâncias (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JUNIOR, 2000; FONSECA; PRISTA, 1984).

Na preparação de um creme há de se considerar as fases oleosa e aquosa. Na fase aquosa ocorre a presença de um emulgente (aniônico, catiônico, não-iônico ou anfotérico), por vezes, a própria fase gordurosa pode apresentar poder emulsivo, como acontece com a lanolina que emulsiona a água no óleo. A escolha do

emulgente é extremamente importante, lembrando que o equilíbrio hidrófilo – lipófilo (EHL) é uma propriedade aditiva, podendo eleger-se dois ou mais emulsivos de sinais contrários, desde que a sua mistura proporcione o EHL adequado à emulsão (DE MELO, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

Foram realizadas cinco coletas (dezembro de 2004, março, maio e outubro de 2005 e abril de 2006) do material botânico, *Lippia sidoides* Cham., cultivado na Horta medicinal do Centro de Treinamento de Carpina - CETREINO - município de Carpina –PE. Todas as coletas ocorreram no período da manhã.

Inicialmente, coletou-se a planta inteira (raiz, caule, folha e flor), a qual foi deixada para secar ao ar livre, sem incidência de luz solar, à temperatura ambiente (28 – 30 °C). Após a secagem, suas partes foram separadas manualmente, trituradas em moinho elétrico e acondicionadas em depósitos de vidro com tampa. Este material serviu para realização de testes preliminares de atividade, para seleção da parte mais ativa da planta.

As demais coletas destinaram-se à obtenção do material da parte selecionada para realização de testes complementares e preparação do creme. Ao material coletado foi dispensado o mesmo tratamento descrito acima.

Foram preparadas exsiccatas do espécime estudado, que se encontram depositadas no Herbário IPA, do Instituto de Pesquisas Agronômicas do Estado de Pernambuco, sob o N° 70.207.

4.2 Microorganismos-teste

Linhagens de *Candida* spp foram obtidas no Laboratório Municipal de Saúde Pública do Recife (LMSPR) e na Unidade de Laboratório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (ULAB-HC), isoladas de material de secreção vaginal e posteriormente identificadas, no Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos (LFEA) do Departamento de Antibióticos da UFPE. As linhagens de *Candida* spp foram mantidas sob refrigeração e transferidas periodicamente para tubos de ensaio contendo o meio de cultura ágar Sabouraud, assegurando, dessa forma, a viabilidade das mesmas para a realização dos experimentos.

4.2.1 Identificação dos Isolados Clínicos

Sempre que possível, os isolados clínicos de *Candida* spp foram identificados, a nível de espécie, utilizando-se o meio cromogênico CHROMagar *Candida*[®] (PROBAC do Brasil) que permite o isolamento e diferenciação da maioria das espécies de *Candida*.

4.3 Obtenção dos Extratos Vegetais

Extratos brutos das diferentes partes da planta (raiz, caule, folha e flor), foram obtidos com etanol P.A. (marca Vetec) e etanol a 70%, na proporção de 1g do material vegetal para 5 mL de solvente (1:5, peso-volume), por maceração em repouso durante seis dias à temperatura ambiente (28–30°C), ao abrigo da luz. Após

esse período, os extratos foram filtrados em papel de filtro, procedendo-se uma segunda extração, para garantir o máximo de obtenção dos princípios ativos. Após filtração, o extrato foi evaporado em Rota-Evaporador (Janke & Kunkel Ika-Werk) à temperatura constante de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 4.1).

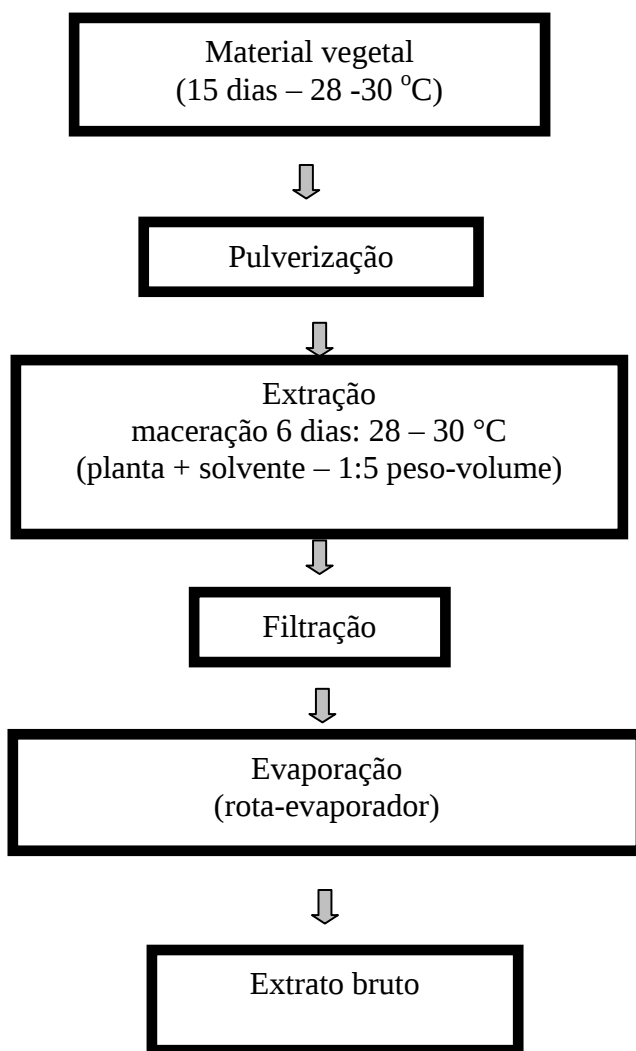


Figura 4.1 – Representação esquemática da obtenção dos extratos vegetais

4.4 Avaliação da Atividade Antifúngica “*In Vitro*” dos Extratos Brutos

Todos os procedimentos envolvendo a obtenção dos extratos vegetais e testes de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos (LFEA) do Departamento de Antibióticos da UFPE.

4.4.1 Seleção do Extrato Mais Ativo

Preliminarmente, foi realizado um *screening* da atividade antifúngica dos extratos etanólico e hidroalcoólico de raiz, caule, folha e flor de *Lippia sidoides* Cham. contra seis isolados clínicos de *Candida* spp, para seleção do extrato com melhor atividade. O extrato selecionado foi testado frente a 45 linhagens de *Candida* spp, isoladas de secreção vaginal.

A atividade antifúngica *in vitro* foi avaliada, qualitativamente, de acordo com o método de difusão em disco de papel, descrito por Bauer et al. (1966), utilizando-se uma concentração de 2.000 µg/disco e quantitativamente, pela determinação da Concentração Mínima Inibitória – CMI do extrato mais ativo (GROVE; RANDALL, 1955; LORIAN, 1986).

Como padrão de comparação dos resultados, foi utilizado o antifúngico Fluconazol, cedido pela Farmácia Escola do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

4.4.2 Teste de Difusão em Disco de Papel

A técnica de difusão em disco de papel se baseia na inibição do crescimento do microrganismo, com conseqüente formação de um halo de inibição, na superfície do meio de cultura sólido semeado com o microrganismo-teste, ao redor de um disco de papel de filtro impregnado com a substância em estudo (Figura 4.2). Este método informa se o microrganismo é sensível ou resistente a uma determinada substância numa concentração conhecida (KONEMAN, et al., 2001).

Discos de papel (Whatman nº 2) com 6 mm de diâmetro (LORIAN, 1986) foram impregnados, assepticamente, com 20 µL de uma solução a 100.000 µg/mL dos extratos brutos em estudo, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), ficando cada disco a uma concentração de 2.000 µg.

Para efeito de comparação dos resultados, foi utilizada uma solução a 2.500 µg/mL do antifúngico Fluconazol, ficando cada disco a uma concentração de 25 µg (BARRY et al., 2002).

Os testes foram realizados em triplicata, expressando-se os resultados em milímetros (mm), pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição obtidos, calculando-se o desvio padrão.

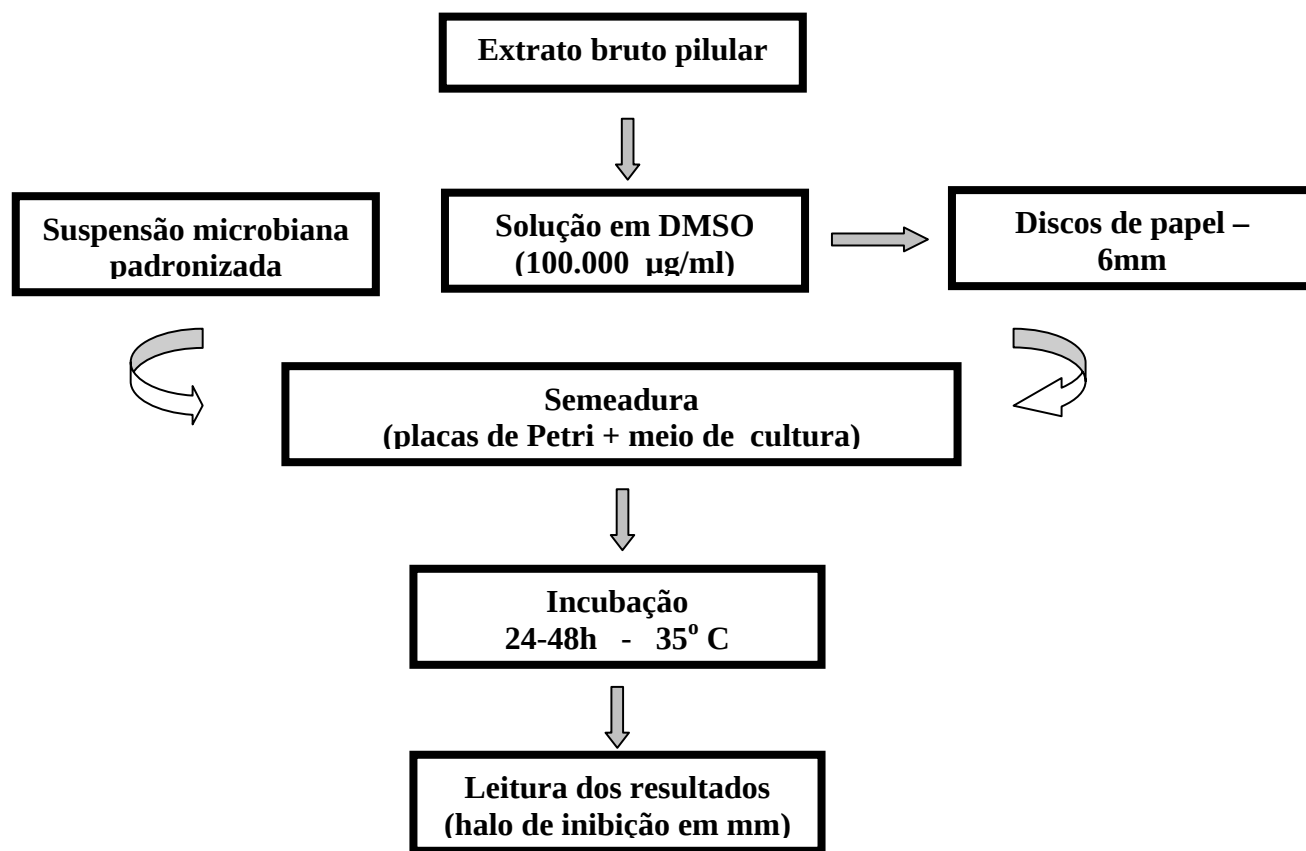


Figura 4.2 – Representação esquemática do teste de difusão em disco de papel

4.4.2.1 Meio de Cultura

Para manutenção das linhagens de *Candida* spp, para o teste de difusão em disco e para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), utilizou-se o meio ágar Sabouraud (SAB) - Fabricante: Merck, preparado segundo as instruções do fabricante.

4.4.2.2 Padronização dos Inóculos

Os inóculos fúngicos foram obtidos a partir de culturas recentes (cultivo de 24 horas). As suspensões foram preparadas com soro fisiológico e padronizadas com turbidez equivalente a do tubo nº 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias).

4.4.2.3 Semeio

As suspensões fúngicas padronizadas foram semeadas pela técnica de *spread plate* no meio de cultura especificado no sub-item 4.4.2.1, contido em placas de Petri, com *swabs* estéreis, e os discos de papel, previamente impregnados com os extratos brutos e padrão de referência, foram colocadas sobre a superfície dos meios semeados.

4.4.2.4 Incubação e Leitura

As placas semeadas foram incubadas em estufa BOD a uma temperatura de 35°C por um período de 24 horas. Após o período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro dos halos de inibição do crescimento fúngico, formados em volta dos discos, utilizando-se para isso, uma régua graduada em milímetros (mm). Foram considerados positivos os halos com diâmetro iguais ou superiores a 10 mm.

4.4.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CMI

Para determinação da CMI, foram selecionadas as linhagens que apresentaram halos de inibição iguais ou superiores a 14mm de diâmetro no teste de difusão em disco de papel (sub-item 4.4.2).

A CMI do extrato bruto selecionado foi determinada pelo método de diluições seriadas em meio sólido (GROVE; RANDALL, 1955; LORIAN, 1986). Alíquotas de diferentes volumes (1,0 mL; 0,5 mL; 0,25 mL; 0,12 mL; 0,06 mL; 0,03 mL e 0,015 mL) de uma solução a 20.000 µg/mL do extrato bruto, foram colocadas em placas de Petri esterilizadas, às quais foi adicionado o meio de cultura ágar Sabouraud fundido, em quantidade suficiente para completar 10 mL, homogeneizando-se em seguida. Após solidificação do meio, as placas foram semeadas em estrias, com suspensões padronizadas dos inóculos fúngicos (sub-item 4.4.2.2) e incubadas em estufa BOD a 35°C por um período de 24 horas (Figura 4.3).

Como controle positivo, uma placa contendo apenas o meio de cultura foi semeada e incubada em idênticas condições, assegurando assim a viabilidade dos microrganismos.

Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas, considerando-se como valor de CMI, a menor concentração do extrato bruto selecionado que impediu crescimento visível do microrganismo semeado.

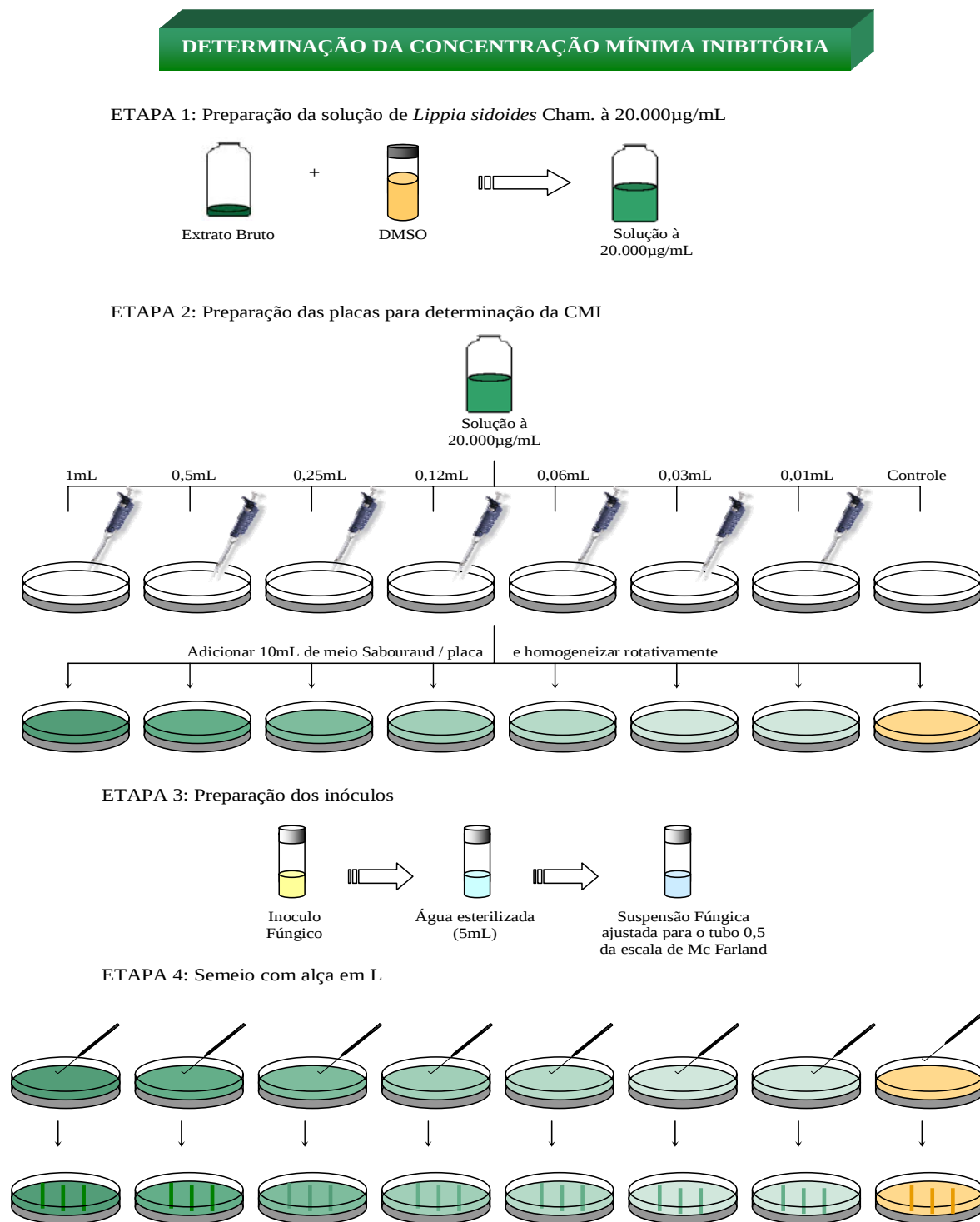


Figura 4.3 - Representação esquemática da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

4.5 Avaliação da Toxicidade

Foi determinada a toxicidade do extrato que apresentou melhor atividade antifúngica no teste de difusão em disco de papel.

Os ensaios para avaliação da toxicidade foram realizados no Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos albino *Swiss* fêmeas (*Mus musculus*), com faixa etária de 60 dias e entre 25-35 g de peso corpóreo, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e condições controladas de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas cada).

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE, processo n ° 23076.015542/2004-31.

4.5.2 Estudo Toxicológico Agudo

A investigação da toxicidade aguda foi feita de acordo com a metodologia preconizada por Karber e Behrens (1964), que determina a realização dos ensaios em duas etapas: preliminar (ensaios preliminares) e definitiva (ensaios definitivos).

4.5.2.1 Toxicidade Aguda – Ensaios Preliminares

Os ensaios preliminares permitem determinar a maior dose que não apresenta letalidade (D_1) e a menor dose capaz de provocar a morte de 100% dos animais (D_2). Esta etapa representa uma avaliação estimativa das propriedades tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações acerca dos riscos resultantes de uma exposição de curta duração (DI STASI, 1996).

Os animais foram divididos em grupos contendo seis camundongos ($n=6$) cada. Estes foram previamente marcados, pesados e privados de ração por 12 horas antes da realização dos ensaios, recebendo água *ad libitum* (Figura 4.4).

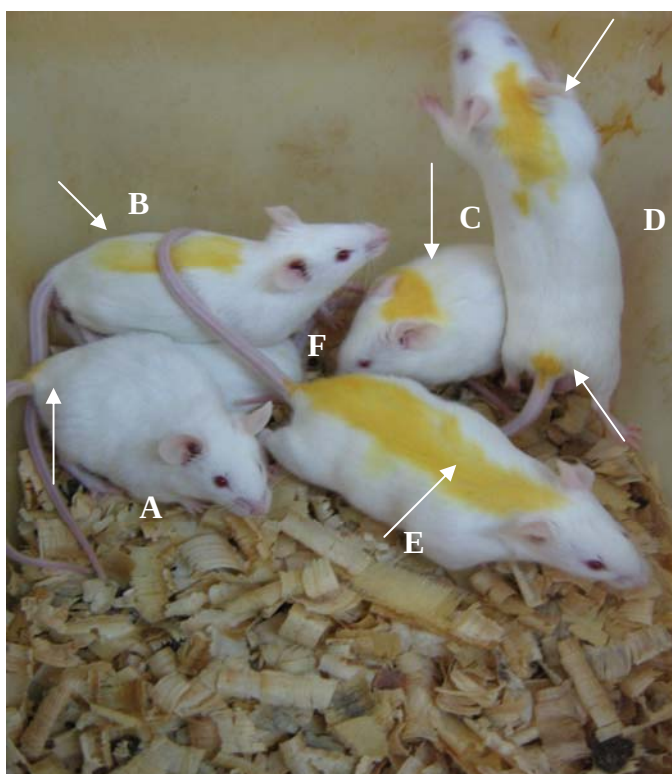


Figura 4.4 – Grupo de camundongos albino Swiss fêmeas (*Mus musculus*) utilizados no teste de toxicidade aguda: A) Rabo marcado; B) Lombo marcado; C) Cabeça marcada; D) Cabeça e rabo marcados; E) Cabeça, rabo e lombo marcados; F) Sem marca.

Inicialmente foram administradas doses do extrato selecionado (sub-item 4.4.1) em concentrações crescentes seguindo uma progressão geométrica de razão 2, as quais variaram entre 500 – 2.000 mg/kg de peso corpóreo, por via intraperitoneal (Figura 4.5).

Posteriormente as doses foram ajustadas para a definição de D₁ (maior dose que não apresenta letalidade) e D₂ (menor dose capaz de provocar a morte de 100% dos animais).



Figura 4.5 – Aplicação intraperitoneal do extrato bruto selecionado de *Lippia sidoides* Cham., diluído em solução fisiológica, em camundongo albino Swiss fêmeas (*Mus musculus*).

Na preparação das doses, o extrato foi pesado em balança analítica (CELTAC – FA 2104 N) e diluído em solução fisiológica (0,9% de NaCl, p/v), utilizando-se para isso, 2-3 gotas dos tensioativos: Tween 80 e óleo de girassol. O grupo controle recebeu apenas solução fisiológica e os tensioativos, nas mesmas quantidades.

Nos primeiros 60 minutos após a administração da solução do extrato, foram observados parâmetros tais como: sinais de toxicidade de caráter geral,

efeitos sobre deambulação, reações comportamentais, alterações da frequência respiratória e número de óbitos. Os animais permaneceram em observação durante 48 horas.

4.5.2.2 Toxicidade Aguda – Determinação da DL₅₀

Após definição de D₁ e D₂ nos ensaios preliminares, passou-se à etapa definitiva com aplicação de doses crescentes do extrato bruto selecionado (sub-item 4.4.1), com a finalidade de se determinar a dose letal média (DL₅₀), representada pela fórmula:

$$DL_{50} = Df - \sum(a.b) / n$$

Onde,

Df = dose mínima capaz de matar todos os animais;

a = diferença entre duas doses consecutivas administradas;

b = média de animais mortos entre duas doses consecutivas;

n = número de animais por lote

4.6 Estudo Farmacotécnico

4.6.1 Obtenção do Creme Vaginal

Foi preparado um creme tipo emulsão óleo em água (O/A). O método utilizado foi o de fusão, no qual, os componentes foram misturados após serem fundidos/aquecidos e, posteriormente, resfriados sob agitação constante até

obtenção do creme. A incorporação do extrato bruto selecionado foi feita por último, quando a temperatura da mistura se encontrava suficientemente baixa, para evitar possível decomposição ou volatilização de alguns de seus componentes (ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JUNIOR, 2000; FONSECA; PRISTA, 1984).

Foram testadas sessenta formulações centesimais, variando-se a quantidade dos componentes da fase hidrofílica ou dispersante e da fase lipofílica ou dispersa. A melhor formulação encontrada foi utilizada para obtenção do creme vaginal à base do extrato bruto selecionado de *Lippia sidoides* Cham.

4.6.1.1 Componentes da Fase Oleosa (Lipofílica) ou Apolar

☀ Ácido Esteárico

☀ Álcool Cetoestearílico

☀ Glicerina

4.6.1.2 Componentes da Fase Aquosa (Hidrofílica) ou Polar

☀ Trietanolamina

☀ Água Destilada

4.6.1.3 Técnica Preparatória do Creme Vaginal

Os componentes da fórmula foram pesados em balança analítica e medidos em provetas nas quantidades necessárias para cada formulação centesimal testada, e reservados.

Em um béquer de 100 mL foram aquecidos os constituintes lipossolúveis (fase lipofílica) à 70°C, utilizando-se uma placa de aquecimento. Em outro béquer foram colocados os constituintes hidrossolúveis (fase hidrofílica) e igualmente aquecidos à mesma temperatura.

A fase lipofílica foi colocada em um gral de porcelana, à qual foi adicionada lentamente a fase hidrofílica, homogeneizando-se energeticamente com movimentos alternados de pilação e rotação, tendo-se o cuidado de minimizar a aeração da mistura.

Quando a mistura atingiu a temperatura de aproximadamente 35°C, o extrato bruto selecionado (sub-item 4.4.1) de *Lippia sidoides* Cham foi adicionado, mantendo-se a homogeneização constante até consistência final, obtendo-se, desta forma, um creme de coloração verde oliva brilhante (DE MELO, 2002).

Os estudos farmacotécnicos para formulação do creme vaginal foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Fitomedicamentos e Fitocosméticos (LABDEFF), CECINE – PROEXT da Universidade Federal de Pernambuco.

4.7 Avaliação da Atividade Antifúngica do Produto Acabado

A atividade antifúngica *in vitro* do creme vaginal à base de *Lippia sidoides* Cham., formulado conforme descrito no sub-item 4.6.1.3, foi avaliada qualitativamente pela técnica do poço em camada dupla (*well*) (GROOVE; RANDALL, 1955) e pela técnica do ágar *spot test* (GAGNON et al., 2004; TOURÉ et al., 2003), utilizando-se, respectivamente, uma concentração de 2.000 µg/poço e de 2.000 µg/spot. Para realização dos ensaios, foram selecionadas duas linhagens de *Candida* spp que apresentaram os maiores halos de inibição no teste de difusão em disco.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição obtidos nas três placas.

4.7.1 Padronização dos Inóculos Fúngicos

Os inóculos fúngicos foram padronizados conforme descrito no sub-item 4.4.2.2.

4.7.2 Técnica do Poço em Camada Dupla (*Well*)

4.7.2.1 Preparação das Placas de Petri

Foi utilizado o meio de cultura ágar Sabouraud (MERCK), preparado segundo as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. O meio foi liquefeito e distribuído em placas de Petri (cerca de 10 mL)

previamente esterilizadas, para obtenção da camada base e deixado solidificar em superfície plana. A seguir foram adicionados 5,0 mL do mesmo meio fundido e resfriado a uma temperatura aproximada de 50°C, adicionado de 1,0 mL do inóculo, para formar a camada *seed* (sementeira). Após solidificação, as placas foram colocadas em refrigerador por 15 minutos, para uma rápida solidificação da camada *seed*.

Após a solidificação, foram perfurados, em câmara de fluxo laminar, poços de 6 mm de diâmetro, com auxílio de uma cânula de vidro esterilizada. Em seguida o ágar recortado foi removido com alça de platina flambada em bico de Bunsen.

4.7.2.2 Diluição do Creme

Em balança analítica foram pesadas 1.022,6 mg do creme vaginal, formulado no sub-item 4.6.1.3, equivalente a 34 mg do extrato bruto selecionado (sub-item 4.4.1) de *Lippia sidoides* Cham., o qual foi diluído, assepticamente, em 1 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma solução a uma concentração de 34.000 µg/mL. Desta solução, foram transferidos 60 µL (equivalente a 2.000 µg do extrato bruto) para cada poço.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos, para difusão do agente antimicrobiano e em seguida incubadas a 35 °C durante 24 horas.

4.7.3 Técnica do Ágar *Spot Test*

O teste foi realizado em placas de Petri contendo 10 mL de ágar Sabouraud semeado, pela técnica do *spread plate*, com a suspensão padronizada das linhagens de *Candida* spp selecionadas.

Sobre a superfície do meio semeado foram colocadas 60 mg do creme vaginal, formulado no sub-item 4.6.1.3, equivalentes a 2.000 µg do extrato bruto selecionado (sub-item 4.4.1). As placas contendo os *spots* foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida incubadas a 37°C por 18-24 horas.

4.8 Determinação das Classes de Compostos

A prospecção dos diversos constituintes químicos do extrato bruto selecionado (sub-item 4.4.1) de *Lippia sidoides* Cham. (com exceção de protídios, lipídios e outras substâncias macromoleculares) foi realizada com base em técnicas de caracterização que permitem detectar a presença ou ausência de determinadas classes de compostos.

Os grupos de constituintes analisados estão listados na Tabela 4.1 (MATOS, 1997). A determinação das classes de compostos foi realizada com o extrato bruto selecionado no sub-item 4.4.1.

Os ensaios fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Tabela 4.1 - Reagentes de complexação utilizados na prospecção da constituição química do extrato bruto selecionado de *Lippia sidoides* Cham.

CLASSES DE COMPOSTOS	REAGENTES DE COMPLEXAÇÃO	REAÇÕES OBSERVADAS (TESTE POSITIVO)
FENÓIS	FeCl ₃	Cor variável: azul – vermelho
TANINOS PIROGÁLICOS (HIDROLISÁVEIS)	FeCl ₃	Ppt. escuro: cor azul
TANINOS FLOBABÊNICOS (CONDENSADOS)	FeCl ₃	Ppt. escuro: cor verde
ANTOCIANINAS E ANTOCIANIDINAS	Acidular a pH 3, alcalinizar a pH 8,5 e a pH 11	Ácido (pH 3) – vermelha alcalino (pH 8,5) – lilás alcalino (pH 11) – azul
FLAVONÓIS E XANTONAS	Alcalinizar a pH 11	Coloração amarela
CHALCONAS E AURONAS	Acidular a pH 3, alcalinizar a pH 11	Ácido (pH 3) – vermelho; Alcalino (pH11): verm. púrpura
FLAVANONÓIS	Alcalinizar a pH 11	Coloração vermelho - laranja
LEUCOANTOCIANIDINAS	Acidular com HCl a pH 1-3	Coloração vermelha
CATEQUINAS	Acidular com HCl a pH 1-3	Coloração pardo-amarela
FLAVANONAS	Alcalinizar com NaOH a pH 11	Coloração vermelho laranja
ALCALÓIDES	Reagentes:Hagen, Mayer e Dragendorff (meio ácido)	Precipitado floculoso
BASES QUATERNÁRIAS	Acidular o meio	Precipitado floculoso
QUINONAS	Sol. etérea, adicionar NH ₄ OH 6N	Coloração vermelha na fase aquosa alcalina
TRITERPENÓIDES	Clorofórmio, Anidrido acético, Na ₂ SO ₄ , H ₂ SO ₄	Coloração pardo até vermelha
ESTERÓIDES	Clorofórmio, anidrido acético, Na ₂ SO ₄ e H ₂ SO ₄	Coloração azul evanescente até verde permanente
SAPONINAS	Água destilada: 2 a 3 ml	Formação de espuma após agitação (2 min.)
ÁCIDOS FIXOS FORTES	NH ₄ OH; NaOH 1 N; reagente de Nesler	Coloração marrom no frasco que contém NaOH
CUMARINAS	KOH 1N. Radiação UV	Fluorescência azulada forte

4.9 Análise Cromatográfica

Visando comprovar a presença de timol, composto fenólico com reconhecida atividade antibacteriana e antifúngica (constituintes majoritários de *Lippia sidoides* Cham.), conforme relatado por diversos autores (CARVALHO et al., 1998; CRAVEIRO et al., 1981; LEMOS et al., 1990, 1992; PASCUAL et al., 2001), foram realizadas análises cromatográficas do extrato bruto selecionado no sub-item 4.4.1, empregando-se placas de sílica F254 Merck, eluída no sistema tolueno/clorofórmio (9,5:0,5). A revelação dos compostos químicos foi feita através da luz ultravioleta de comprimento de onda variando de 254 a 366nm. (HARBORNE, 1982; WAGNER, 1996).

4.10 Bioautograma

O teste de bioautografia foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Romeiro (2001). Este ensaio permite comparar a atividade do extrato estudado, através de revelação biológica com a do Timol, referido, por diversos autores, como o principal responsável pela atividade antifúngica de *Lippia sidoides* Cham.

O ensaio foi realizado em duplicata, utilizando-se uma das linhagens de *Candida* spp que apresentou o maior halo de inibição no teste de difusão em disco.

Em placas de cromatografia em camada delgada (15 x 5 cm), foram aplicados 5 µL de uma solução a 200.000 µg/mL do extrato bruto selecionado (sub-item 4.4.1) e

5 µL de uma solução de Timol a 80.000 µg/mL (obtendo-se uma concentração de 1.000 µg do extrato e 400 µg de Timol, no ponto de aplicação). As placas foram submetidas ao sistema eluente tolueno/clorofórmio (95:5). Após secagem, as placas cromatografadas foram colocadas em placas de Petri e sobre elas verteu-se o meio de cultura agar Sabouraud, contendo a suspensão padronizada da linhagem de *Candida* spp selecionada (1 mL de suspensão para 5 mL de meio). As placas foram incubadas a 35°C, em estufa BOD, até nítido crescimento do microrganismo (48 h), para observação da presença ou não de halos de inibição.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e Identificação dos Isolados Clínicos

Foram obtidas 45 linhagens de *Candida* spp, isoladas de secreção vaginal, das quais, 32 foram identificadas como *Candida albicans* (71,1%), cinco como *Candida tropicalis* (11,1%), uma *Candida krusei* (2,2%) e sete não foram identificadas a nível de espécie (15,6%) (Figura 5.1).

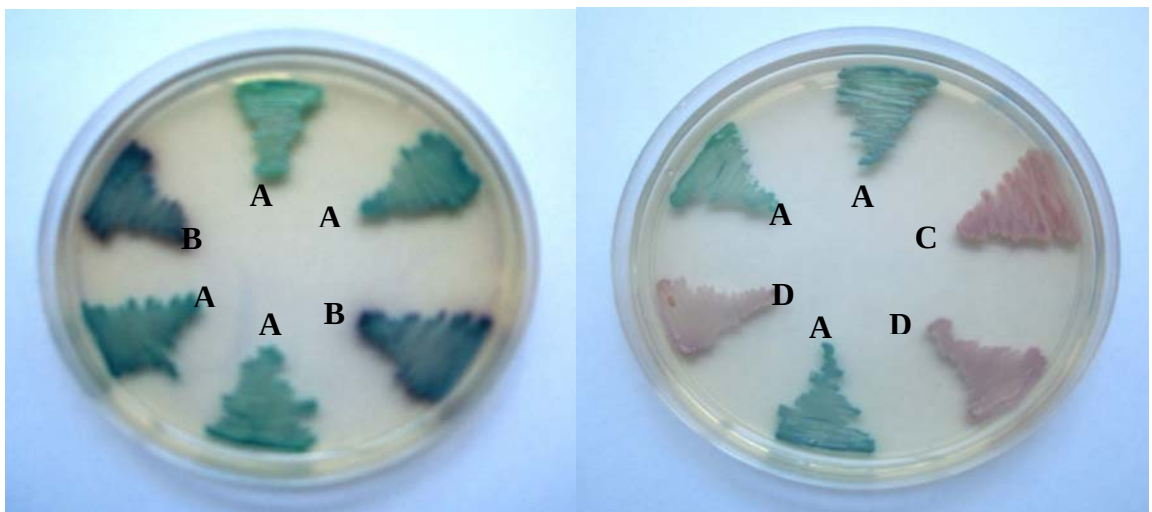


Figura 5.1 – Identificação de espécies de *Candida* em meio CHROMagar Candida®: A) *Candida albicans*; B) *Candida tropicalis*; C) *Candida krusei*; D) *Candida* sp.

A grande predominância de *C. albicans* entre os isolados estudados, coincide com as afirmações de Galle e Gianinni (2004), segundo os quais, esta espécie é responsável por 84% dos casos de candidíase vaginal.

Da mesma forma, Azzam et al. (2002) estudando vulvovaginites causadas por *Candida* spp e *Trichomonas vaginalis* em mulheres sexualmente ativas, afirmam ter encontrado 87% de *C. albicans* nos casos positivos de candidíase vulvovaginal (CVV).

Buchta e Spacek (2004) encontraram *C. albicans* presente em 88,5% dos casos de candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) em pacientes do Hradec Kralove Faculty Hospital, no período de 1995-2002. Dentre as espécies Não-*C. albicans*, relatam 4,9% de *C. glabrata* e 3,1% de *Candida krusei*.

A identificação de espécimes de *Candida tropicalis* (11,1%) e *Candida krusei* (2,2%), usando o meio CHROMagar Candida® também vem de encontro a quanto referido por Eyler, Pierson e Reed (1996) que relatam haver encontrado percentuais de 5,3% e 2,6% de ocorrência destas espécies, respectivamente, utilizando o meio Diamond's modificado.

As linhagens estudadas, com seus respectivos laboratórios de origem, estão listadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Linhagens de isolados clínicos de *Candida* spp, obtidos de secreção vaginal.

Nº	Espécie	Origem
01	<i>Candida albicans</i>	ULAB-HC
02	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
03	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
04	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
05	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
06	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
07	<i>Candida albicans</i>	ULAB-HC
08	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
09	<i>Candida</i> sp	LMSPR
10	<i>Candida</i> sp	LMSPR
11	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
12	<i>Candida</i> sp	LMSPR
13	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
14	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
15	<i>Candida tropicalis</i>	LMSPR
16	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
17	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
18	<i>Candida tropicalis</i>	LMSPR
19	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
20	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
21	<i>Candida tropicalis</i>	LMSPR
22	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
23	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
24	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
25	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
26	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
27	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
28	<i>Candida</i> sp	LMSPR
29	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
30	<i>Candida</i> sp	LMSPR
31	<i>Candida krusei</i>	LMSPR
32	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
33	<i>Candida</i> sp	LMSPR
34	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
35	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
36	<i>Candida tropicalis</i>	LMSPR
37	<i>Candida</i> sp	LMSPR
38	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
39	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
40	<i>Candida tropicalis</i>	LMSPR
41	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
42	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
43	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
44	<i>Candida albicans</i>	LMSPR
45	<i>Candida albicans</i>	LMSPR

5.2 Obtenção dos Extratos Brutos

O rendimento dos extratos brutos, etanólico e hidroalcoólico, obtido das diferentes partes da planta encontra-se discriminado na Tabela 5.2.

Os extratos da raiz e caule foram evaporados à secura, entretanto, devido ao alto teor de óleo contido nas folhas e flores, tais extratos não chegaram à secura, sendo concentrados até uma consistência denominada extrato pilular.

Tabela 5. 2 – Rendimento dos extratos brutos, etanólico e hidroalcoólico, das várias partes da planta.

Parte botânica / Solvente	Material botânico (g)	Solvente (mL)	Rendimento (g)
Raiz / Etanol	40	200	2,88
Raiz / Etanol a 70%	89,25	446,25	3,80
Caule / Etanol	200	1000	4,48
Caule / Etanol a 70%	200	1000	1,66
Folha / Etanol	100	500	7,07
Folha / Etanol a 70%	100	500	3,87
Flor / Etanol	50	250	6,42
Flor / Etanol a 70%	50	250	0,47

5.3 Avaliação da Atividade Antifúngica de *Lippia sidoides* Cham.

5.3.1 Testes Preliminares

O ensaio preliminar com os extratos brutos, etanólico e hidroalcoólico, das diferentes partes da planta mostrou que o extrato etanólico bruto pilular da folha e o extrato etanólico bruto pilular da flor de *Lippia sidoides* Cham. foram os que apresentaram os melhores halos de inibição para as seis linhagens de *Candida albicans* testadas (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Atividade antifúngica dos extratos brutos, etanólico e hidroalcoólico, de diferentes partes de *Lippia sidoides* Cham., frente a isolados clínicos de *Candida albicans* em meio ágar Sabouraud (Halo de inibição em mm).

LINHAGEM	EXTRATOS							
	ETANÓLICO				HIDROALCOÓLICO			
	Raiz	Caule	Folha	Flor	Raiz	Caule	Folha	Flor
01 – <i>C. albicans</i>	15	00	20	20	00	12	20	18
02 - <i>C. albicans</i>	12	10	21	20	00	00	18	17
03 - <i>C. albicans</i>	10	09	26	24	00	10	20	20
04 - <i>C. albicans</i>	00	00	22	21	00	00	18	17
05 - <i>C. albicans</i>	12	10	25	23	00	10	20	18
06 - <i>C. albicans</i>	12	09	22	19	00	00	20	15

O extrato etanólico bruto pilular da folha de *Lippia sidoides* Cham. apresentou maior atividade antifúngica, com halos superiores a 20 mm de diâmetro para todas as linhagens de *Candida albicans* testadas, sendo, desta forma, o extrato selecionado para a realização de todos os testes descritos na metodologia.

5.3.2 Atividade Antifúngica do Extrato Etanólico Bruto Pilular de Folhas de *Lippia sidoides* Cham.

O extrato etanólico bruto pilular da folha de *Lippia sidoides* Cham., selecionado no teste preliminar, apresentou atividade para os 45 (100%) isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida* testadas, com halos de inibição entre 12 e 20 mm de diâmetro (Tabela 5.4).

Com o Fluconazol, usado como padrão de comparação, 8 (17,7%) das 45 linhagens de *Candida* spp não foram inibidas; 16 (35,5%) apresentaram halos de inibição entre 11 e 20 mm de diâmetro; 6 (13,3%), halos de 21 a 30 mm e 15 (33,3%), halos acima de 31 mm (Tabela 5.4).

A presença de colônias resistentes ao Fluconazol, *in vitro*, ratifica as afirmações de Coleman et al. (1998) que chama a atenção para o surgimento de linhagens de *C. albicans* com susceptibilidade diminuída a esta droga, *in vivo* e *in vitro*, em candidíases recorrentes.

Observou-se uma maior sensibilidade de *C. albicans*, quando comparada com *C. krusei* e *C. tropicalis*, confirmando quanto relatado por Coleman et al. (1998), segundo o qual é comum, especialmente em candidíases recidivas, a substituição de *C. albicans* por espécies não-*C. albicans*, mais resistentes, como *C. krusei* e *C. tropicalis*, entre outras.

Tabela 5.4 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e fluconazol, frente a isolados clínicos de *Candida* spp em meio ágar Sabouraud.

MICRORGANISMO	HALOS DE INIBIÇÃO (mm)	
	EXTRATO (X ± δ)	FLUCONAZOL (X ± δ)
01 - <i>Candida albicans</i>	16 ± 0	0 ± 0
02 - <i>Candida albicans</i>	19 ± 0	0 ± 0
03 - <i>Candida albicans</i>	12,66 ± 0,58	0 ± 0
04 - <i>Candida albicans</i>	13,66 ± 0,58	19,33 ± 1,15
05 - <i>Candida albicans</i>	18,33 ± 0,58	0 ± 0
06 - <i>Candida albicans</i>	17 ± 1,73	18,50 ± 0,50
07 - <i>Candida albicans</i>	17 ± 0	0 ± 0
08 - <i>Candida albicans</i>	14 ± 1	31,33 ± 1,53
09 - <i>Candida</i> sp	12,66 ± 0,58	14,16 ± 0,29
10 - <i>Candida</i> sp	15,33 ± 0,58	11,66 ± 0,57
11 - <i>Candida albicans</i>	20,33 ± 0,58	38 ± 0
12 - <i>Candida</i> sp	14,66 ± 0,58	0 ± 0
13 - <i>Candida albicans</i>	14,66 ± 0,58	36,66 ± 1,15
14 - <i>Candida albicans</i>	14,66 ± 0,58	41,33 ± 1,15
15 - <i>Candida tropicalis</i>	14,33 ± 0,58	30 ± 0
16 - <i>Candida albicans</i>	17 ± 0	35,33 ± 0,57
17 - <i>Candida albicans</i>	19,33 ± 3,21	20,83 ± 0,76
18 - <i>Candida tropicalis</i>	13 ± 0	36 ± 1,73
19 - <i>Candida albicans</i>	15 ± 0	0 ± 0
20 - <i>Candida albicans</i>	17,33 ± 0,58	38 ± 2
21 - <i>Candida tropicalis</i>	13 ± 1	30 ± 0
22 - <i>Candida albicans</i>	17,66 ± 0,58	38 ± 0
23 - <i>Candida albicans</i>	15,66 ± 1,15	13,66 ± 0,57
24 - <i>Candida albicans</i>	17 ± 0	36,33 ± 2,89
25 - <i>Candida albicans</i>	16,66 ± 0,58	18,66 ± 1,15
26 - <i>Candida albicans</i>	17 ± 1	18,16 ± 0,76
27 - <i>Candida albicans</i>	16,33 ± 1,15	30 ± 0
28 - <i>Candida</i> sp	12 ± 1	14,33 ± 2,52
29 - <i>Candida albicans</i>	14,66 ± 0,58	40 ± 0
30 - <i>Candida</i> sp	12 ± 0	13,66 ± 0,57
31 - <i>Candida krusei</i>	9,33 ± 0,58	0 ± 0
32 - <i>Candida albicans</i>	17,33 ± 0,58	17,66 ± 0,57
33 - <i>Candida</i> sp	12,66 ± 0,58	15 ± 0
34 - <i>Candida albicans</i>	18 ± 0	22,66 ± 0,57
35 - <i>Candida albicans</i>	16,66 ± 1,15	18,83 ± 0,29
36 - <i>Candida tropicalis</i>	12,66 ± 1,15	32 ± 2
37 - <i>Candida</i> sp	15 ± 0	24,83 ± 0,76
38 - <i>Candida albicans</i>	19 ± 0	17,66 ± 0,57
39 - <i>Candida albicans</i>	16,66 ± 0,58	35 ± 0
40 - <i>Candida tropicalis</i>	13,33 ± 0,58	13 ± 0
41 - <i>Candida albicans</i>	16,66 ± 0,58	21,33 ± 0,57
42 - <i>Candida albicans</i>	19,66 ± 0,58	20,33 ± 0,57
43 - <i>Candida albicans</i>	19,66 ± 1,53	40 ± 0
44 - <i>Candida albicans</i>	17,66 ± 0,58	40 ± 0
45 - <i>Candida albicans</i>	17,33 ± 0,58	40 ± 0

X = Média Aritmética; δ = Desvio Padrão

Na figura 5.2 pode-se observar o halo de inibição formado pelo extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. frente a uma linhagem de *Candida albicans*. A figura 5.3 mostra uma linhagem de *Candida albicans* sensível (A) e uma resistente (B) ao Fluconazol (padrão de comparação).



Figura 5.2 – Halo de inibição de uma linhagem de *Candida albicans* formado pelo extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., pelo teste de difusão em disco de papel.

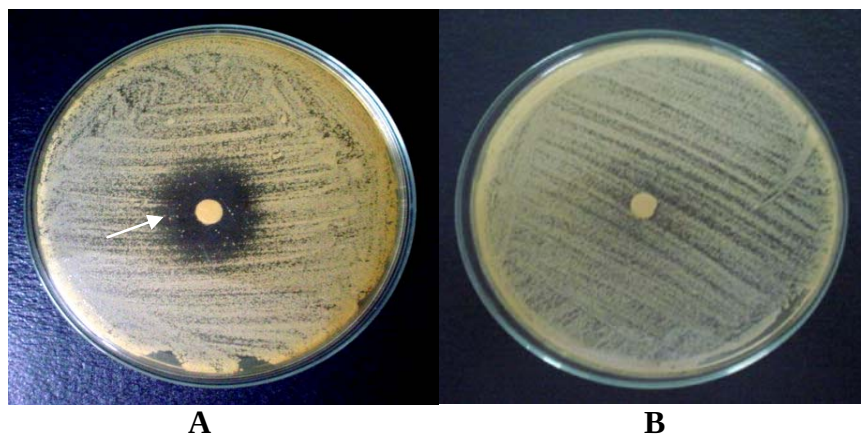


Figura 5.3 – A) Linhagem de *Candida albicans* sensível ao fluconazol, com colônias resistentes dentro do halo de inibição; B) Linhagem de *Candida albicans* resistente ao fluconazol, pelo teste de difusão em disco de papel.

Vale ressaltar, que os halos obtidos com o extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. apresentaram-se límpidos, sem presença de colônias resistentes, observadas nos halos de inibição formados pelo fluconazol em 43,5% das linhagens testadas.

Nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6, pode-se comparar a sensibilidade das linhagens de *Candida* spp testadas, frente ao extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e ao Fluconazol.

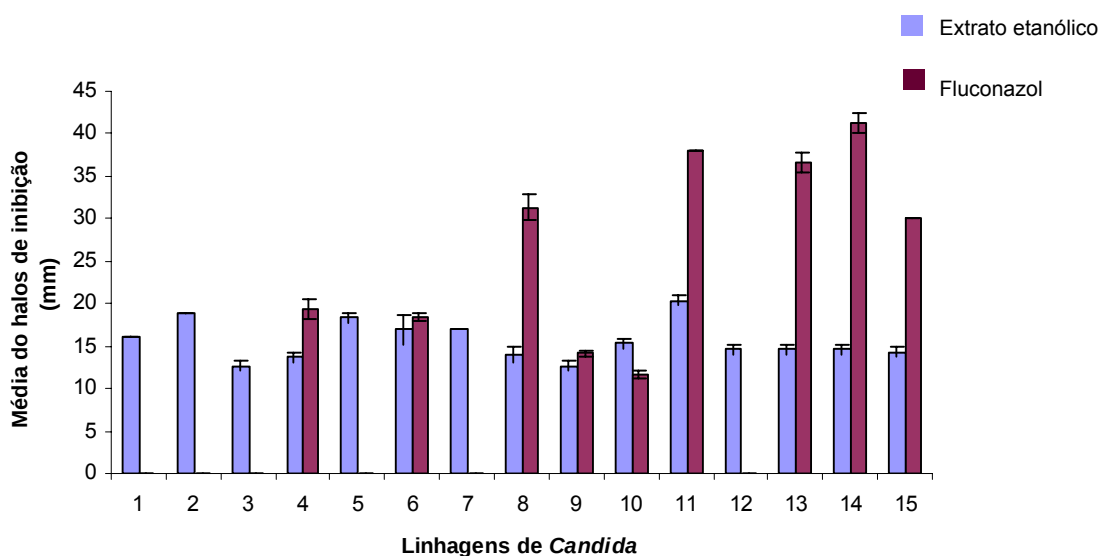


Figura 5.4 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., e do fluconazol, frente às linhagens 1 a 15 de *Candida* spp.

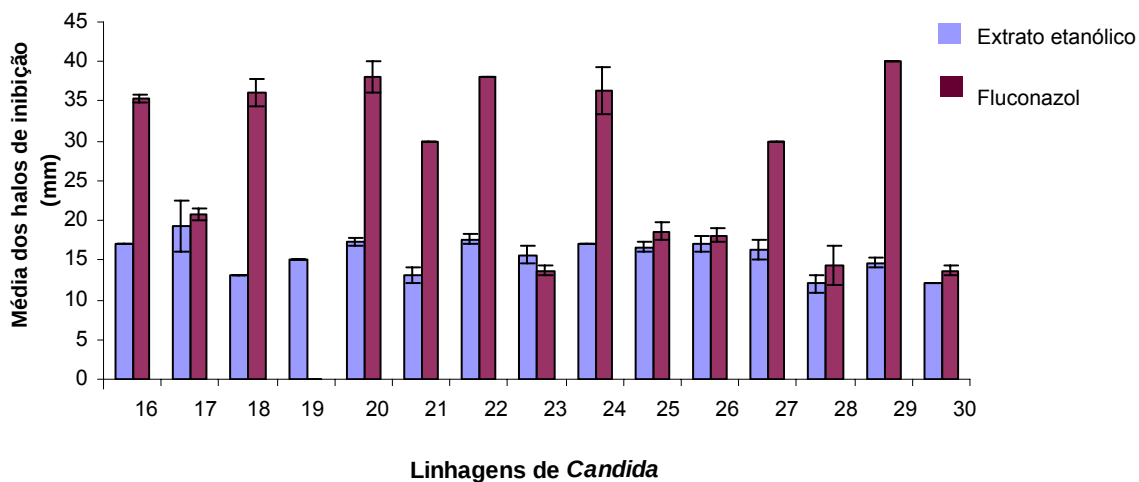


Figura 5.5 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do fluconazol, frente às linhagens 16 a 30 de *Candida* spp.

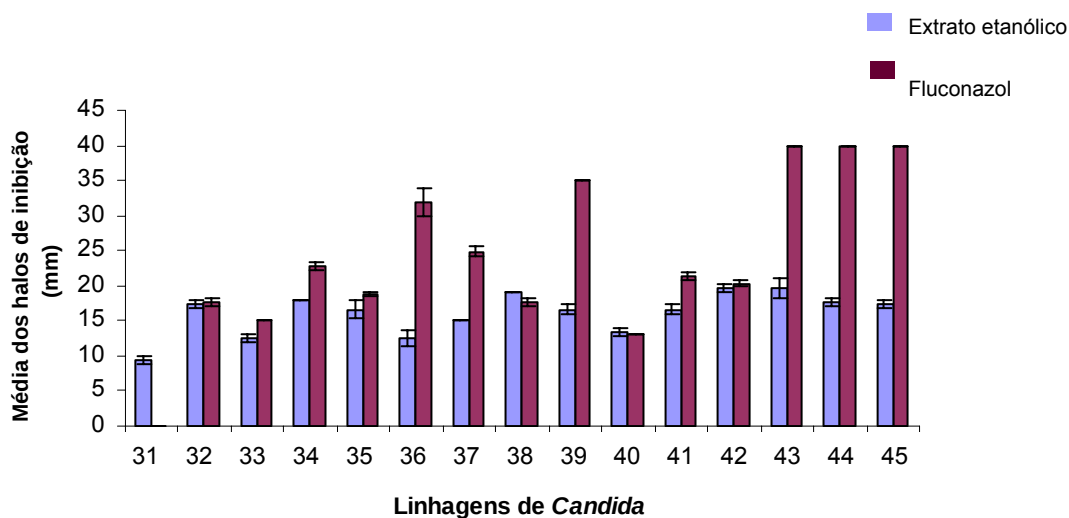


Figura 5.6 – Atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do fluconazol, frente às linhagens 31 a 45 de *Candida* spp.

Estes resultados confirmam as informações de Lorenzi e Matos (2002) que refere uma forte atividade do óleo essencial e do extrato etanólico desta espécie, para *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*, isoladas do fluido vaginal.

5.4 Concentração Mínima Inibitória – CMI

A Concentração Mínima Inibitória para todas as linhagens de *Candida* spp testadas foi de 250 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com Duarte et al. (2005) e Aligiannis et al. (2001), os valores de CMI obtidos neste estudo, permitem classificar o extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. como um forte inibidor de *Candida* spp.

A figura 5.7 mostra as placas contendo diferentes concentrações do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., frente a cinco linhagens de *Candida* spp, apresentando inibição do crescimento de todas as linhagens, até a placa nº. 4, contendo 0,12 mL da solução a 2.000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato.

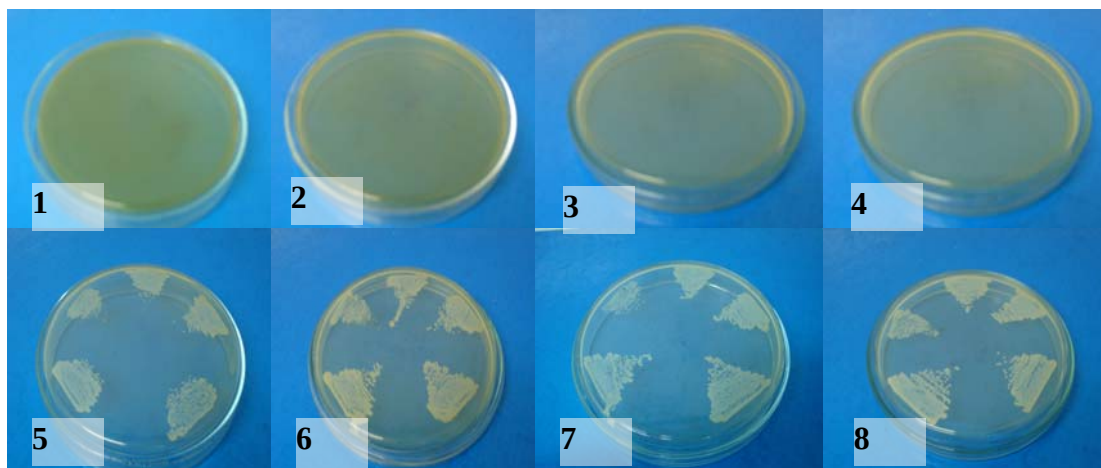


Figura 5.7 - Placas de Petri contendo diferentes concentrações do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., frente a cinco linhagens de *Candida* spp, isoladas de secreção vaginal: 1) 2.000 $\mu\text{g/mL}$; 2) 1.000 $\mu\text{g/mL}$; 3) 500 $\mu\text{g/mL}$; 4) 250 $\mu\text{g/mL}$; 5) 125 $\mu\text{g/mL}$; 6) 62,5 $\mu\text{g/mL}$; 7) 31,2 $\mu\text{g/mL}$; 8) 0,0 $\mu\text{g/mL}$ (controle).

5.5 Avaliação da Toxicidade

Neste estudo foram realizados ensaios preliminares (Tabela 5.5) e definitivos (Tabela 5.6), para a determinação da DL₅₀ do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. em camundongos albino Swiss fêmeas (*Mus musculus*) . A via de administração utilizada foi intraperitoneal. Os efeitos encontrados através das reações comportamentais, demonstraram ação estimulante sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) dos animais testados, com concentrações diversas do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham.

Inicialmente as reações comportamentais com ação estimulante que mais se destacaram, de acordo com as doses administradas, foram: agitação (950, 960, 1.000, 1.335, 1.350 e 2.000 mg/Kg), seguida de reação de fuga (960, 980, 1.300, 1.335 e 1.500 mg/Kg), pilo-ereção (950, 980 e 2.000 mg/Kg), e tremores finos/grosseiros (1.300, 1.335 e 1.500 mg/Kg), as quais perduraram durante toda a fase experimental.

Quanto aos demais efeitos estimulantes sobre o SNC, classificados como acentuados, foram evidenciados: na dose de 950 mg/Kg, movimentos circulares; 980 mg/Kg, ereção de cauda, movimentos esteriotipados e agressividade; 1.300 mg/Kg, convulsão; 1.335 mg/Kg, movimentos estereotipados e circulares; 1.500 mg/Kg, movimentos de vibrissas e 2.000 mg/Kg, exoftalmia.

Tabela 5.5 – Principais reações comportamentais relacionadas às doses administradas por via intraperitoneal, do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., nos ensaios preliminares da avaliação da toxicidade aguda

Ações	Doses				
	950	960	980	2.000	
SN CENTRAL					
<i>Estimulantes</i>					
↑ Frequência respiratória	+	-	-	+	
Agitação	+++	+++	++	+++	
Piloereção	+++	-	+++	+++	
Exoftalmia	++	-	+	+++	
Movimentos estereotipados	+	++	+++	++	
Movimentos circulares	+++	-	++	++	
Movimentos de vibrissas	+	+	+	+	
Convulsão clônica	-	-	-	-	
Convulsão	+	-	-	-	
Tremores finos/grosseiros	++	-	++	++	
Ereção de cauda	+	+	+	++	
Postura de ataque	++	-	++	-	
Agressividade	++	-	+++	-	
Saltos	-	-	-	-	
Reação de fuga	++	+++	+++	++	
<i>Depressores</i>					
Abaixamento trem posterior	+	+	+	+++	
Dispnéia	+	+++	+	++	
↓ Frequência respiratória	-	-	-	++	
Sedação	-	++	-	-	
Prostração	-	++	-	++	
<i>Outros comportamentos</i>					
Alteração de marcha	+++	+++	+++	++	
Contorções abdominais	-	+	+++	-	
Elevação de trem anterior	-	+	-	-	
<i>SN Autônomo</i>					
↑ Excreção fecal	+	+	+	+++	
Espasmos	+	+++	+	+	
Diarréia	-	-	+++	-	
Refluxo	+	+	-	+	
Palidez	+	+	+++	+	
Distensão abdominal	-	-	-	-	
Diurese aumentada	-	-	-	-	
Irritação da conjuntiva	+	+++	-	+	
Espasticidade	-	-	-	++	
Cianose	-	-	-	++	
Edema de focinho	+	-	-	++	

- = sem efeito (ausente em todos os animais do grupo)

+ = efeito leve (presente em 1-2 animais do grupo)

++ = efeito moderado (presente em 3-4 animais do grupo)

+++ = efeito acentuado (presente em 5-6 animais do grupo)

Tabela 5.6 - Principais reações comportamentais relacionadas às doses administradas por via intraperitoneal, do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., nos ensaios definitivos da avaliação da toxicidade aguda.

Ações	Doses				
	1.000	1.300	1.335	1.350	1.500
SN CENTRAL					
Estimulantes					
↑ Frequência respiratória	+	++	+	-	+
Agitação	+++	++	+++	+++	++
Piloereção	++	++	+	++	+
Exoftalmia	-	++	+	-	++
Movimentos estereotipados	+	++	+++	++	++
Movimentos circulares	+	++	+++	+	+
Movimentos de vibrissas	+	+	++	-	+++
Convulsão clônica	-	++	+	-	-
Convulsão	-	+++	-	-	++
Tremores finos/grosseiros	++	+++	+++	++	+++
Ereção de cauda	+	+	++	-	+
Postura de ataque	-	+	+	-	-
Agressividade	-	++	-	-	-
Saltos	-	++	-	-	-
Reação de fuga	++	+++	+++	++	+++
Depressores					
Abaixamento trem posterior	+	++	+	-	+
Dispneia	-	+++	-	+	+++
↓ Frequência respiratória	-	-	-	+	++
Sedação	-	-	-	-	-
Prostração	+++	+++	+	+	+++
Outros comportamentos					
Alteração de marcha	+++	+++	+++	+++	+++
Contorções abdominais	-	-	++	-	-
Elevação de trem anterior	-	-	-	-	-
SN Autônomo					
↑ Excreção fecal	-	++	+	++	-
Espasmos	+	+++	++	+	+
Diarréia	+++	-	-	-	-
Refluxo	-	++	++	-	-
Palidez	+	++	++	+	-
Distensão abdominal	-	-	+	-	-
Diurese aumentada	-	-	-	+	+
Irritação da conjuntiva	-	+	+	-	+
Espasticidade	-	+++	+++	+	-
Cianose	-	+	+	++	+++
Edema de focinho	-	-	+	-	+

- = sem efeito (ausente em todos os animais do grupo)

+ = efeito leve (presente em 1-2 animais do grupo)

++ = efeito moderado (presente em 3-4 animais do grupo)

+++ = efeito acentuado (presente em 5-6 animais do grupo)

Outros efeitos estimulantes, de caráter moderado e leve, foram observados, logo após a administração das doses, dentre os quais, podem ser citados: convulsão clônica, postura de ataque e saltos.

Na maioria dos grupos de animais testados, após a exacerbação dos efeitos estimulantes, foram observados efeitos depressores acentuados, dentre os quais destacam-se: dispnéia, nas doses de 960, 1.300 e 1.500 mg/Kg; prostração (1.000, 1.300 e 1500 mg/Kg); sedação (960 mg/Kg) e abaixamento de trem posterior (2.000 mg/Kg).

As doses de 950, 980, 1.335 e 1.350 mg/Kg apresentaram efeitos depressores em menor escala, onde foram observadas reações mais breves.

Todos os animais apresentaram uma acentuada alteração da marcha, nas doses testadas. No que diz respeito às alterações do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), foram evidenciadas reações de espasmos, espasticidade, diarreia, palidez e cianose (Tabelas 5.5 e 5.6).

Como mencionado anteriormente, as reações comportamentais dos animais comprovaram a atividade estimulante do extrato estudado, sobre o SNC. Esses efeitos caracterizaram-se por ações ao nível de receptores adrenérgicos, nicotínicos e muscarínicos. As substâncias estimulantes podem agir tanto por mimetização de neurotransmissores, como também por efeito direto de ação central. Tais efeitos podem estar relacionados às alterações na neurotransmissão serotoninérgica central, o que condiz com a literatura quando postula que as substâncias que atuam

no Sistema Nervoso Central podem agir estimulando-o ou inibindo-o (GILMAN A. G.; GOODMAN; GILMAN A., 1996).

Além das alterações comportamentais, o número de óbitos verificado em cada grupo, nas diferentes doses testadas, foi registrado. Nos ensaios preliminares, a maior dose que não apresentou letalidade (D1) foi 980 mg/Kg e a menor dose que apresentou 100% de letalidade (D2) foi 2.000 mg/Kg (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 – Número de óbitos em relação às doses testadas, do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., nos ensaios preliminares e definitivos, destacando-se a D1 (maior dose que não apresentou letalidade) e D2 (menor dose que apresentou 100% de letalidade).

Dose (mg/kg de peso corpóreo)	Óbitos (após 48 horas)
950	0/6*
960	0/6*
980**	0/6*
1.000	1/6*
1.300	2/6*
1.335	3/6*
1.350	4/6*
1.500	5/6*
2.000***	6/6*

* = número de animais por grupo

** = D1

*** = D2

Os resultados encontrados, nas fases preliminares e definitivas, permitiram estabelecer a relação de concentrações das doses com o número de óbitos, cujos valores interpolados para um gráfico, resultaram na construção da curva dose-resposta, sigmóide (Figura 5.8), conforme relatado por Silva P. (2002).

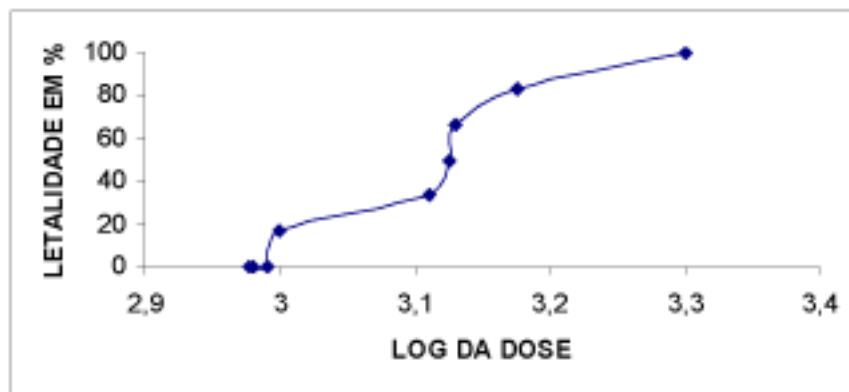


Figura 5.8 – Curva dose/resposta da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., aplicado intraperitonealmente em camundongos albino Swiss fêmeas.

O extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. apresentou uma DL₅₀ de 1.329,17 mg/Kg em camundongos albino Swiss fêmeas, por via intraperitoneal. A partir deste valor, estimou-se a dose adequada (10% do valor da DL₅₀) para a elaboração de um creme vaginal numa faixa de segurança pré-clínica apropriada.

5.6 Obtenção do Creme Vaginal

As dez melhores formulações centesimais testadas na etapa inicial, destacando-se a formulação utilizada na preparação do creme vaginal à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. podem ser vistas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Variações das formulações centesimais de creme vaginal (CRE) à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham.

Constituintes	Formulações									
	CRE 1	CRE 2	CRE 3	CRE 4	CRE 5	CRE 6	CRE 7	CRE 8	CRE 9	CRE10
Ácido esteárico	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Álcool ceto- estearílico	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Glicerina	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	8,0	7,5	7,0	6,0	8,0
Trietanol-amina	4,0	4,5	5,0	5,5	4,0	4,0	5,5	5,0	6,0	5,0
Extrato vegetal	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32
Água dest q.s.p.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A tecnologia desenvolvida segundo a literatura, forneceu um produto acabado, denominado, provisoriamente, CandLip, com qualidade dentro das especificações dos compêndios oficiais (Figura 5.9). O creme vaginal formulado contém 133 mg do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. por volume aplicado (4g), o que corresponde a sua dose terapêutica (10% do valor da DL₅₀), equivalente a 66.500 UI - Unidades Internacionais (FERREIRA, A., 2000).

Figura 5.9 – Creme vaginal formulado com o extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham.

5.7 Avaliação da Atividade Antifúngica do Produto Acabado

O creme vaginal preparado à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. inibiu as linhagens nº. 02 (*Candida albicans*) e nº. 43 (*Candida albicans*), utilizando-se a técnica do ágar *spot test* e a técnica do poço em camada dupla (*Well*), com halos que variaram entre 12,33 e 21 mm de diâmetro, conforme mostram as figuras 5.10 e 5.11, respectivamente.

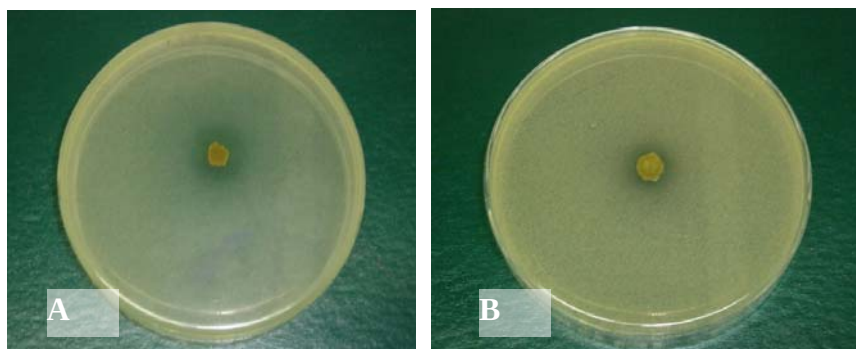


Figura 5.10 - Halos de inibição de *Candida albicans* (Linhagem nº. 02) pelo creme vaginal à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides*: A) técnica do ágar *spot test*; B) técnica do poço em camada dupla (*Well*).

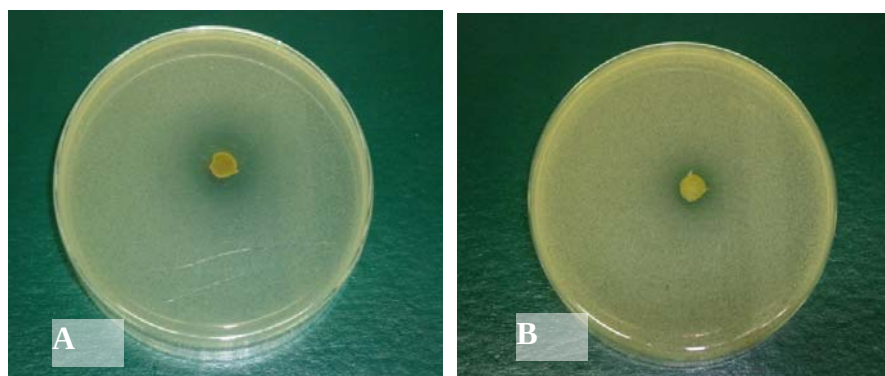


Figura 5.11 - Halos de inibição de *Candida albicans* (Linhagem nº. 43) pelo creme vaginal à base do extrato etanólico bruto pilular da folha de *Lippia sidoides*: A) técnica do ágar *spot test*; B) técnica do poço em camada dupla (*Well*).

Os halos obtidos pela técnica do ágar *spot test* foram maiores, para as duas linhagens testadas, provavelmente por uma maior difusão do produto ao se utilizar esta técnica. A obtenção de halos menores que aqueles observados no teste de atividade do extrato bruto, pode ser explicada pela velocidade de difusão do princípio ativo nos dois testes. Os resultados demonstram a atividade do produto formulado, uma vez que foram obtidos halos límpidos, sem presença de colônias resistentes.

5.8 Determinação das Classes de Compostos

As classes de compostos encontradas no etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., com suas respectivas concentrações podem ser vistas na Tabela 5.9.

Os testes realizados apresentaram resultados positivos para diversos compostos, que variaram entre fraco (+), médio (++) e forte (+++). A presença de compostos fenólicos, detectada no teste realizado com FeCl_3 , sugere a presença de timol e carvacol, isômeros de posição encontrados no gênero *Lippia*. Outros compostos que apresentaram resultados fortes (+++) foram quinonas, esteróides e ácidos fixos fortes.

A presença de componentes químicos fixos identificados no etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., como flavonóides e quinonas, coincide com os relatos de Lorenzi e Matos (2002), os quais afirmam que estes compostos contribuem para sua ação antisséptica.

Tabela 5.9 Principais componentes químicos do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham.

CLASSES DE COMPOSTOS	REAGENTES DE COMPLEXAÇÃO	RESULTADOS*
FENÓIS	FeCl ₃	+++
TANINOS PIROGÁLICOS (HIDROLISÁVEIS)	FeCl ₃	++
TANINOS FLOBAFÊNICOS (CONDENSADOS)	FeCl ₃	++
ANTOCIANINAS E ANTOCIANIDINAS	Acidular a pH 3, alcalinizar a pH 8,5 e a pH 11.	S
FLAVONÓIS	Alcalinizar a pH 11	+
XANTONAS	Alcalinizar a pH 11	+
CHALCONAS E AURONAS	Acidular a pH 3, alcalinizar a pH 11	++
FLAVANONÓIS	Alcalinizar a pH 11	+
LEUCOANTOCIANIDINAS	Acidular com HCl a pH 1-3	0
CATEQUINAS	Acidular com HCl a pH 1-3	0
FLAVANONAS	Alcalinizar com NaOH a pH 11	++
ALCALÓIDES	Reagentes:Hagen, Mayer e Dragendorff (meio ácido)	0
BASES QUATERNÁRIAS	Acidular o meio	0
QUINONAS	Sol. etérea, adicionar NH ₄ OH 6N	+++
TRITERPENÓIDES	Clorofórmio, Anidrido acético, Na ₂ SO ₄ , H ₂ SO ₄	0
ESTERÓIDES	Clorofórmio, anidrido acético, Na ₂ SO ₄ e H ₂ SO ₄	+++
SAPONINAS	Água destilada: 2 a 3 ml	0
ÁCIDOS FIXOS FORTES	NH ₄ OH; NaOH 1 N; reagente de Nesler	+++
CUMARINAS	KOH 1N. Radiação UV	0

* + = Fraco; ++ = Médio; +++ = Forte; S = Suspeito; 0 = Ausente.

5.9 Cromatografia em Camada Delgada

A presença do timol no extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. foi comprovada através de comparação com o timol puro comercial, em cromatografia em camada delgada, conforme mostrado na Figura 5.12.

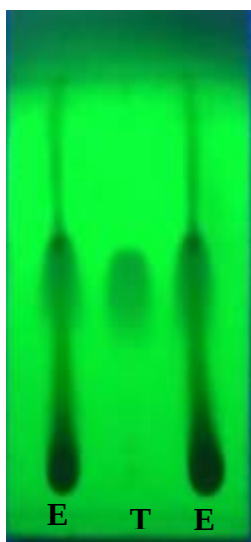


Figura 5.12 – Cromatografia em camada delgada de sílica gel, mostrando idênticos valores de Rf para o timol (T) e o extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (E).

5.10 Bioautograma

A revelação biológica com *Candida albicans*, da placa cromatografada com o timol e o extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham., comprovou que a atividade antifúngica deste último, coincide com a do timol (mesmos Rfs), comprovando a presença desta substância no extrato estudado (Figura 5. 13).



Figura 5.13 – Halos de inibição de *Candida albicans* pelo extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e pelo timol, em placa de sílica gel, em revelação biológica, mostrando idênticos valores de Rfs: E) extrato; T) timol

Considerando-se que foram usadas concentrações distintas para o extrato estudado e a substância pura, não é possível afirmar, com segurança, que o mesmo apresente maior poder de inibição comparado ao do timol, embora este tenha apresentado halo menor em relação ao do extrato.

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos permite concluir que:

☀ As substâncias antifúngicas de *Lippia sidoides* Cham. estão contidas principalmente nas folhas e flores.

☀ O extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. foi o que apresentou melhor atividade frente às linhagens de *Candida* spp testadas.

☀ *Candida albicans* corresponde a 71,1% das linhagens de *Candida* spp testadas.

☀ O timol está presente no extrato etanólico bruto pilular das folhas de *Lippia sidoides* Cham.

☀ A atividade antifúngica do extrato etanólico bruto pilular das folhas de *Lippia sidoides* Cham. está relacionada com a presença de timol.

☀ O extrato etanólico bruto pilular das folhas de *Lippia sidoides* pode ser classificado como um forte inibidor de *Candida* spp.

☀ O extrato etanólico bruto pilular das folhas de *Lippia sidoides* Cham. induz efeitos estimulantes em camundongos albino *Swiss* fêmeas, a nível de SNC, com distúrbios reversíveis ou provocando seqüelas a nível periférico.

☀ A produção da forma farmacêutica plástica creme vaginal à base do extrato etanólico bruto pilular de folhas de *Lippia sidoides* Cham. apresentou-se viável em escala piloto.

7 PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS POSTERIORES

- ☀ Complementação dos ensaios toxicológicos pré-clínicos.
- ☀ Realização de ensaios clínicos.
- ☀ Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos das frações mais ativas juntas (folha e flor) de *Lippia sidoides* Cham.
- ☀ Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos das frações mais ativas de *Lippia sidoides* Cham., frente a outros fungos causadores das micoses oportunistas.
- ☀ Controle de qualidade físico-químico e microbiológico da forma farmacêutica acabada.
- ☀ Controle de estabilidade química do produto acabado, para a determinação do prazo de validade.
- ☀ Avaliação do comportamento reológico do produto acabado.
- ☀ Estudo farmacotécnico para desenvolvimento de cremes e géis dermatológicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; CHINOU, I.B.; MITAKOU, S.; GIKAS, E.; TSARBOPOULOS, A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 811–815, 2001.

ALVES, P. M. **Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana e antiaderente dos extratos da *Myracrodruon urundeuva* All. (aroeira-do-sertão), *Malva sylvestris* (malva) e *Psidium guajava* Linn. (goiabeira-vermelha) sobre microrganismos formadores do biofilme dental e cepas do gênero *Candida***. 2005. 105 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2005.

AMORIM, J. A. **Fitoterapia Popular e Saúde da Comunidade: diagnóstico para proposta de integração nos serviços de saúde, em Campina Grande, Paraíba**. 1999. 170 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

AMOROZO, M. C. M.; GÉLY, A. L.. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica**, v. 4, n. 1, p. 47-131, 1988.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN-JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistema de Liberação de Fármacos**. São Paulo: Editora Premier, p. 398-490, 2000.

ARRUDA, T, A. **Estudo Etnofarmacobotânico e Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais**. 2002. 94 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva)-Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2002.

AZZAM, W. M.; CERMENO-VIVAS, J. R.; ORELLAN-GARCIA, Y.; PENNA, S. J. Vulvovaginitis caused by *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis* in sexually active women. **Investigacion Clinica**, v. 43, n. 1, p. 3-13, 2002.

BARRY, A. L., PFALLER, M. A., RENNIE, R. P.; FUCHS, P. C.; BROWN, S. D. Precision and Accuracy of Fluconazole Susceptibility Testing by Broth Microdilution, E-test and Disk Diffusion Methods. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1780-1784, 2002.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility test by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004a. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word>>. Acesso em: 10 jun. 2006.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004b. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10242&word>>. Acesso em: 10 jun. 2006.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 39, p. 53-67. 1993.

_____. Medicinal plant research in Brazil: data from regional and national meetings. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S. A. (eds.). **Medicinal Resources of the tropical forest - biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, p. 386-401, 1999.

BUCHTA, V.; SPACEK, J. Microbiological findings in patients with recurrent vulvovaginitis candidiasis in the Hradec Kralove Faculty Hospital 1995-2002. **Ceska Gynekologie**, v. 69, n. 1, p. 7-14, 2004.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, M. M. ;AGUIAR L. M. B. A.; MATOS, F. J. A. Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaios com *Artemia salina* Leach. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 11, p. 1109-1111, 1998.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CLARK, R. A.; BLAKLEY, S. A.; RICE, J.; BRANDON, W. Predictors of HIV disease progression in women. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**. v. 9, p. 43-50, 1995.

COLEMAN, D. C.; RINALDI, M. G.; HAYNES, K. A.; REX, J. H.; SUMMERBELL, R. C.; ANAÏSSIE, E. J.; LI, A.; SULLIVAN, D. J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, suppl. 1, p. 156-165, 1998.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COSTA, M. C. C D.; **Aspectos Farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral.** 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. L. P.; ASSUNÇÃO, J. C. C.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.

COTTER, G.; KAVANAGH, K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. **British Journal Biomedical Science**, v. 57, n. 3, p. 241-249, 2000.

COUTO, G. B. L.; XIMENES, E.; SANTANA, D. P.; VIDAL, A. K.; VASCONCELOS, M. M. V. B.; LIMA, A. C. S.; SILVA, J. M. B. Biocompatibilidade do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae). **Revista do Conselho Regional Odontologia de Pernambuco**, v. 3, n. 2, p. 83-90, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, C. H. S.; MACHADO, M. I. L. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**. v. 44, n. 5, p. 598-601, 1981.

CROCCO, E. I.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU, L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with superficial candidiasis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 689-697. 2004.

DECLARAÇÃO DE ALMA-ATA. **Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde**. ALMA-ATA: URSS, 1978. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/coletiva/uploadArq/Alma-Ata.pdf>>. Acesso em 12 ago. 2006.

DE MELO, A. F. M. **Estudo Galênico de Formas Plásticas (Gel e Creme) do Extrato Bruto de *Anacardium occidentale* L.** 2002. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e Ciência – um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230 p.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre a diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 1996.

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

EYLER, A. E.; PIERSON, C.; REED, B. D. Improved diagnosis of *Candida* vulvovaginitis using Diamond's media modified. **Journal Women's Health**, v. 5, p. 79-24, 1996.

FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O.; RECH, N.; MELLO, J. C. P.; STORB, B. H.; ROVARIS, D. A. Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: **XIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, Fortaleza, 1994.

FERNANDES FILHO, E. S.; MORAIS, S. M., FONSECA, S. G. C.; MOTA, O. M. L. Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim pimenta). **Revista da Associação Brasileira de Odontologia Nacional**, v. 6, n. 5, p. 323-325, 1998.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático de Farmácia Magistral**. Ed. Revisada. Juiz de Fora: 2000. p. 234.

FERREIRA, A. W; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes**. 2. edição, Guanabara Koogan. 2001. p. 334-336; 368-372.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 129p. il.

FIDEL JUNIOR, P. L.; SOBEL, J. D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 335-348, 1996.

FONSECA, A.; PRISTA, L.N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia**. São Paulo: Livraria Roca. 1984. 436p.

GAGNON, M.; KHEADR, E.E.; BLAY, G.L.; FLISS, I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**. v.92, p. 69-78, 2004.

GALLE, L. C.; GIANINNI, M. J. S. M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n.4, p. 229-236, 2004.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. **Science**, v. 264, p. 371-373, 1994

_____. Antifungal Agents: Chemotherapeutic Targets and Immunological Strategies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p.279 –291.1996.

GIRÃO, V. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; MORAIS, S. M.; SEQUEIRA, J. L.; GIOSO, M. A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham. essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, n. 1-2, p. 95-102, 2003.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. **Assay Methods of antibiotics**. New York: Medical Encyclopedia Inc., 1955.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. 2 ed. London: Champman & Hall. 1982. 288p.

_____. Flavonoid pigments. In: ROSENTHAL, G.A.; BEREMBAUM, M.R. (Eds.). **Herbivores and their interaction with secondary metabolites**. London: Academic Press, p. 389-429, 1991.

KARBER, G.; BEHRENS, B. **Statiscal methods in biological assays**. London: Griffin Ch. An. C., 1964.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KURTZMAN, P. C.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdan: Elsevier; 1998. 1055 p.

LACOSTE, E.; CHAUMONT, J. P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M. M.; MATOS, F. J. A. Les propriétés antiseptiques de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* Cham. Application à la microflore cutanée. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 54, n. 5, p. 228-230, 1996.

LEAL, L. K. A. M.; OLIVEIRA, V. M.; ARARUNA, S. M.; MIRANDA, M. C. C.; OLIVEIRA, F. M. A. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. p. 09-11, 2003.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**. v.4, n.2, p. 82-84, 1990.

LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BARBOSA, R. C. B.; LIMA, E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, n. 3, p. 266-268, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarump, 494-495, 2002.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratoy medicine**. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. 1256p.

MACAMBIRA, L. M. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Naphthoquinoids from *Lippia sidoides*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 310-312, 1986.

MARKHAM, K.R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: MARKHAM, K.R. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic Press, p.197-235, 1989.

MARTÍNEZ, J.; ALBRECHT, C. Sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B en cepas de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 298-299, 1998.

MARTINS, E. R.; SANTOS R. H. S. **Plantas Medicinais : Uma Alternativa Terapêutica de Baixo Custo**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1995. 26p.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 2 ed. Fortaleza: Edições-UFC. p. 65-67, 1994.

_____. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições-UFC, p. 43-75, 1997.

_____. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária / Edições-UFC, p.171-172, 2000.

MATOS, F. J. A; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 79, p. 84-87, 1998.

MEDEIROS FILHO, J. G.; PIRES, M. P. C.; FREIRE, A. C. M. Toxicidade de plantas medicinais na terapêutica infantil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 1, p. 45-52, 1997.

MENDES, C. L.; ARAÚJO, A. A.; SENA. K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A. Prevalência de *Candida* sp. em infecções vaginais. **NewsLab**, 68 ed., p. 104-111, 2005.

MENDONÇA, N.; DESLANDES, B. S.; LEMOS, C. N. C. D. Candidíase vulvovaginal. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 99, p. 369-372, 1989.

MENDONÇA, V. L. M.; FONTELES, M. C.; AGUIAR, L. M. B.; CRAVEIRO, A. A. Toxicidade e alergenicidade do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. para utilização em cosméticos. **Aerosóis e Cosméticos**, v. 12, p. 12-17, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares – Resumo Executivo**, Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ResumoExecutivoMedNatPratCompl1402052.pdf>>. Acesso em 26/08/06.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORAIS, S. M.; FERNANDES FILHO, E. S.; MATOS, F. J. A.; MACHADO M. I. L.; SOARES, J. B.; ANDRADE, A. P. S. Óleos essenciais de plantas brasileiras: estudo químico, atividade bactericida e possível utilização em cimentos dentários. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 2, p. 42-44, 1996.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan 4. ed. 2002. 762 p.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility tests of yeasts. Approved standard M27-A**. Wayne, Pa, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997.

NUNES, R. S. **Desenvolvimento galênico de produtos de uso odontológico (creme dental e enxaguatório bucal) a base de *Lippia sidoides* Cham. verbenaceae – alecrim pimenta**. 1999. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

NUNES, R. S.; LIRA, A. M.; XIMENES, E.; SILVA, J. A.; SANTANA, D. P. Caracterização da *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) como matéria-prima vegetal para uso em produtos farmacêuticos. **Scientia Plena**, v. 1, n. 7, p. 182-184, 2005.

OGA, S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Fundamentos de Toxicologia** – 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 3-76, 2003.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Programa de Medicina Tradicional. Pautas para la evaluacion de medicamentos herbarios.** Genebra, OMS, 1991.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L. From a Medicinal Plant to a Pharmaceutical Dosage Form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5/6, p. 364-369, 1997.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, suppl.1, p. 45-61, 2002.

QUEIROZ, M. V. F. **Atividade Antifúngica *In Vitro* de Plantas Medicinais frente a Leveduras do Gênero *Candida* Isoladas da Cavidade Bucal.** 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado em Estomatologia)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1998.

RANDÜNZ, L. L.; MELO, E. C.; MACHADO, M. C.; SANTOS, R. R.; SANTOS, R. **Secagem em camada delgada de folhas de *Lippia sidoides* Cham.** XXX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Foz do Iguaçu, 2001.

RASO, P.; TAFURI, W. L. Incidência de *Candida albicans* em 100.000 exames citopatológicos cervico-vaginais consecutivos. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 102, n. 8, p. 305-308, 1992.

REX J. H.; WALSH T. J.; SOBEL J. D.; FILLER, S. G.; PAPPAS, P. G.; DISMUKES, W. E.; EDWARDS, J. E. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 662-678, 2000.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia biotecnologia.** São Paulo: Editorial Premier, p. 97, 1997.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

SCHULTES, R.E. Burning the library of Amazonia. **The Sciences**, v. 34, n. 2, p.24-31, 1994.

SILVA, J. O.; FRANCESCHINI, S. A.; CANDIDO, R. C. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p. 113-120, 2002.

SILVA, P. **Farmacologia** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 25-183, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4. ed.** Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. UFSC, p.13-40, 2002.

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R. W. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.178, p. 203-211, 1998.

SOUSA, E. M. B. D.; CHIAVONE FILHO, O.; MORENO, M. T.; SILVA, D. N.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. using pressurized carbon dioxide. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 229-241, 2002.

SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC – Laboratório de Produtos Naturais, 1991. 416p.

THE Merck Index. 12 ed. USA: Whitehouse Station, p. 308 e 1604. 1996

THOMSON, W. A. R. **Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales**. Barcelona: Blume, 1981.

TORRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João

Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p. 373-380, 2005.

TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 1058-1069, 2003.

VAL, I. C. C.; ALMEIDA FILHO, G. L. Abordagem Atual da Candidíase Vulvovaginal. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 13, n. 4, p. 3-5, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A. Observações preliminares sobre a farmacologia de *Lippia sidoides*. 30ª Reunião Anual da SBPC - SP, **Ciência e Cultura**, v. 30, 1978.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2 ed. New York: Springer, 1996. 384p.

WALL, M.E; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WHITE, M. H. Is vulvovaginal candidiasis an AIDS- related illness? **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 124-127. 1996.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I; MARQUES, A. S; RUIZ, LRB; SOUZA, VM. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 99-107, 1998.

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