



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA

EDILSON DAMKE

Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Sapindus saponaria* frente
a isolados vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos

Maringá
2009

EDILSON DAMKE

Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Sapindus saponaria* frente
a isolados vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.
Área de concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Co-orientador: Prof. Dra. Terezinha Inêz Estivalet Svidzinski

Maringá
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

EDILSON DAMKE

Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Sapindus saponaria* frente
a isolados vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Cíntia Gandolfi Boer
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Batista
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^a. Dr^a. Lílian Baeza
Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 04 de dezembro de 2009

Local de defesa: Anfiteatro COMCAP *Campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder paciência, força de vontade e sabedoria.

Aos meus pais Ignácio e Dalila e meus irmãos Elói e Leandro, pelo apoio afetivo, moral e financeiro despendidos.

A minha namorada Gabrielle Marconi Zago Ferreira, por ser sempre tão companheira e compreensiva nos momentos em que ficou sozinha enquanto eu me dedicava ao mestrado.

Aos meus amigos e colegas que conviveram diariamente no laboratório, fazendo com que a rotina fosse mais alegre. Sem eles com certeza o mestrado não teria sido mais fácil.

A secretária do PBF, Luciane, por sempre ser tão funcional e por demonstrar alegria pelo trabalho que desempenha.

Aos funcionários do LEPAC, pelo apoio logístico que facilitou muito o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A professora Dra. Terezinha Inêz Estivalet Svidzinski, minha coorientadora por nunca medir esforços no sentido de fazer com que o Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia cresça e melhore.

A minha orientadora Professora Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro, por me acolher em seu grupo de pesquisa. Agradeço também pela disponibilidade, paciência e aconselhamentos que proporcionaram convivência harmoniosa durante os anos que trabalhamos juntos. A amizade fraternal vai ficar para sempre.

Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Sapindus saponaria* frente a isolados vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos.

Resumo

Candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção que afeta milhares de mulheres no mundo a cada ano, determinando grande desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas e prejudicando o desempenho laboral. Para o tratamento de CVV têm sido empregados agentes azólicos, além dos agentes poliênicos (nistatina e anfotericina B). Tem sido detectada baixa expectativa terapêutica com nistatina e os azólicos apresentam elevado custo, dificultando o manejo de pacientes com a infecção, evidenciando a necessidade de novas alternativas. Recentemente, a planta *Sapindus saponaria* demonstrou excelente atividade fungicida *in vitro* frente à *C. albicans* e *C. não-albicans*, superior à do fluconazol (FLU), que é apenas fungistático e que já apresenta perfil de resistência. Foi realizado estudo de caracterização química, toxicidade e atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* dos extratos hidroalcoólico (EHA) e butanólico (EBUT) de pericarpos secos *S. saponaria* frente à isolados de *Candida* sp vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos. Foram obtidos extratos dos pericarpos secos e determinada sua atividade antifúngica *in vitro*, e também do FLU e itraconazol (ITRA) por microdiluição em caldo, determinando valores de concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) de 46 *C. albicans* e 10 *C. glabrata* isoladas de pacientes com CVV. A infecção foi induzida em ratas Wistar hiperestrogênicas com *C. albicans* sensível (CAS), resistente (CAR) e *C. glabrata* resistente (CGR) a compostos azólicos. Os animais foram tratados intravaginalmente com EHA ou EBUT a 1%, 2,5% e 5% e FLU 100 µg/mL a 1, 24 e 48 hr após a infecção, acompanhada por cultura e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados geraram o artigo “Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de *Sapindus saponaria* frente à *Candida* sp vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos”. Os extratos mostraram atividade inibitória e fungicida *in vitro* frente a todos os isolados, com valores de CIM e CFM pouco maiores para as *C. glabrata*. A infecção por CAS, CAR e CGR foi eliminada com até 5% de EHA e EBUT, sem ação citotóxica. Nossos resultados apontam que EHA e EBUT de *S. saponaria* constituem uma fonte muito promissora para o desenvolvimento de droga antifúngica para CVV.

Palavras-chave: *Sapindus saponaria*, leveduras vaginais, atividade antifúngica, atividade *in vivo*.

Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of the extracts of *Sapindus saponaria* against vaginal isolates susceptible and resistant to azoles.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an infection that affects several women worldwide every year, determining a great discomfort, interfering upon emotion and sexual relationships and resulting labor development damage. For VVC treatment azoles has been usually used, beside of polyenic agents (nystatin and amphotecin B). However, it has been noticed a low therapeutic expectative with nystatin, whereas the azoles present high cost; which makes difficult the patient's management with infection, pointing out the need of new alternatives. Recently, *Sapindus saponaria* demonstrated excelent *in vitro* fungicide activity against *C. albicans* and non-*albicans*, which was superior to fluconazole that is only fungistatic and already reveals a resistance profile. It has been carried out a study of chemical, toxicity, *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of hidroalcoholic extract (HAE) and butanolic extract (BUTE) of *Sapindus saponaria* against vaginal *Candida* spp. susceptible and resistant to azoles. The extracts were made with dry pericarps and its *in vitro* antifungal activity, as well as fluconazole (FLU) and intraconazole (ITRA) were determined by broth microdilution, defining values of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) of 46 isolates of *C. albicans* and 10 of *C. glabrata* from patients with proven VVC. The infection was induced in hyperestrogenic female Wistar rats with susceptible *C. albicans* (SCA), resistant (RCA) and resistant *C. glabrata* (RCG) to azoles. The animals were intravaginally treated with HAE and BUTE at 1%, 2.5% and 5%, and FLU at 100 µg/mL, at the periods of 1, 24 e 48 h after infection, followed by culture and scanning electron microscopy (SEM). The data resulted on the article writing "antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of *Sapindus saponaria* against *Candida* sp vaginals susceptible and resistant to azoles". The extracts demonstrated effective *in vitro* inhibitory and fungicide activity to all isolates, with MIC and MFC values a bit higher than the ones for *C. glabrata*. The infection was eliminated with CAE and BUTE without citotoxic action. Our results reveal that CAE and BUTE of *S. saponaria* are very promising sources for the development of VVC antifungal drug.

Keywords: *Sapindus saponaria*, vaginal yeasts, antifungal activity, *in vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1	Fruto seco de <i>Sapindus saponaria</i>	12
Figura 2	Saponinas isoladas de plantas do gênero <i>Sapindus</i>	13

CAPÍTULO 2

Figura 1.	Estruturas químicas dos compostos identificados em <i>S. saponaria</i> . (a) Saponinas 1 e 2. (b) Oligoglicosídeo Acíclico-1	50
Tabela 1.	Atividade anti- <i>Candida</i> sp <i>in vitro</i> dos extratos aquoso (EHA) e butanólico (EBUT) de <i>Sapindus saponaria</i> em comparação com fluconazol (FLU) e itraconazol (ITRA)	51
Figura 2a		52
Figura 2b		53
Figura 2c		54
Figura 3		56
Figura 4		57

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/>>

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I	10
1.1 Histórico	10
1.2 Gênero <i>Sapindus</i>	11
1.3 Saponinas	13
1.4 Atividade biológica das saponinas	14
1.5 Gênero <i>Cândida</i>	14
1.6 Candidíase Vulvovaginal (CVV)	15
1.7 Candidíase Vulvovaginal Recorrente (CVVR)	16
1.8 Fatores predisponentes do hospedeiro	17
1.9 Hormônios sexuais e o epitélio vaginal	18
1.10 Hormônios sexuais e a CVV	20
1.11 Justificativa	21
1.12 Objetivos	22
1.14 Referências	23
2 CAPÍTULO II	28
2.1 Atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Sapindus saponaria</i> frente à <i>Candida</i> sp vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos	29
3 CAPÍTULO III	60
3.1 Conclusões	60
3.2 Perspectivas futuras	61

CAPÍTULO I

HISTÓRICO

Produtos naturais têm sido usados tradicionalmente no controle de diversas doenças por serem fonte de muitos compostos ativos, que podem apresentar múltiplas ações terapêuticas, além de se constituírem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos.^{1,2}

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo do tempo, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizadas pelo homem das cavernas, até às formas tecnologicamente sofisticadas de fabricação industrial utilizadas pelo homem moderno. Apesar das enormes diferenças entre as duas maneiras de uso, há um fato comum entre elas: o homem percebeu nas plantas a presença de algo que, administrado sob a forma de mistura complexa (extrato) ou substância pura (isolada), tem a propriedade de provocar reações benéficas capazes de resultar na recuperação da saúde. Este algo atuante é o que se chama de princípio ativo, seja ele constituído de uma única substância da planta ou um conjunto de substâncias que atuam sinergicamente, quer sejam empregadas ainda dentro da planta ou em seus extratos, comprimidos, gotas, pomadas ou cápsulas. Por isso, as plantas medicinais, quando usadas corretamente, diferem do medicamento industrial a que deu origem principalmente pela embalagem e pelas substâncias secundárias que acompanham o princípio ativo.³

A Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população mundial dependa da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde e que quase 85% desta envolva o uso de plantas medicinais, seus extratos vegetais e seus princípios ativos.⁴

Antes da era dos antibióticos e corticóides, o número de infecções por fungos era bastante reduzido. Isto é, particularmente verdade para as infecções por *Candida*, especialmente por *Candida albicans*, que se apresentava como comensal mas que, frente às defesas comprometidas do indivíduo, se instala, invade tecidos e provoca danos. Concomitantemente, tem sido observada uma sensível elevação na frequência de candidíase vulvovaginal (CVV) nos últimos anos, tornando este diagnóstico cada vez mais comum na ginecologia.^{5,6}

O arsenal terapêutico industrialmente disponível para o tratamento das infecções fúngicas é bastante restrito, resumindo-se a antifúngicos poliênicos e azólicos, que têm sido empregados no tratamento de CVV. Entre os azólicos, os mais utilizados são fluconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol e cetoconazol, e entre os poliênicos nistatina e anfotericina B.⁷

A nistatina em creme ou óvulo vaginal tem sido usada há quase três décadas, entretanto, a elevada frequência de isolados vaginais com susceptibilidade dose-dependente (SDD) tem causado preocupação, uma vez que a dose preconizada pode não ser suficiente para que ocorra a eficácia terapêutica almejada.⁸ Este fato torna-se particularmente importante ao se considerar que a nistatina é utilizada em formulações tópicas de baixo custo, que é uma característica importante para o acesso de diferentes classes sociais ao tratamento.⁹⁻¹¹ A anfotericina B seria um excelente recurso terapêutico por apresentar alta eficácia, porém, tendo em vista sua elevada toxicidade, existem apenas formulações tópicas para CVV.¹¹

Dentre os azólicos, o fluconazol é um dos mais utilizados em CVV, no entanto, além do elevado custo, tem sido relatado o desenvolvimento de resistência de *C. albicans* e de *C. não-albicans* a esse fármaco.¹² Assim, existem grandes dificuldades no manejo de pacientes com CVV e CVVR, evidenciando a necessidade de buscar novas alternativas antifúngicas eficazes e de baixo custo para esta patologia.

Neste sentido, os frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), cujas árvores de tamanho médio ocorrem nos trópicos, principalmente na América e na Índia, tem demonstrado forte atividade antimicrobiana e antiinflamatória.^{1,2,13} Em estudo prévio, foi demonstrada excelente ação inibitória *in vivo* frente a leveduras *C. albicans* e *C. não-albicans* isoladas de pacientes com CVV,¹⁴ estimulando estudos com esta planta como um promissor agente antifúngico para esta patologia.

GÊNERO *Sapindus*

O significado do nome *Sapindus* vem do grego: sapo = sabão e indicus = da Índia.¹⁵ Segundo Cronquist (1981)¹⁶, a ordem Sapindales apresenta como características: folhas compostas, androceu haplo ou diplostêmone, disco nectário bem desenvolvido, ovário, com número limitado de óvulos, em geral, 1 ou 2 lóculo, e está constituída por 15 famílias e cerca de 5400 espécies, sendo que mais da metade destas estão distribuídas entre duas famílias:

Sapindaceae e *Rutaceae*. As outras espécies estão distribuídas entre *Anacardiaceae*, *Burseraceae*, *Meliaceae*, *Zygophyllaceae*, *Simaroubaceae*, *Aceraceae*, *Staphyllaceae* e *Hippocastanaceae*.

A família *Sapindaceae* JUSS, segundo Barroso (1984)¹⁵, de distribuição tropical, abundante nas Américas e na Ásia, está representada em nossa flora por 22 gêneros com cerca de 380 espécies, a maioria distribuídas pela região Amazônica. O mesmo autor descreve que as espécies desta família são árvores de grande e médio porte, arbustos ou lianas. As folhas são alternas compostas, de uni a trifolioladas, sendo simples apenas no gênero *Dodonaea*.

Segundo Jolly (1977)¹⁷, as flores são pequenas e não vistosas, em geral, branco esverdeadas, reunidas em inflorescências do tipo panícula, axilares ou terminais hermafroditas ou de sexo separado. Os frutos (figura 1) são secos indeiscentes, de pericarpo de consistência cartilaginosa, como no gênero *Sapindus*, ou esquizocárpico, com frutículos samarídeos como em *Serjana*, *Thinouia*, *Diatenopterix* e *Toulicia*. Barroso (1984)¹⁵ descreve que as sementes são ovóides ou elipsóides, geralmente com arilo e não apresentam endosperma.

Sapindus saponaria L (*Sapindaceae*), espécie originária de regiões tropicais ocorre no Brasil desde o Pará até o Rio Grande do Sul. Pertence a família *Sapindaceae*. É popularmente conhecida como sabão de macaco, saboeiro, saboneteiro, fruta de sabão e sabão-de-soldado.²

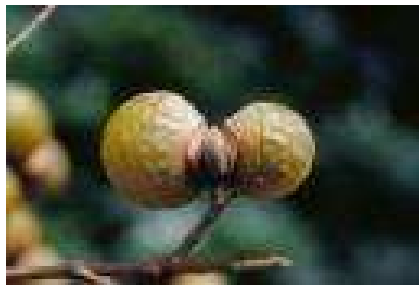


Figura 1. Frutos maduros de *S. saponaria*

Várias espécies do gênero *Sapindus* já foram estudadas, levando a identificação de algumas saponinas. As duas espécies mais estudadas são *S. mukurossi* e *S. delavayi*, das quais a grande maioria das saponinas foi identificada.^{18,19}

SAPONINAS

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante. Estas substâncias apresentam larga distribuição no reino vegetal, sendo sintetizadas por mais de 500 espécies pertencentes a mais de 90 famílias, muitas vezes ocorrendo em grande quantidade.²⁰

As saponinas são substâncias de elevada massa molecular (600 a 2000 Kd) e, de modo geral, ocorrem em misturas complexas devido à presença de açúcares ou ainda devido à presença de diversas agliconas. A cadeia de açúcar pode ser linear ou ramificada e uma das dificuldades na elucidação estrutural desses compostos está justamente em determinar os carbonos das ligações interglicosídicas. Por essa razão, o isolamento de saponinas, bem como a sua elucidação estrutural, pode ser muito difícil. É por isso, também, que o conhecimento sobre a química e propriedades biológicas de saponinas desenvolveu-se apenas recentemente, paralelo à evolução das técnicas cromatográficas e espectroscópica.²¹ Apesar dessas dificuldades, ao longo do tempo, esse grupo de substâncias tem sido de interesse farmacêutico, seja como adjuvante em formulações, princípio ativo em drogas vegetais, ou ainda, como matéria-prima para síntese de esteróides.¹³

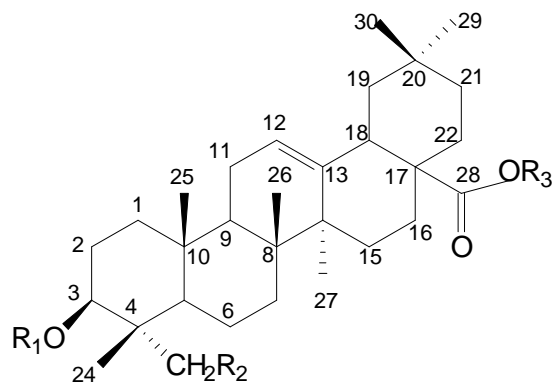


Figura 2. Saponinas isoladas de plantas do gênero *Sapindus*.

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS SAPONINAS

Apresentam ação moluscicida (sendo utilizadas no controle da esquistossomose), atividade piscicida, e tóxica a vários animais, principalmente os de sangue frio. Outras atividades biológicas são antiinflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, espermicida, redutora de colesterol e antifúngica. Entretanto, dois fatores tornam difícil a administração dessas substâncias em seres humanos. O primeiro deles é que saponinas apresentam atividade hemolítica, não podendo ser aplicadas na corrente sanguínea. O segundo fator é a baixa absorção de saponinas por via oral, ainda que desta forma elas não sejam tóxicas.²¹

Saponinas apresentam também propriedades anti-carcinogênicas, atuando por mecanismos como citotoxicidade direta às células carcinogênicas, efeitos imuno-modulatórios e normalização da proliferação de células induzidas por carcinogênicos.²²

Espécies da família *Sapindaceae* são conhecidas por seu uso na medicina popular como diuréticos, estimulantes, expectorantes, sedativos e vermífugos. São também utilizados no tratamento de dores no estômago e dermatites em muitas partes do mundo, principalmente pela medicina oriental.²³

GÊNERO *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* constituem aproximadamente 200 diferentes espécies, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e trato gastrointestinal. Dentre as espécies que compõem este gênero, *Candida albicans* apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença.²⁴⁻²⁶

C. albicans está amplamente distribuída na natureza, ocupando diversos habitats, ao contrário de outras espécies do gênero, de distribuição limitada.²⁷ Além disso, está muito bem adaptada ao corpo humano, sendo capaz de colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica.²⁸ *C. albicans* é um fungo dimórfico que se apresenta sob formas leveduriformes (blastoconídeos) no estado saprofito, associado a colonização assintomática ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) observadas em processos patogênicos. Além disto, sob condições de crescimento sub-ótimas, pode ocorrer à formação de clamidioconídios, que são esporos arredondados que possuem uma espessa

parede celular. Dessa forma o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, a rigor, um organismo polimórfico.²⁹

O fungo coloniza as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção endógena.³⁰ O delicado balanço entre o hospedeiro e este fungo comensal pode transformar-se em uma relação parasitária, resultando no desenvolvimento de infecções denominadas candidíases.³¹ Essas infecções fúngicas variam desde lesões cutâneas em pessoas saudáveis até infecções disseminadas em pacientes neutropênicos.³² Um aumento na incidência de infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* tem sido observado em pacientes imunocomprometidos.³³

Candidíase Vulvovaginal (CVV)

A micose vulvovaginal foi descrita pela primeira vez por Wilkinson em 1949, que estabeleceu uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginite. A partir desse momento, os conhecimentos foram evoluindo progressivamente.⁵

CVV é uma patologia ocasionada pelo crescimento anormal de fungos do tipo leveduras no trato genital feminino, a maioria deles pertencentes ao gênero *Candida*. Trata-se de uma infecção da vulva e vagina, causada por leveduras comensais que habitam a mucosa vaginal bem como a mucosa digestiva e respiratória, principalmente *C. albicans*. Estas leveduras podem tornar-se patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável para o seu desenvolvimento.⁵

Estima-se que 75% das mulheres adultas apresentem pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, sendo que destas, 40 a 50% vivenciarão novos surtos e 5% atingirão o caráter recorrente (CVVR).³⁴

De 80 a 90% dos casos são devidos à *C. albicans*, e de 10 a 20% à outras espécies chamadas *C. não-albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*). *C. glabrata* é a segunda espécie em frequência nas CVV.³⁵⁻³⁷ Porém leveduras de outros gêneros também podem causar esta infecção, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula sp* e *Trichosporon sp*.³⁸⁻³⁹

Estudos mais recentes têm demonstrado que em algumas populações a frequência de isolamento de leveduras *C. não-albicans* tem aumentado. No estudo de FERRAZA et al. (2005),⁹ *C. albicans* foi a levedura mais isolada nas populações analisadas, uma no estado do Paraná (PR) e outra de Santa Catarina (SC). Em SC *C. albicans* representou 77,4% dos

isolados, enquanto que no PR 50,0%. O mesmo já havia sido descrito por um estudo italiano que demonstrou que a prevalência de CVV causada por leveduras *C. não-albicans* cresceu 9,9% em 1998, para 17,23% em 1995.⁴⁰ A razão desse aumento não está bem definida, sendo atribuída ao uso inadequado de antimicóticos.⁴¹ Porém, Rosa & Rumel (2004)⁴² obtiveram frequência de isolamento de 96,0% de *C. albicans* em material vaginal obtido de outra população de Santa Catarina.

A CVV é um dos diagnósticos mais frequentes na prática diária em ginecologia e sua incidência tem aumentado significativamente, tornando-a a segunda infecção genital mais frequente nos Estados Unidos e no Brasil, representando 20 a 25% dos corrimentos vaginais de natureza infecciosa, precedida apenas pela vaginose bacteriana.⁶ Na Europa, é a primeira causa de vulvovaginite.⁵

Esta infecção caracteriza-se por prurido, ardor, dispaurenia e pela eliminação de um corrimento vaginal em grumos, semelhante à nata do leite. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes acompanhadas de ardor ao urinar e sensação de queimadura.³⁴ As lesões podem estender-se pelo períneo, região perianal e inguinal.⁴³ O corrimento geralmente é branco e espesso, é inodoro e, quando depositado nas vestes a seco, tem aspecto farináceo. Em casos típicos, nas paredes vaginais e no colo uterino aparecem pequenos pontos branco-amarelados. Os sintomas se intensificam no período pré-menstrual, quando a acidez da vagina aumenta.⁴⁴

A principal fonte de leveduras vaginais é o trato gastrointestinal, através de um processo chamado transmissão endógena. As mesmas são veiculadas para a vagina por auto-inoculação, onde se adaptam e se desenvolvem. A transmissão sexual também é aceita, o que a torna uma doença sexualmente transmissível (DST). Através da ação de enzimas como proteases e hidrolases, as leveduras que chegam a vagina penetram no seu epitélio, ali permanecendo albergadas, podendo causar distúrbios imediatos ou constituir-se em reservatórios para reinfecções posteriores.³³

CANDIDÍASE VULVOVAGINAL RECORRENTE (CVVR)

Aproximadamente 5% das mulheres com CVV desenvolvem CVVR, que é definida usualmente como a ocorrência de quatro ou mais episódios de CVV no período de 12 meses.^{45,46} Ao contrário das mulheres que tem episódios esporádicos de CVV, aquelas com

doença recorrente não se beneficiam de diminuição na frequência de episódios sintomáticos com o passar da idade.⁴⁵

A patogênese da CVVR entre mulheres que não tem condições predisponentes aparentes, que são a grande maioria, está sob investigação. Uma elevação na resistência de espécies de *Candida* não tem sido observada na maioria dos casos, embora, se analisarmos essas pacientes como um grupo, mulheres com recorrência tem prevalência discretamente mais elevada de *C. glabrata*, a qual é menos sensível às drogas azólicas comumente utilizadas no tratamento de CVV e CVVR.⁴⁷

Provavelmente a CVVR seja o resultado de alguma disfunção inata ou adquirida na resposta imune protetora que a maioria dos indivíduos adquire a partir da primeira exposição a *C. albicans*.⁴⁷

FATORES PREDISPONENTES DO HOSPEDEIRO

A expressão da relação parasita/hospedeiro depende do balanço entre a virulência do microrganismo e as defesas do hospedeiro. Em consequência disto, o tempo de incubação dificilmente pode ser estabelecido. Tanto os fatores locais como sistêmicos podem contribuir para a invasão tecidual por *C. albicans* e por leveduras *C. não-albicans*. Sua intensa multiplicação no canal vaginal é favorecida por uma série de fatores predisponentes. Do ponto de vista do hospedeiro, a colonização prévia por levedura e posterior diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em doenças imunossupressoras, *Diabetes mellitus*, gestantes e usuárias crônicas de corticóides, parecem favorecer a infecção.⁴⁸⁻⁴⁹ A utilização de antibióticos pode incrementar tanto a colonização quanto a infecção por *Cândida* spp. Embora diferentes estudos não tenham sido conclusivos neste sentido, antibióticos podem suprimir a microbiota vaginal lactobacilar, que é um importante mecanismo defensivo vaginal.⁵

Na prática, a infecção vaginal por *C. albicans* geralmente é associada com situações de debilidade do hospedeiro ou quando o teor de glicogênio do meio vaginal está elevado e a conseqüente queda do pH local propicia o desenvolvimento da infecção. Qualquer alteração dos níveis de glicose, especialmente em situações de hiperglicemia, e qualquer estado em que se produz elevação do glicogênio vaginal, pode desencadear CVV.⁵⁰ O excesso de glicogênio aumenta o substrato nutritivo dos fungos, promovendo um incremento na sua capacidade de adesão.^{29,51} Altos níveis de produção de hormônios femininos, especialmente a progesterona,

umentam os níveis de glicogênio no ambiente vaginal, o qual serve como excelente fonte de carbono para o crescimento e germinação de leveduras.³⁴ Como muitas mulheres são portadoras assintomáticas de *Candida* spp em pequenas quantidades, neste estado a levedura é considerada como comensal e as alterações no ambiente vaginal do hospedeiro são necessárias para que a mesma induza aos seus efeitos patológicos e a paciente desenvolva CVV (SOBEL, 1993).³⁵

A microbiota vaginal normal é rica em lactobacilos produtores de peróxido (bacilos de Doderlein), os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, presente principalmente no citoplasma das células escamosas do tipo intermediárias do epitélio vaginal, cuja produção é estimulada pelos hormônios sexuais femininos. Esse mecanismo propicia acidez adequada do ambiente vaginal (pH em torno de 4,5), dificultando a proliferação da maioria dos patógenos. As leveduras são uma exceção, uma vez que proliferam em ambiente ácido.⁵²

Fatores predisponentes do hospedeiro já bem conhecidos, incluindo *Diabetes mellitus*, imunodepressão, gravidez e terapias hormonais, apenas explicam parcialmente a CVVR. Uso de antibióticos de amplo espectro, dieta, uso de contraceptivo oral, higiene pessoal e práticas sexuais têm sido estudadas como fatores de risco para recorrência.⁴⁷ A função de comportamentos específicos como risco para CVVR não é clara, mas algumas investigações implicam sexo oral e aumento na frequência de intercurso sexual.⁵³

HORMÔNIOS SEXUAIS E O EPITÉLIO VAGINAL

As variações hormonais observadas durante o ciclo menstrual também afetam os epitélios escamoso e endocervical, sendo portanto reconhecíveis nos esfregaços cérvico-vaginais. Durante a fase estrogênica ou proliferativa, os esfregaços são compostos por agrupamentos de células escamosas intermediárias e por células superficiais dispersas. Com o passar dos dias, as células escamosas superficiais tornam-se mais numerosas, representando o tipo celular predominante no esfregaço quando da ovulação. Elas surgem de forma isolada, tem formato achatado e coloração eosinofílica e seus núcleos são picnóticos. Os eritrócitos, os leucócitos e os macrófagos, facilmente observados no início dessa fase, tornam-se cada vez mais raros e, finalmente, desaparecem.⁵⁴

A vagina é um órgão genital chave na resposta periférica a hormônios. Decréscimos em esteróides ovarianos devido a cirurgias ou menopausa natural são conhecidos por induzir alterações estruturais neste órgão que contribuem na patofisiologia genital. Com o início da

menopausa, ocorre uma redução do número de camadas no epitélio vaginal, incluindo uma diminuição de células intermediárias, que resulta em uma conseqüente redução da espessura epitelial.⁵⁵

Os roedores apresentam ciclo estral regular, caracterizado por mudanças morfológicas nos ovários, útero e vagina que se assemelham ao humano, apesar do ciclo ocorrer de quatro a seis dias, além de serem de fácil manejo. Assim, estes são animais extremamente úteis para utilização em modelos experimentais *in vivo* relativos ao sistema genital.⁵⁶ O comportamento dos epitélios e estroma cervical e vaginal de roedores em face à esteróides sexuais é semelhante ao humano.^{57,58} Em decorrência disto, ocorrem mudanças no padrão celular do epitélio vaginal na dependência da fase do ciclo estral, que é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro. Microscopicamente, um esfregaço proestro consiste de uma predominância de células epiteliais nucleadas; um esfregaço em estro consiste de células cornificadas anucleadas; um esfregaço em metaestro consiste da mesma proporção entre leucócitos, células epiteliais nucleadas e também às anucleadas e esfregaço tipo diestro consiste da predominância de leucócitos.^{59,60}

Durante a fase de estro, prolactina e os hormônios luteinizante e folículo estimulante permanecem baixos e aumentam durante a fase de proestro. Os níveis de estradiol começam a subir durante o metaestro, atingindo picos durante o proestro e retornando aos níveis basais durante o estro. A secreção de progesterona também aumenta durante o metaestro e diestro com posterior decréscimo.⁶¹

HORMÔNIOS SEXUAIS E CVV

Observações clínicas mostram que a CVV normalmente ocorre em mulheres durante a fase lútea do ciclo menstrual, quando estrogênio e progesterona estão em níveis elevados. Em contraste, mulheres na pré-menarca e na pós-menopausa que não recebem terapia de reposição hormonal raramente sofrem dessa infecção.⁶²

Já está estabelecido que o estrogênio é o hormônio reprodutivo que suporta e mantém a infecção experimental vaginal por *C. albicans*.⁶³⁻⁶⁵ Em estudos experimentais utilizando animais, infecções vaginais por *C. albicans* são dependentes do estado de pseudoestro, que corresponde a fase lútea do ciclo menstrual humano. Concentrações fisiológicas aproximadas de estrogênio foram tão capazes quanto concentrações suprafisiológicas para manutenção de infecções experimentais induzidas por um inóculo concentrado da levedura.⁶³

Adicionalmente, uma infecção persistente pode igualmente ocorrer se a terapia estrogênica acontecer entre 7 e 10 dias após a inoculação da levedura.⁶²

Em contraste ao estrogênio, no caso do tratamento com progesterona, a infecção experimental não se mantém por um período de tempo significante. A progesterona não causa variações no grau de infecção vaginal ou mesmo na cronicidade das infecções na presença de estrogênio. Assim, o estrogênio se mostra dominante em suportar infecções experimentais e não é afetado pela presença de progesterona.⁶⁵

JUSTIFICATIVA

Antes da era dos antibióticos e corticóides, o número de infecções por fungos era bastante reduzido. Isto é, particularmente verdade para as infecções por *Cândida* spp, especialmente por *C. albicans*, que se apresentava como comensal mas que, frente às defesas comprometidas do indivíduo, se instala, invade tecidos e provoca danos. Concomitantemente, tem sido observada uma sensível elevação na frequência de candidíase vulvovaginal (CVV) nos últimos anos, tornando este diagnóstico cada vez mais comum em ginecologia.

Por acometer milhões de mulheres anualmente, determinando grande desconforto, interferindo nas relações sexuais e afetivas e prejudicando o desempenho laboral, a CVV tem sido considerada um importante problema de saúde pública mundial. Para o tratamento de CVV têm sido empregados agentes imidazólicos e triazólicos, tanto tópicos quanto orais, entre eles fluconazol, miconazol, clotrimazol, itraconazol e cetoconazol, além dos agentes poliênicos (nistatina e algumas formulações contendo anfotericina B).

A nistatina é uma droga antifúngica largamente utilizada em formulações tópicas de baixo custo e disponível na maioria dos serviços públicos. Porém, estudos recentes encontraram alta frequência de leveduras com sensibilidade dose dependente, o que indica a necessidade de doses terapêuticas bem mais elevadas que as usuais desta droga para atingir resposta clínica satisfatória. O tratamento com os azólicos muitas vezes não é disponibilizado pelo sistema público de saúde devido ao elevado custo, dificultando o manejo de pacientes com CVV. Assim, existe a necessidade de se buscar novas alternativas eficazes e de baixo custo para esta patologia.

Produtos naturais têm sido usados tradicionalmente no controle de diversas doenças por serem fonte de muitos compostos ativos, que podem apresentar múltiplas ações terapêuticas, além de se constituírem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Neste sentido, *Sapindus saponaria* foi recentemente estudada e apresentou excelente atividade fungicida *in vitro* frente à *C. albicans* e *C. não-albicans*. Esta ação foi superior à do fluconazol, que é apenas fungistático e que já apresenta perfil de resistência. Frente a estes dados, *S. saponaria* pode representar futuramente uma importante alternativa para tratamento de CVV.

OBJETIVOS

GERAL

Estudo da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* e toxicidade dos extratos hidroalcoólico (EHA) e butanólico (EBUT) de *S. saponaria* frente a isolados vaginais de leveduras sensíveis e resistentes aos azólicos.

ESPECÍFICOS

Determinar a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos e também do fluconazol (FLU) e itraconazol (ITRA) frente a *C. albicans* e *C. glabrata* isoladas de pacientes com CVV, estabelecendo os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração fungicida mínima (CFM);

Induzir a infecção vaginal em ratas Wistar hiperestrogênicas com *C. albicans* sensível (CAS), *C. albicans* resistente (CAR) e *C. glabrata* resistente (CGR), todos em relação a composto azólico;

Acompanhar a infecção por cultura para leveduras e MEV;

Avaliar a atividade antifúngica *in vivo* dos extratos através do tratamento das ratas infectadas com EHA e EBUT a 1%, 2,5% e 5% e FLU 100 µg/mL a 1, 24 e 48 hr pós-infecção.

Avaliar a toxicidade de EHA e EBUT a 1%, 2,5%, 5% e 10% em células HeLa de linhagem cervical;

6. REFERÊNCIAS

1. Ribeiro A, Zani CL, Alves TMA, Mendes NM *et al.* Molluscicidal saponins from the pericarp of *Sapindus saponaria*. *Int J Pharmacognosy* 1995; **33**: 177-180.
2. Albiero ALM, Sertié JAA and Bacchi EM. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. *J Ethnopharmacol* 2002; **82**: 41-44.
3. Matos FJA. *Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. Fortaleza: Editora UFC, 2002.
4. Plantas Medicinais no Brasil: aspectos Gerais sobre legislação e comércio. Disponível, Http://www.traffic.org/publications/traffice_portu.pdf (Acesso em 16 jun 2003).
5. Ziarrusta GB. Vulvovaginal candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2002; **19**: 22-24.
6. Corsello S, Spinillo A, Osnengo G *et al.* An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; **110**: 66-72.
7. Lynch ME, Fidel PL. Effects of preinduced *Candida*-specific systemic cell-mediated immunity on experimental vaginal candidiasis. *Infec Immun* 1994; **62**: 1032-1038.
8. Sobel JD. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1993; **36**: 153-154.
9. Ferraza MHSH, Maluf MLF, Consolaro MEL *et al.* Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol obstet* 2005; **27(2)**: 58-63
10. Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE *et al.* Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Micopat* 2005; **159**: 501-507.
11. Dota KFD, Shinobu CS, Patussi EV *et al.* Susceptibility to vaginal yeast in most used antifungal in Maringá, Paraná, Brazil. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2008; **110**: 66-72.
12. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; **369**: 1961-1971.
13. Murgu M, Rodrigues-Filho E. *J Braz Chem Soc* 2006; **17**: 1281-1290.
14. Tsuzuki JK, Svidzinski TIE, Shinobu C *et al.* Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; **79**: 577-583.
15. Barroso GM. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1984.

16. Cronquist A. *An integrated system of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981.
17. Jolly AB. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 1977.
18. Nakayama KF, Hiroko F, Kasai R *et al*. Solubilizing properties of saponins from *Sapindus mukurossi*. *Chem Pharm Bull* 1986; **34**: 2209-2213.
19. Kimata H, Nakashima T, Kokubun S *et al*. Saponins of pericarps of *Sapindus mukurossi* and solubilization of monodesmosides by bidesmosides. *Chem Pharm Bull* 1983; **3**: 1998-2005.
20. Meyer ALA, Sarragiotto MH, Fujimura A *et al*. Cytotoxic activity of *Sapindus saponaria* L. fruits on Ehrlich ascetic tumos cells. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 2001; **20**: 169-171.
21. Simões, CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, 2000.
22. Quetin-Leclercq J, Balansard G, Bassler R *et al*. *Planta Med* 1992; **58**: 279-281.
23. Cavalcanti SB, Teles HL, Silva DHS *et al*. New tetracetylated oligosacharide deiterpene from *Cupania vernalis*. *J Braz Chem Soc* 2001; **12**: 413-416.
24. Rippon JW. *Medical Micology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia. Ed. Saunders, 1974.
25. Odds FC. Vulvovaginal *Candida* infection: current perspectives. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 1993; **2**: 174-179.
26. Kurtzmann CP, Fell JW. *The yeast. A taxonomic Study*. Amsterdam. Elsevier, 1998.
27. Winner HS, Hurley R. *Candida albicans*. London: Churchill, 1964.
28. Ghannoum MA, Radwan SS. *Candida adherence to ephitelial cells*. New York. Press, 1990
29. Lacaz CS. *Candidíases*. São Paulo. Ed. USP, 1980.
30. Brooks GF, Butel JS and Morse SA. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2000.
31. Chaffin WL, Lopez ribot JL, Casanova DG *et al*. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Molec Biol* 1998; **62**: 130-180.

32. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins. Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 2000.
33. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Rev Clin Microbiol* 1996; **9**:335-348.
34. Sobel JD. Vaginal infections in adult women. *Med Clin North Am* 1990; **74**: 1575-1602.
35. Sobel JD. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1993; **36**: 153-162.
36. Pichová I, Pavlicková J, Dostál J *et al*. Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 2699-2677.
37. Chong PP, Lee YL, Ian BC. Genetic relatedness fo *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 657-666.
38. Dan M, Poch F and Levin D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. *Med Mycol* 2002; **40**: 303-313.
39. Consolaro MEL, Albertoni TA, Yoshida CS *et al*. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2001; **21**: 202-205.
40. Spinillo A, Carrata L, Pizzoli G. Reccurent vaginal candidiasis. Result of a cohort study of sexual transmission and intestinal reservoir. *J Repr Med* 1992; **37**: 343-347.
41. Sobel JD, Faro S, Force RW *et al*. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gyn* 1998; **178**: 203-211.
42. Rosa MI, Rumel D. Fatores associados a candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2004; **26**: 65-70.
43. Almeida-Filho GL. Candidíase, In: Passos MRL. *Doenças sexualmente transmissíveis* .Rio de Janeiro, 1995.
44. Salvatore, CA. Candidíase vulvovaginal, In: Lacaz, CS. *Candidíases*. São Paulo: Editora USP, 1980.
45. Marrazo JM. Vulvovaginal candidiasis – over the counter doesn't seen to lead to resistance. *BMJ* 2003; **326**: 993-994.
46. Patel DA, Gillespie B, Sobel JD *et al*. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy. Results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gyn* 2004; **190**: 644-653.

47. Sobel JD, Kapernick OS, Zerkos M *et al.* Treatment of complicated *Candida* vaginitis: comparison of single and sequential doses of Fluconazole. *Am J Obstet Gynecol* 2001; **185**: 383-389.
48. Fernandes CE, Machado RB. Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos de candidíase vulvovaginal. *Rev Bras Medicina* 1996; **7**: 100-104.
49. Nardin ME, Morano S, Ahumada C *et al.* Prevalencia de la candidiasis vulvovaginal y su relacion con algunos factores de riesco. *Rev Arg Micol* 2000; **2**: 93-96.
50. Goswami D, Goswami R, Banerjee U *et al.* Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. *Antimic Ag and Chem.* 2005; **49(6)**: 2336-2342.
51. Pereira IDB, Souza AES, Feio RS *et al.* Vulvovaginites por *Candida albicans* em pacientes ambulatoriais do hospital universitário Betina Ferro de Souza. *Rev Bras Anal Clin* 1996; **28**: 53-54.
52. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and ethiological factors. *Int Journal Gynaec Obstet* 2000; **71**: 21-27.
53. Reed BD, Gorenflo DW, Gillespie B *et al.* Sexual behavior and other risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *J Whintern's Health Genit B Med* 2000; **9**:645-655.
54. Gompel C, Koss LEG. *Citopatologia ginecológica com correlações histológicas e clínicas.*São Paulo: Rocca, 2006.
55. Bibbo M. *Comprehensive cytopatology.*Piladelphia: Saunder Company, 1997.
56. Mendonça FS, Simões MJ, Camargo LM *et al.* Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. *Ciência animal brasileira* 2007; **8**: 313-318.
57. Kaushic C, Zhou F, Murdin AD *et al.* Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia tracomatis* infection in the female reproductive tract. *Infec Immun* 2000; **68**: 4207-4216.
58. Cruz FCM, Soares-Junior JM, Mosquete R *et al.* Aspectos morfológicos da junção escamo-colunar de ratas em estro permanente e tratadas com a associação de estrogênio e glicocorticóide. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2004; **26**: 597-602.
59. Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associates phenomena. *Memories of University of California* 1922; **6**: 1-148.

- 60.** Mandl AM. The phases of the estrous cycle in the adult white rat. *J Exp Biol* 1951; **28**: 576-584.
- 61.** Smith MS, Freeman ME and Neill JD. The control of progesterone during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; **96**: 219-226.
- 62.** Fidel JR PL, Cutright J, Steele C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infec Immun* 2000; **68**: 651-657.
- 63.** Wozniak KL, Floyd L and Fidel PL. Candida-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice. *Infec Immun* 2002; **70**: 5790-5799.
- 64.** Clemons KV, Spearow JL, Parmar R *et al.* Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans* vaginitis correlates with host estrogen sensitivity. *Infec Immun* 2004; **72**: 4878-4880.
- 65.** De Bernardis F, Lucciarini R, Boccanera M *et al.* Phenotypic and functional characterization of vaginal dendritic cells in a rat model of *Candida albicans* vaginitis. *Infec Immun* 2006; **74(7)**: 4282-4294.

CAPÍTULO II

Artigo: “ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EXTRATOS DE *Sapindus saponaria* FRENTE A ISOLADOS VAGINAIS SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS AZÓLICOS”.

Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Sapindus saponaria* frente a isolados vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos

Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of the extracts of *Sapindus saponaria* against *Candida* sp vaginalis susceptible and resistant to azoles.

Edílson Damke¹, Thaisa Yumi Violin², Izabel Cristina Piloto Ferreira², Thâmara Aline Bertoni, Márcia R. Batista¹, Lucélia Donati³, Terezinha I. E. Svidzinski¹, Márcia E. L. Consolaro^{1*}

¹Departamento de Análises Clínicas, ²Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87025-210, Maringá, Paraná, Brasil.

³Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico - Jardim das Américas, Caixa Postal 19031, 81531-900 - Curitiba – PR.

*Corresponding author. Tel: +55-44 3261-4795; Fax: +55-44-3261-5860; E-mail: melconsolaro@uem.br

Título resumido: Atividade antifúngica de *Sapindus saponaria*

Palavras-chave: *Sapindus. saponaria*, leveduras vaginais, atividade antifúngica, *in vivo*

Sinopse

Objetivos: Estudo de toxicidade e atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* dos extratos hidroalcoólico (EHA) e butanólico (EBUT) de *Sapindus saponaria* frente à *Candida* spp vaginais sensíveis e resistentes aos azólicos.

Métodos: Foi determinada a atividade antifúngica *in vitro* de EHA, EBUT, fluconazol (FLU) e itraconazol (ITRA) por microdiluição em caldo, obtendo valores de concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) de 46 *C. albicans* e 10 *C. glabrata* isoladas de candidíase vulvovaginal (CVV). A CVV foi induzida em ratas Wistar hiperestrogênicas com *C. albicans* sensível (CAS), resistente (CAR) e *C. glabrata* resistente (CGR) a compostos azólicos. Os animais foram tratados intravaginalmente com EHA ou EBUT 0,1 mL a 1%, 2,5% e 5% e FLU 100 µg/mL a 1, 24 e 48 horas após a infecção, acompanhada por cultura e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A toxicidade foi avaliada em células HeLa de linhagem cervical.

Resultados: Os extratos mostraram atividade inibitória e fungicida *in vitro* frente a todos os isolados, com valores de CIM e CFM pouco maiores para as *C. glabrata*. A infecção por CAS, CAR e CGR foi eliminada até 21 dias pós-infecção, com até 5% de EHA e EBUT, sem ação citotóxica.

Conclusões: Nossos resultados apontam que EHA e EBUT de *S. saponaria* constituem uma fonte muito promissora para o desenvolvimento de droga antifúngica para CVV.

1 **Introdução**

2 Produtos naturais têm sido usados tradicionalmente no controle de diversas doenças por serem
3 fonte de muitos compostos ativos, que podem apresentar múltiplas ações terapêuticas, além de
4 se constituírem modelos para a síntese de um grande número de fármacos.¹ Neste sentido, os
5 frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), cujas árvores de tamanho médio ocorrem nos
6 trópicos, principalmente na América e na Índia, tem demonstrado forte atividade
7 antimicrobiana.²⁻⁴

8 Recentemente foi realizado estudo de isolamento e identificação dos principais
9 constituintes do extrato butanólico (EBUT) do pericarpo de *S. saponaria*, que determinou à
10 presença de duas saponinas triterpênicas acetiladas, a saponina S1 como sendo hederagenina-
11 3-O-(3,4-di-O-acetil- β -D-xilopiranosil)-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-
12 arabinopiranosídeo, e a saponina S2 como hederagenina 3-O-(4-O-acetil- β -D-xilopiranosil)-
13 (1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosídeo (Figura 1a), e também um
14 oligoglicosídeo acíclico-1 (OGSA-1) (Figura 1b).⁵ Já foi também demonstrado por membros
15 da presente equipe de pesquisa excelente ação inibitória *in vitro* dos extratos hidroalcoólico
16 (EHA) e EBUT frente a leveduras *Candida albicans* e *Candida não-albicans* isoladas de
17 pacientes com candidíase vulvovaginal (CVV),⁵ sinalizando para a possibilidade de utilização
18 desta planta como agente antifúngico nesta patologia. Apesar destas recentes investigações
19 sobre os constituintes e propriedades biológicas de *S. saponaria*, ainda são escassos os
20 estudos realizados *in vivo* para estabelecer a correlação com os resultados *in vitro*.

21 A CVV é ocasionada pelo crescimento anormal destes fungos do tipo leveduras na
22 mucosa do sistema genital feminino.⁶ Acomete milhões de mulheres anualmente, cuja
23 sintomatologia leva à grande desconforto, interferindo nas relações sexuais, afetivas e no
24 desempenho laboral, sendo considerada um importante problema de saúde pública mundial.⁷

25 O manejo de pacientes com CVV torna-se muitas vezes difícil em decorrência das escassas
26 opções terapêuticas disponíveis, além de já ter sido detectada resistência cruzada de *C.*
27 *albicans* vaginais ao itraconazol e fluconazol, que são agentes antifúngicos de escolha para
28 tratamento desta patologia.^{8,9}

29 Tendo em vista a necessidade de novas opções terapêuticas para CVV e a promissora
30 atividade inibitória *in vitro* de *S. saponaria* L. frente a leveduras, nós conduzimos um estudo
31 de atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* e toxicidade dos seus extratos EHA e EBUT frente a
32 isolados vaginais de *Candida* spp sensíveis e resistentes aos azólicos.

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49 **Materiais e Métodos**

50 *Obtenção da planta*

51 Pericarpos secos dos frutos de *S. saponaria* foram coletados no campus da Universidade
52 Estadual de Maringá/Paraná/Brazil (UEM). A planta foi identificada pelo Departamento de
53 Botânica da UEM e uma exsicata foi depositada no Herbário da instituição (HUM 11710).

54

55 *Preparação do extrato hidroalcólico (EHA)*

56 O EHA foi preparado a partir de 459,7g de pericarpo rasurado com solução hidroetanólica
57 90% (1:9, v/v) pelo processo de maceração dinâmica com agitação mecânica constante. A
58 extração foi realizada em frasco âmbar mantido à temperatura ambiente durante seis dias
59 consecutivos por 6 horas diárias. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida em
60 evaporador rotatório, à temperatura de 40°C. Após a eliminação do solvente, o extrato foi
61 congelado em nitrogênio líquido e liofilizado em aparelho modelo 1-2 Christ Alpha. O extrato
62 liofilizado foi armazenado em frasco plástico fechado e mantido sob temperatura de
63 congelamento.

64

65 *Fracionamento do EHA e obtenção do extrato butanólico (EBUT)*

66 O EHA do pericarpo (50,15 g) foi submetido à cromatografia em coluna ($\phi_i = 4,0$ cm) de
67 sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha), eluída com solventes de polaridade crescente
68 (Synth,) como: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Os solventes foram
69 evaporados em temperatura de 40°C e em seguida, congelados em nitrogênio líquido e
70 liofilizados em aparelho modelo 1-2 Christ Alpha. As frações liofilizadas diclorometânica
71 (FPD), hexânica (FPHex), acetato de etila (FPAc) e metanólica (FPMe), foram
72 acondicionadas em recipientes fechados e mantidas sob temperatura de congelamento. O

73 extrato metanólico foi suspenso em H₂O e então extraído com n-butanol, que através da
74 evaporação gerou um resíduo sólido (28,9 g) (EBUT), também liofilizado.

75

76 *Isolados de leveduras*

77 Para os experimentos de susceptibilidade *in vitro*, foram testados 56 isolados vaginais de
78 pacientes com CVV, sendo 46 *C. albicans* e 10 *C. glabrata*, que fazem parte de um banco de
79 leveduras do Laboratório de Micologia Médica/UEM. Neste banco de leveduras, alíquotas
80 das mesmas encontram-se estocadas desde a sua identificação em água glicerinada 10% a -20
81 °C. Estas leveduras foram isoladas e identificadas no ano de 2008 por métodos clássicos^{10,11} e
82 também por seqüência de rDNA.¹² Antes de cada experimento, os isolados foram reativados
83 em Sabouraud Dextrose Caldo (SDC) (Difco, Detroit, USA) a 25°C por 24/48h, semeados em
84 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, USA) com cloranfenicol (2,0 mg/mL) e
85 novamente incubados nas condições anteriores. Uma nova sub-cultura era realizada em
86 CHROMágar Candida® (Probac, France) para assegurar a pureza dos isolados.

87 Para os testes de susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos pelo método de
88 microdiluição em caldo, foi utilizada uma cepa de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) como
89 levedura de referência.

90

91 *Preparação dos inóculos das leveduras para os testes in vitro.*

92 Foi preparado um inóculo de cada levedura recém-reativada em salina estéril, ajustando a
93 densidade celular por meio de espectrofotômetro (Spectronic 70, Bausch & Lomb, USA) em
94 530 nm com 90±2% de transmitância. Essa turvação é compatível com 1,0 a 5,0x10⁶ unidades
95 formadoras de colônias por mL (UFC/mL), a partir da qual eram realizadas novas diluições:

96 1:50 em salina estéril e, na sequência, 1:20 em RPMI (Sigma, Steinheim, Germany), obtendo
97 assim o inóculo final desejado de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

98 Foram preparadas soluções estoque de fluconazol (FLU) (5000 mg/mL; Pfizer Inc.,
99 NY, NY, USA) e itraconazol (ITRA) (1000 mg/mL; Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ,
100 USA. A partir da primeira solução preparada, novas soluções estoque de FLU e ITRA foram
101 preparadas 10 vezes mais concentradas que a concentração final do teste e diluídas em RPMI-
102 1640 com L-glutamine, livre de bicarbonato, suplementado com 2% de dextrose e tamponado
103 a pH 7.0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) 0.165 M (Sigma, Steinheim,
104 Germany). Os extratos brutos liofilizados EHA e EBUT foram ressuspensos em água
105 destilada estéril para obtenção de solução a 10mg/mL para ambos os extratos.

106

107 *Teste de susceptibilidade in vitro aos antifúngicos*

108 Os testes de susceptibilidade ao FLU e ITRA foram realizados de acordo com o método de
109 microdiluição em caldo preconizado pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute,
110 2002), e para EHA e EBUT este mesmo documento, com adaptações para produtos
111 naturais.^{13, 14}

112 Os testes foram realizados em microplacas plásticas esterilizadas (TPP Zellkultur Test
113 Plate 96F, Switzerland) contendo 96 poços organizados em oito séries identificadas de A a H,
114 cada qual com doze poços numerados de 1 a 12. Cada linha (A-H) correspondeu a um isolado
115 e recebeu 100µL do inóculo aferido, exceto no décimo segundo, referente ao controle
116 negativo. Alíquotas de 100µL de RPMI foram distribuídas da coluna 2 até a 11. Alíquotas de
117 100µL de FLU, ITRA, EHA ou EBUT, preparados como descrito anteriormente, foram
118 adicionadas nas colunas das microplacas e a partir da coluna 2 foi realizada uma diluição

119 seriada na razão 2 até o décimo poço (diluição entre 0,125 e 64,0 µg/mL para FLU, 0,03 e
120 16,0 µg/mL para ITRA e 9,0 e 5000,0 µg/mL para EHA e EBUT).

121 Para cada isolado testado foram incluídos controles negativos (somente RPMI) e
122 positivos (RPMI e inóculo, sem adição dos antifúngicos) de crescimento e da possível ação do
123 diluente dos extratos ou drogas (somente butanol, etanol ou polietilenoglicol 400 com o
124 inóculo). Em cada placa foi incluída uma cepa de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) como
125 levedura de referência. As placas assim montadas foram incubadas em estufa a 35°C com
126 monitoramento diário. Após 48 hr foi realizada a leitura para FLU e ITRA em leitora de
127 microplacas (Asys Hitech GmbH, Eugendorf/Áustria) e após 72 hr para os extratos, através de
128 comparação visual por reflexão em espelho.

129 A CIM para FLU/ITRA foi determinada considerando a menor concentração da droga
130 capaz de inibir 50% do crescimento de cada levedura, tendo como referência o seu respectivo
131 controle positivo.¹³ Foram considerados sensíveis isolados apresentando CIM \leq 8,0 µg/mL
132 para FLU e \leq 0,125 µg/mL para ITRA; sensíveis-dose-dependentes (SDD) entre 16,0 e 32,0
133 µg/mL para FLU e 0,25 e 0,5 µg/mL para ITRA; resistentes \geq 64,0 µg/mL para FLU e \geq 1,0
134 µg/mL para ITRA. Para EHA e EBUT, a CIM foi considerada como a menor diluição do
135 extrato capaz de inibir 100% do crescimento da levedura, tendo como referência o seu
136 respectivo controle positivo.¹⁴ As CIM₅₀ e CIM₉₀ para drogas e extratos foram definidas como
137 a CIM capaz de inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.¹³

138 Para determinar a CFM, foram realizadas sub-culturas de todos os poços com inibição
139 do crescimento através da semeadura de 5,0 µL em SDA/25°C. Após 48 horas, as UFC foram
140 contadas para determinar a viabilidade. Todos os ensaios para determinação das CIM e CFM
141 foram realizados em duplicata, independentemente. A CFM para EHA e EBUT foi

142 considerada como a menor concentração que impediu o crescimento de 99,9% ou mais do
143 inóculo.

144

145 *Infecção vaginal experimental*

146 Para a indução da infecção vaginal, foi utilizado um modelo em ratas previamente descrito,¹⁵
147 com algumas adaptações. Os experimentos foram realizados com três isolados de levedura
148 selecionados conforme os resultados dos testes *in vitro*: *C. albicans* sensível a FLU e ITRA
149 (CAS), *C. albicans* resistente ao ITRA (CAR) e *C. glabrata* resistente a ambos os
150 antifúngicos (CGR).

151 Os experimentos foram realizados com grupos de cinco ratas para cada isolado, em
152 duplicata e em dois dias distintos. Foram usadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) não
153 ooforectomizadas, de 200 a 300g, com 70 dias de vida (Biotério Central da UEM), nas quais
154 foram feitas injeções subcutâneas de valerato de estradiol (Sigma, Steinheim, Germany) na
155 concentração de 0,2 mg/semana/rata. Seis dias após a primeira injeção do hormônio, todos os
156 animais foram inoculados intravaginalmente com 10^8 leveduras/mL de cada isolado testado,
157 em 0,1 mL de salina estéril. O inóculo foi dispensado dentro da cavidade vaginal através das
158 ponteiros de pipeta automática calibrada (Finnpipette, Labsystems, Brasil). Para o preparo das
159 suspensões, as leveduras foram previamente reativadas como descrito anteriormente para os
160 testes de susceptibilidade *in vitro*. Colônias de leveduras foram acrescentadas à solução
161 salina, contadas em câmara de Neubauer e diluídas até obtenção do inóculo com a
162 concentração de microrganismos desejada.

163

164

165

166 *Acompanhamento da infecção e tratamento*

167 A cinética da infecção vaginal por *Candida* foi monitorada em cada animal através do número
168 de UFC/mL no fluido vaginal obtido com auxílio de pipeta plástica, após administração
169 intravaginal de 20 µl de salina estéril. Para o tratamento, EHA e EBUT foram administrados
170 intravaginalmente (0,1 mL a 1%, 2,5% e 5,0% em água destilada) a 1, 24 e 48 hr após a
171 indução da infecção vaginal. Ratas recebendo FLU (3 doses de 100 µg intravaginalmente nos
172 mesmos períodos dos extratos) ou salina estéril serviram como controles positivo e negativo
173 do tratamento, respectivamente. A infecção foi monitorada por até 21 dias após a sua indução
174 com amostras do fluido vaginal coletadas a 24 e 48 hr e a partir de então nos dias 5, 7, 14 e
175 21. A experimentação animal realizada nesta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Conduta
176 Ética no Uso de Animais da UEM (Protocolo n ° 013/2006, parecer n ° 050/2006).

177

178 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

179 Foi realizada MEV do epitélio vaginal de ratas infectadas com CAS, CAR e CGR antes e após
180 tratamento com os extratos de *S. saponaria*. Após 48 horas de infecção e também ao final do
181 tratamento, as ratas a serem analisadas por MEV foram sacrificadas por overdose de
182 anestésicos (Ketamina e Xylazina, Parke-Davis Co, Morris Plains, NJ, USA). A vagina foi
183 removida e após lavagens com salina estéril as peças foram fixadas em solução de
184 glutaraldeído 2,5% dissolvido em tampão cacodilato 0,1 M (Sigma Chemical, St. Louis, USA)
185 e desidratadas em série crescente de solução alcoólica. O ponto crítico foi obtido em Balzers
186 CPD-010 (Balzers instruments, Balzers, Liechtenstein) com gás carbônico. Em seguida foi
187 feita a metalização em ouro em Balzers SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers,
188 Liechtenstein). A documentação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL-

189 JSM 6360 LV (Jeol Ltda, 33 Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia Eletrônica–
190 Universidade Federal do Paraná.

191

192 *Ensaio de toxicidade em células*

193 Células HeLa de linhagem cervical humana foram cultivadas previamente em meio mínimo
194 de Eagle (MEM, PPA Laboratories, Germany) suplementado com 10% de soro fetal bovino
195 (SFB, Laborclin, Brasil), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1 mM de piruvato de
196 sódio, a 37 °C em estufa úmida com 5% de CO₂. Na fase exponencial de crescimento, as
197 células foram diluídas no mesmo meio e plaqueadas em volumes de 0,2 mL de uma suspensão
198 de 2,5 X10⁵ células por poço em uma placa com 24 poços (Corning Glass, New York, USA),
199 e incubadas nas mesmas condições por uma noite para a formação da monocamada celular. O
200 meio de cultura foi substituído pelas diluições seriadas dos extratos EHA ou EBUT a 1%,
201 2,5%, 5% e 10%, em triplicata. Os poços controle continham apenas células e meio de
202 cultura. A microplaca foi novamente incubada a 37 °C por 24 h, os extratos substituídos por
203 solução tripsina-EDTA para desfazer a adesão celular e a seguir por 0,2 ml de PBS com 50%
204 de trypan blue. Células vivas e mortas de cada poço foram contadas por microscopia de luz.

205

206 *Análise estatística*

207 Os resultados foram analisados usando test t e teste de Tukey`s para múltiplas
208 comparações das diferentes situações experimentais de tratamento *in vivo*. O nível de
209 significância foi fixado em 5%. Os testes foram realizados no software Graph Pad Prism®
210 versão 3.0 (Graph Pad Software Inc.).

211

212

213 *Resultados e discussão*

214 Análises fitoquímicas de várias espécies do gênero *Sapindus* mostraram que elas são
215 ricas em saponinas triterpenóides, possuindo ácido oleanóico e hederagenina como agliconas.⁴
216 Estas saponinas tem demonstrado atividade antifúngica contra *C. glabrata*, *C. albicans*,
217 *Trichosporon beigeli*, *Penicillium avelaneum*, *Pyricularia oryzae*, *Cryptococcus neoformans*,
218 *Coccidioides immitis* e *Saccharomyces cerevisiae*, bem como contra os dermatófitos
219 *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*.¹⁶⁻¹⁸ Verificaram também que a
220 hederagenina isolada dos pericarpos de *Sapindus mukurossi* exibe potente atividade
221 antifúngica frente à *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*,
222 *Microsporum canis* e *Candida albicans*.

223 Os constituintes já identificados para *S. saponaria*, ou seja, S1, S2 e OGASA-01, são
224 muito possivelmente as substâncias responsáveis pela sua ação antifúngica. Devido às suas
225 atividades antimicrobianas, as saponinas têm sido alvo de vários estudos com o intuito de
226 obter opções fitoterápicas para tratamentos de infecções, possivelmente menos tóxicas, mais
227 eficazes e acessíveis economicamente.¹⁹⁻²¹ Segundo Francis et al. (2002),²² o principal
228 mecanismo para a atividade antifúngica das saponinas é a interação das mesmas com esteróis
229 de membrana fúngica. Este mesmo estudo cita plantas cujas saponinas já apresentaram
230 comprovada atividade antifúngica, entre elas *Kalopanax pinctus*, contra *C. albicans* e
231 *Cryptococcus neoformans*, e *Asparagus officinalis*, contra diferentes tipos de fungos.

232 Quanto aos testes *in vitro*, dentre as *C. albicans* a maioria mostrou-se sensível a FLU e
233 ITRA simultaneamente (n=38) e poucos resistentes ao ITRA (n=3), mas não houve resistência
234 ao FLU. Outros estudos tem também demonstrado recentemente resistência de isolados
235 vaginais de *C. albicans* a azólicos.^{9,14} Entre as *C. glabrata* foi observado resistência a FLU
236 (n=2) e ITRA (n=4) e aos dois antifúngicos simultaneamente (n=2) (Tabela 1). Outros estudos

237 *in vitro* têm demonstrado que isolados vaginais de *C. não-albicans*, principalmente *C.*
238 *glabrata*, são intrinsecamente menos sensíveis aos azólicos que às *C. albicans*.^{23,9}

239 EHA e EBUT inibiram *in vitro* todos os isolados de leveduras testados, incluindo
240 aqueles susceptíveis-dose-dependentes (SDD) ao FLU e resistentes ao FLU e/ou ITRA. Os
241 valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ foram mais elevados para FLU, ITRA, EHA E EBUT nos isolados
242 de *C. glabrata*. Porém, a variação da CIM para EHA e EBUT foi à mesma para as *C. albicans*
243 (9,0-≤5,0x10³ µg/ml) e muito semelhante para as *C. glabrata* (75,0-≤5,0x10³ µg/ml e 36,0-
244 ≤5,0x10³ µg/ml, respectivamente) (Tabela 1). Duarte et al.²⁴ propuseram uma classificação
245 para a atividade inibitória de extratos de plantas baseada nos valores de CIM, sendo que CIM
246 abaixo de 500 µg/mL representa forte inibição, CIM entre 600 e 1500 µg/mL inibição
247 moderada, e CIM acima de 1600 µg/mL fraca inibição. Seguindo esta classificação, conforme
248 os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ obtidos para os isolados de *C. albicans*, EHA e EBUT
249 demonstraram forte atividade inibitória, e para *C. glabrata* entre forte e moderada atividade
250 (Tabela 1).

251 Os dois extratos também exibiram atividade fungicida *in vitro*, para todos os isolados
252 de leveduras testados, sejam eles sensíveis ou resistentes. Houve pequena variação da CFM,
253 sendo de 310 µg/ml para EHA e EBUT para as *C. albicans* e de 620-≤5,0x10³ µg/ml dos dois
254 extratos para as *C. glabrata* (Tabela 1). Os valores de CFM apresentaram-se dentro da faixa
255 de variação da CIM e próximos aos de CIM₉₀, o que demonstra que às atividades inibitória e
256 fungicida são muito próximas, comprovando a excelente atividade antifúngica *in vitro*. Tuzuki
257 et al.⁵ também já haviam demonstrado atividades inibitória e fungicida *in vitro* dos extratos de
258 *S. saponaria* frente a alguns isolados vaginais de *C. albicans* e *C. não-albicans*.

259 Os resultados *in vitro*, principalmente em relação à atividade fungicida, são
260 extremamente importantes, uma vez os derivados poliênicos são as únicas drogas fungicidas

261 atualmente disponíveis, compreendendo nistatina e anfotericina B. O uso destes
262 medicamentos é limitado, devido principalmente à sua toxicidade e ao surgimento de alguns
263 isolados com susceptibilidade dose-dependência ou resistência.^{9,14} Deve-se ressaltar também
264 que o FLU, antifúngico mais frequentemente utilizado no tratamento da CVV, é apenas
265 fungistático. Assim, a demonstração da excelente atividade fungicida apresentada pelos
266 extratos de *S. saponaria* nos parece muito promissora, mesmo não tendo sido utilizados em
267 nossos experimentos uma substância já purificada e com seu exato mecanismo de ação.

268 Os resultados *in vivo* confirmaram os *in vitro*, uma vez que a infecção por CAS, CAR
269 e CGR foi eliminada até 21 dias pós-infecção, com concentração máxima de 5% de EHA e
270 EBUT. Nestes experimentos, as ratas controle negativo do tratamento permaneceram
271 infectadas até o final de todos os ensaios (UFC/mL entre 96 e $1,0 \times 10^3$) (Figuras 2a, b, c).

272 Na infecção por CAS, a atividade inibitória do FLU foi superior apenas à de EHA e
273 EBUT a 1% ($p < 0,001$), que nesta concentração apresentaram comportamento semelhante
274 ($p > 0,05$), inibiram o crescimento fúngico quando comparado com o controle negativo, mas
275 não levaram à eliminação da infecção. Os tratamentos com EHA e EBUT a 2,5% e 5,0%
276 mostraram semelhante e excelente perfil de inibição da infecção, comparável com FLU
277 ($p > 0,05$) (Figura 2 a).

278 Na infecção por CAR, FLU mostrou melhor atividade inibitória que EHA a 1% e 2,5%
279 ($p < 0,001$) e que EBUT a 1,0% ($p < 0,001$), que não levaram à eliminação da infecção,
280 mostrando comportamento semelhante ao do controle negativo do tratamento ($p > 0,05$). Para
281 EHA, a concentração de 5% apresentou a melhor atividade inibitória ($p < 0,001$) e para EBUT
282 as de 2,5% e 5,0%. Não houve diferença na ação destas duas últimas concentrações e também
283 entre os dois extratos a 5% ($p > 0,05$) (Figura 2b). É importante ressaltar que CAR é resistente
284 *in vitro* apenas ao ITRA e o controle positivo do tratamento foi realizado com FLU, que

285 apesar de também ser um azólico, mostrou excelente atividade *in vivo*. Não foi realizado o
286 tratamento com o próprio ITRA, pois não existem formulações vaginais deste antifúngico.

287 Para CGR, a atividade inibitória de EHA e EBUT em todas as concentrações testadas
288 foi excelente e semelhante à do FLU ($p > 0,05$). Já a 1% de ambos os extratos houve
289 decréscimo significativo na contagem de CFU nos primeiros dias da infecção ($p < 0,05$), que
290 foi eliminada no dia 14 do experimento para EHA e 21 para EBUT. A 2,5% e 5,0%, ambos
291 os extratos mostraram a mesma atividade, com eliminação da infecção no dia 5 do
292 experimento ($p > 0,05$), enquanto que FLU no dia 7 (Figura 2c). Estes resultados são
293 surpreendentes, uma vez que o manejo de pacientes com CVV causada por *C. glabrata* é
294 bastante complicado devido a sua reduzida sensibilidade intrínseca aos azólicos.^{23,9} Além
295 disto, deve-se considerar que esta levedura é a segunda em frequência de isolamento nas
296 CVV, precedida pela *C. albicans* e que em algumas populações tem aumentado o isolamento
297 de leveduras *C. não-albicans*,²⁵⁻²⁶ ratificando a importante atividade antifúngica de *S.*
298 *saponaria*.

299 Assim, de maneira geral, EHA na concentração de 5% e EBUT nas de 2,5% e 5%
300 foram capazes de eliminar a infecção induzida pelas diferentes leveduras testadas. Os
301 resultados evidenciam também a importância da correta identificação das leveduras nos casos
302 de CVV, bem como da determinação do seu perfil de susceptibilidade *in vitro* aos
303 antifúngicos, pois existem claramente diferenças no perfil de susceptibilidade *in vitro* e *in*
304 *vivo* entre os diferentes isolados.

305 As imagens por MEV do epitélio vaginal das ratas hiperestrogênicas infectadas por
306 CAS, CAR e CGR mostraram aspectos morfológicos indistinguíveis. Em decorrência disto,
307 foram selecionadas fotos de CAR, que mostrou um perfil de eliminação da infecção com
308 concentrações um pouco mais elevadas dos extratos que para CAS e CGR. Na Figura 4

309 podem ser observadas várias leveduras de *C. albicans* aderidas ao epitélio (a). Em (b) e (c)
310 maiores detalhes da adesão de *C. albicans* as escamas anucleadas do epitélio vaginal,
311 características do estado de pseudo-estro e em (d) epitélio constituído apenas de escamas
312 anucleadas, sem leveduras, antes e após tratamento com FLU e com os extratos de *S.*
313 *saponaria*. Desta forma, a MEV ratificou os resultados da cultura para leveduras quanto ao
314 desenvolvimento da infecção experimental bem como a sua eliminação pós-tratamento nas
315 condições testadas.

316 A percentagem de células HeLa vivas não variou entre controles e testes, nos quais as mesmas
317 foram expostas a diferentes concentrações de EHA e EBUT ($p > 0,05$). A média de células
318 vivas nas concentrações de EHA foi de $94,22 \pm 0,1555$ e nas concentrações de EBUT $94,41 \pm$
319 $0,1131$ (IC 95% = $-0,6295$ a $0,2575$) (Figura 3). Estes resultados indicam ausência de
320 toxicidade dos extratos para as células cervicais, sinalizando positivamente para o
321 desenvolvimento de formulações vaginais/cervicais antifúngicas seguras com *S. saponaria*.
322 Jacobs²⁷ já havia demonstrado a ausência de toxicidade celular de *S. saponaria*. É interessante
323 observar que em células tumorais a toxicidade parece mudar, uma vez que Quetin-Leclerq et
324 al²⁸ demonstraram atividade citotóxica de saponinas isoladas de algumas espécies vegetais,
325 dentre estas *S. mukorossi*, em células de melanoma B16 e HeLa de tumor humano, e Meyer et
326 al.²⁹ atividade citotóxica do extrato etanólico de *S. saponaria* em células de tumor ascítico.

327 Assim, nossos resultados mostraram que EHA e EBUT de *S. saponaria* apresentam
328 atividade inibitória e fungicida *in vitro*, além de excelente atividade *in vivo* sobre isolados
329 vaginais de *C. glabrata* resistente e *C. albicans* sensíveis e resistentes aos azólicos.
330 Considerando também a ausência de citotoxicidade e as pequenas concentrações dos extratos
331 necessárias para a eliminação da infecção *in vivo*, EHA e EBUT constituem uma fonte muito
332 promissora para o desenvolvimento de drogas antifúngicas para tratamento da CVV. Porém,

333 existe a necessidade da realização de estudos pré-clínicos e clínicos, e de determinação dos
334 mecanismos de atividade antifúngica para validar o uso de *S. saponaria* como um produto
335 fitoterápico.

336

337 *Apoio financeiro*

338 O presente trabalho teve apoio financeiro da Fundação Araucária.

339 *Conflito de interesses*

340 Os autores declaram não possuir nenhum tipo de conflito de interesse.

341 *Declaração de transparência*

342 Nenhum dos autores possui interesse comercial e financeiro relacionado à indústria
343 farmacêutica.

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

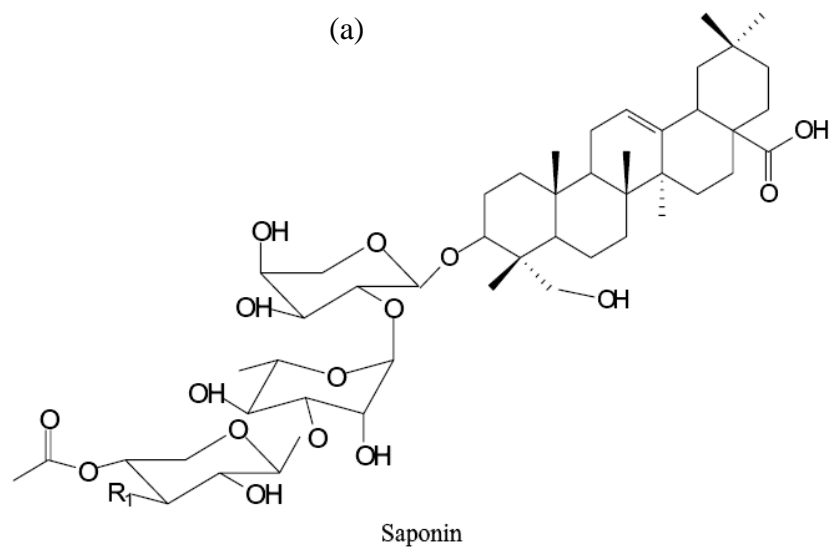
Referências

1. Matos FJA. *Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. Fortaleza: Editora UFC, 2002.
2. Ribeiro A, Zani CL, Alves TMA, Mendes NM *et al*. Molluscicidal saponins from the pericarp of *Sapindus saponaria*. *Int J Pharmacognosy* 1995; **33**: 177-180.
3. Albiero ALM, Sertié JAA and Bacchi EM. Antiulcer activity of *Sapindus saponaria* L. in the rat. *J Ethnopharmacol* 2002; **82**: 41-44.
4. Murgu M, Rodrigues-Filho E. Hydroxylation of a hederagenin derived saponin by a *Xylareaceous* fungus found in fruits of *Sapindus saponaria*. *J Braz Chem Soc* 2006; **17**: 1281-1290.
5. Tzuzuki JK, Svidzinski TIE, Shinobu CS *et al*. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; **79**: 577-583.
6. Sobel JD. Candidal Vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1997; **36**: 153-212.
7. Corsello S, Spinillo A, Osnengo G *et al*. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; **110**: 66-72.
8. Sojakova M, Liptajova D, Borovsky M *et al*. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeasts isolated from Slovakia. *Mycopathologia* 2004; **157**: 163-169.

9. Dota KFD, Shinobu CS, Patussi EV *et al.* Susceptibility to vaginal yeast in most used antifungal in Maringá, Paraná, Brazil. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2008; **110**: 66-72.
10. Larone DH. *Medically important fungi. A guide to identification.* Washington: ASM Press, 2005.
11. Kurtzmann CP, Fell FW. *The yeast. A taxonomy study.* Amsterdam: Elsevier, 1998.
12. Sugita T, Kurosaka S, Yagitate M *et al.* Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 2002; **46**: 881-883.
13. Clinical Laboratory Standard Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: approved standard M27-A2.* CLSI, Wayne, PA, USA, 2002.
14. Dota KFD, Faria MGI, Bruschi ML *et al.* Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *Journal Alternative and Complementary Medicine* 2009; (in press).
15. De Bernardis F, Lucciarini R, Boccanera M *et al.* Phenotypic and functional characterization of vaginal dendritic cells in a rat model of *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun* 2006; **74**: 4282-4294.
16. Lee MW, Kim S, Han DR. Antifungal activity of modified hederagenin from the leaves of *Kalopanax pictum* var. Chinese. *Biol Pharm Bull* 2001; **24**: 718-719.

17. Du Z, Zhu N, Ze-Ren W *et al.* Two new antifungal saponins from the Tibetan herbal medicine *Clematis tangutica*. *Planta Med* 2003; **69**: 547-551.
18. Tamura Y, Mizutani K, Ikeda T *et al.* Antimicrobial activities of saponins of pericarps of *Sapindus mukurossi* on dermatophytes. *Nat Med* 2001; **55(1)**: 11-16.
19. Barile E, Bonanomi G, Antignani V *et al.* Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry* 2007; **68(5)**: 596-603.
20. Kuete V, Tangmouo JG, Penlap Beng V *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 2006; **104**: 8-11.
21. Mandal P, Sinha Babu SP, Mandal NC. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. *Fitoterapia* 2005; **76**: 462-465.
22. Francis G, Zohar K, Harinder PS *et al.* The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* 2002; **88**: 587-605.
23. Sobel JD, Faro S, Force RW *et al.* Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gyn* 1998; **178**: 203-211.
24. Duarte MCT, Figueira M, Sartorato A *et al.* *Journ of Ethnopharm* 2005; **97**: 305-311.
25. Ferraza MHSH, Maluf MLF, Consolaro MEL *et al.* Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol obstet* 2005; **27(2)**: 58-63.
26. Consolaro MEL, Albertoni TA, Yoshida CS *et al.* Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa, Parana, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2004; **21**: 202-205.

27. Jacobs WA. The saponin occurring in *Sapindus saponaria* L. and *Sapindus mukorossi* utilis. *J Biol Chem* 1925; **64**: 379-381
28. Quetin-Leclercq J, Elias R, Balansard G *et al.* Cytotoxic activity of some triterpenoid saponins. *Planta Med* 1992; **58(3)**: 279-281.
29. Meyer ALA, Sarragiotto MH, Fujimura A *et al.* Cytotoxic activity of *Sapindus saponaria* L. fruits on Ehrlich Ascitic Tumor cells. *Acta Farm Bon* 2001; **20(3)** 169-171.



Saponin 1	$R_1 = \text{OH}$
Saponin 2	$R_1 = \text{OAc}$

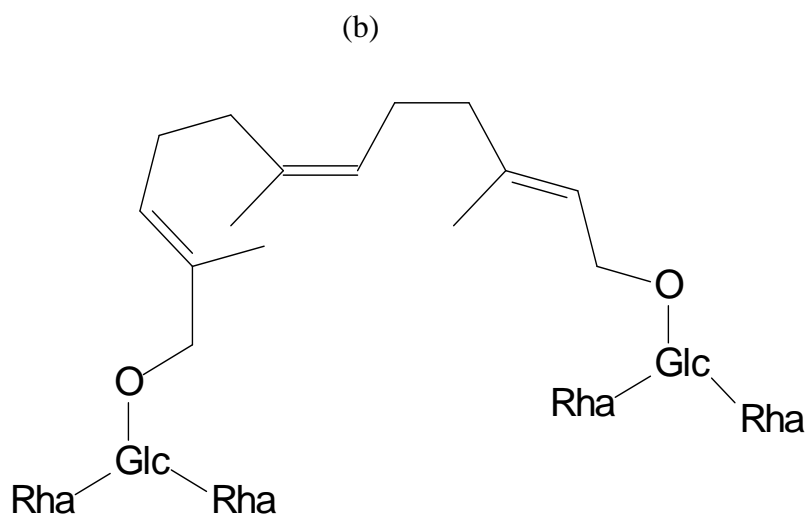


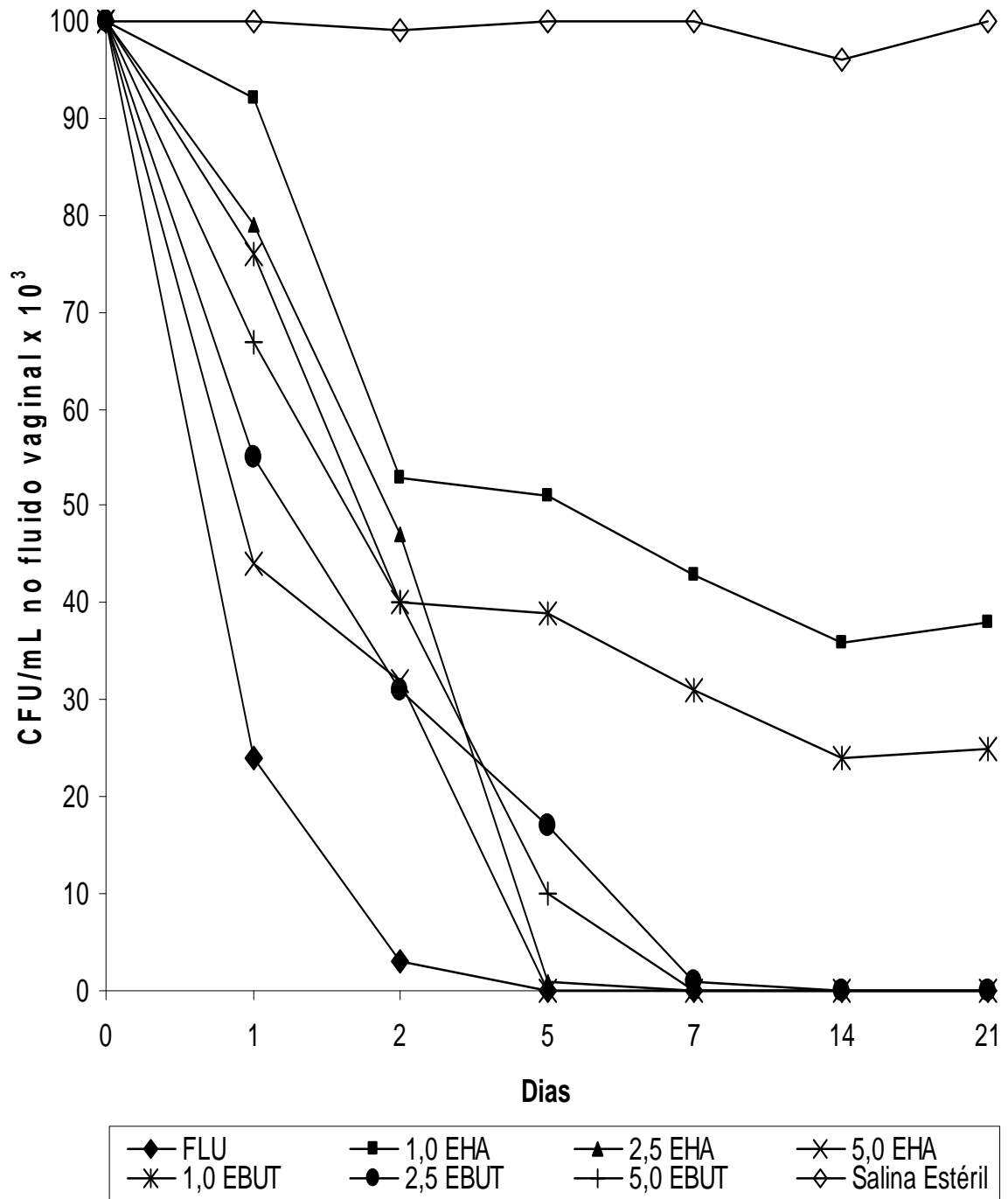
Figura 1. Estruturas químicas dos compostos identificados em *S. saponaria*. (a) Saponinas 1 e 2. (b) Oligoglicosídeo Acíclico-1.

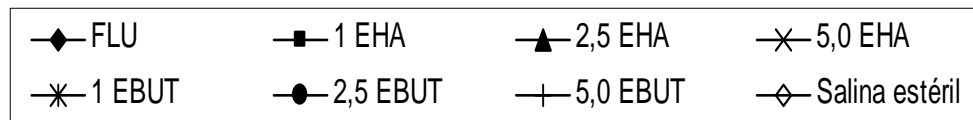
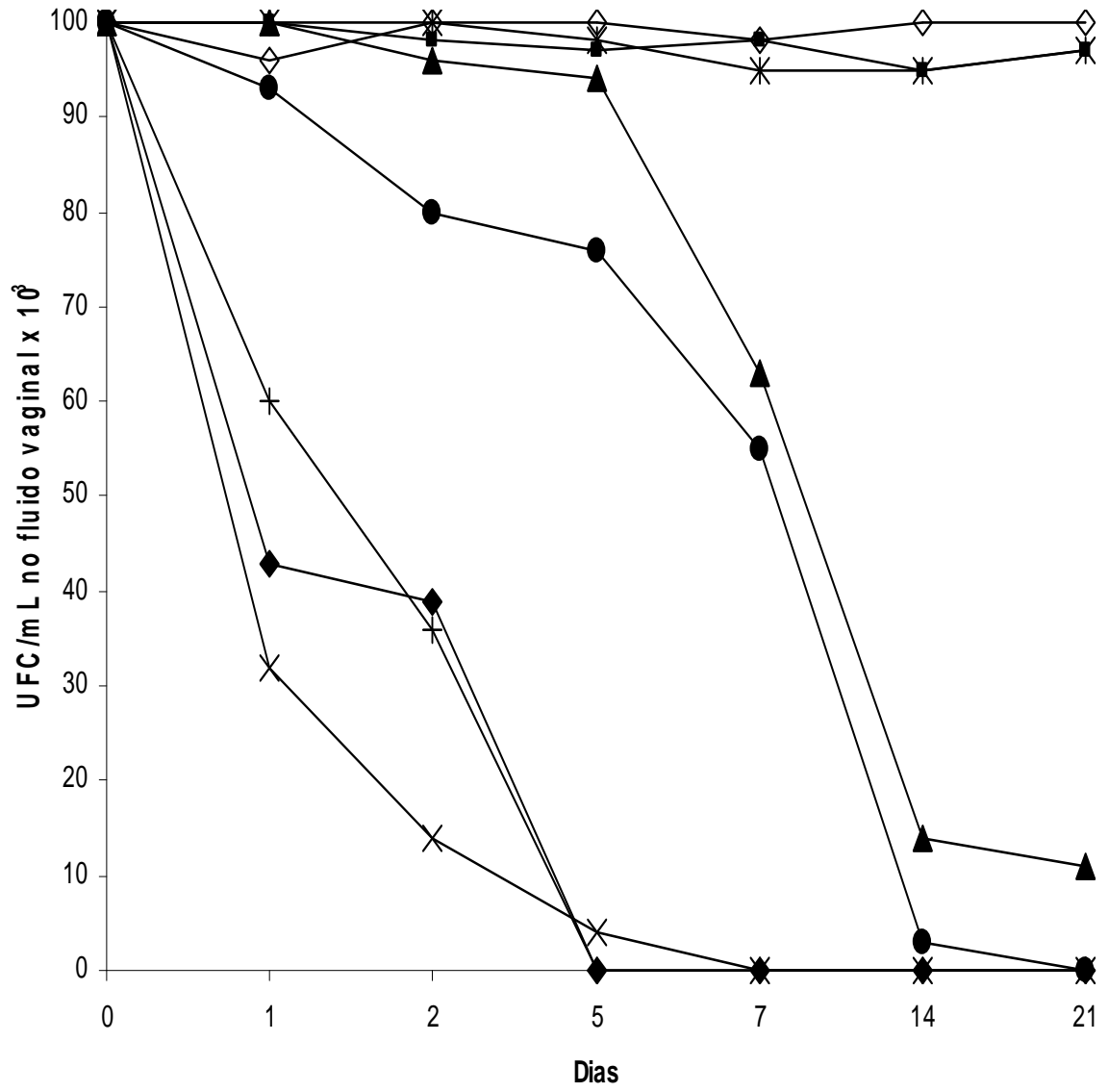
Tabela 1. Atividade anti-*Candida* sp *in vitro* dos extratos hidroalcoólico (EHA) e butanólico (EBUT) de *Sapindus saponaria* em comparação com fluconazol (FLU) e itraconazol (ITRA).

	Drogas	<i>C. albicans</i> (46) ^b	<i>C. glabrata</i> (10) ^b
^a CIM ₅₀	FLU	0,25	8,0
	ITRA	0,03	0,25
	EHA	9,0	36,0
	EBUT	36,0	75,0
CIM ₉₀	FLU	16,0	64,0
	ITRA	0,5	8,0
	EHA	310,0	620,0
	EBUT	310,0	5,0x10 ³
Variação da CIM	FLU	0,125-32 (43) ^c , (3) ^d , (0) ^e	2,0-64,0 (5) ^c , (4) ^d , (1) ^e
	ITRA	0,03-1,0 (38) ^c , (5) ^d , (3) ^e	0,125-8 (3) ^c , (3) ^d , (4) ^e
	EHA	9,0-≤5,0x10 ³	36,0-≤5,0x10 ³
	EBUT	9,0-≤5,0x10 ³	75,0-≤5,0x10 ³
^f CFM	EHA	310,0	620,0-≤5,0x10 ³
	EBUT	310,0	620,0-≤5,0x10 ³

^a Concentração inibitória mínima-CIM (µg/mL); CIM₅₀ e CIM₉₀ para drogas e extratos: CIM capaz de inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente; em parênteses, o número de isolados testados (b), o número de isolados sensíveis (c), o número de isolados susceptíveis-dose-dependentes (d) e o número de isolados resistentes (e); isolados sensíveis: CIM ≤ 8,0 µg/mL para FLU e ≤ 0,125 µg/mL para ITRA; isolados susceptíveis-dose-dependentes: CIM

entre 16,0 e 32,0 $\mu\text{g/ml}$ para FLU e 0,25 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para ITRA; isolados resistentes: CIM \geq 64,0 $\mu\text{g/ml}$ para FLU e \geq 1,0 $\mu\text{g/ml}$ para ITRA. ^f Concentração fungicida mínima-CFM.

(2a)
CAS

(2b)
CAR

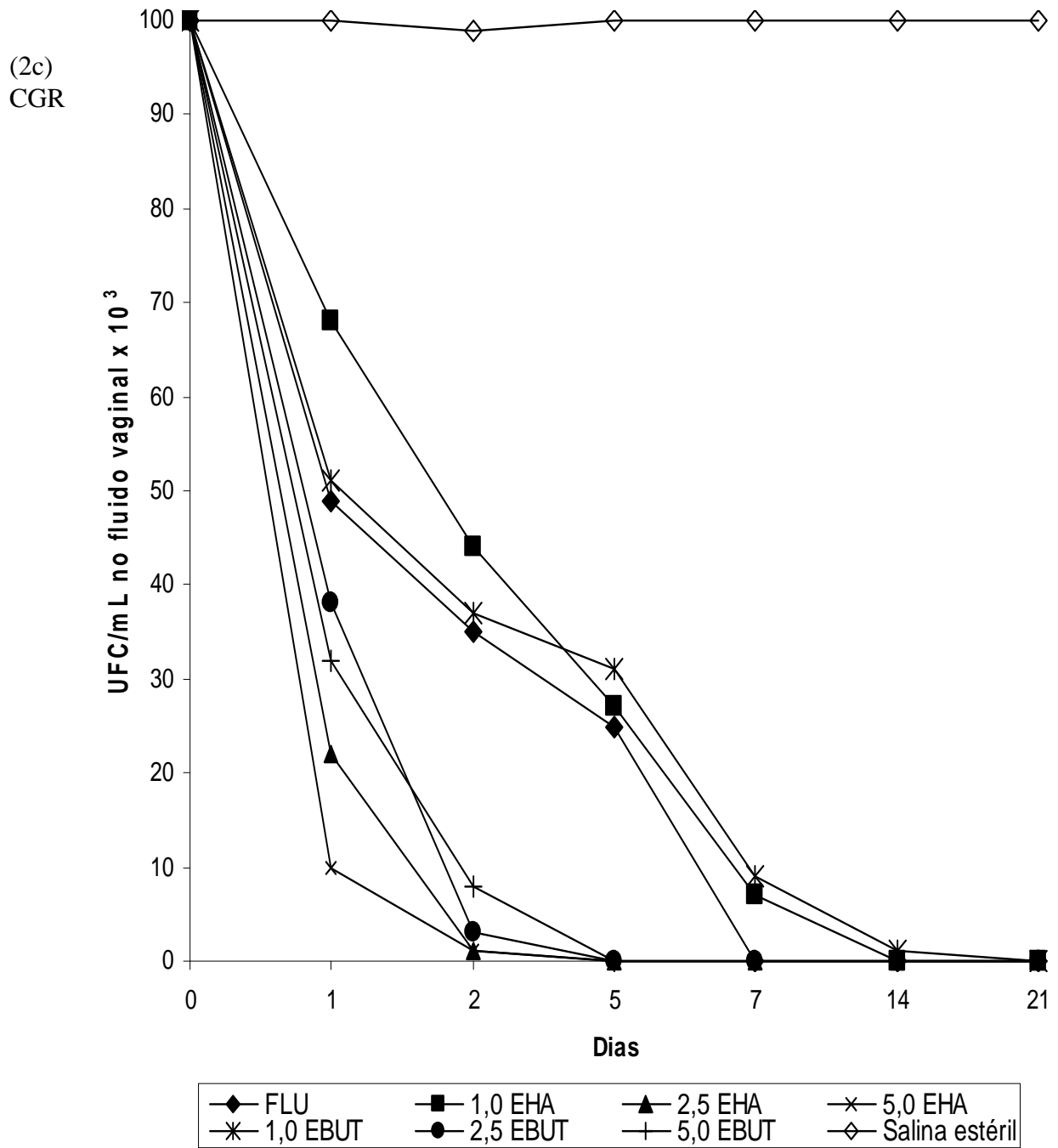


Figura 2. Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de leveduras no exudato vaginal de ratas Wistar tratadas intravaginalmente com: extrato bruto aquoso (EHA) e extrato butanólico (EBUT) de *Sapindus saponaria* a 1,0%, 2,5% e 5,0 %, 100 µg de itraconazol ou água destilada estéril a 1, 24 e 48 hr após a indução da infecção vaginal, acompanhadas por até 21 dias. Cada curva representa à média (\pm desvio padrão) das UFC de cinco ratas, em dois experimentos independentes. Infecção vaginal experimental por (a) *Candida albicans* sensível a itraconazol e fluconazol (CAS), (b) *C. albicans* resistente ao itraconazol (CAR) e (c) *C. glabrata* resistente a itraconazol e fluconazol (CGR).

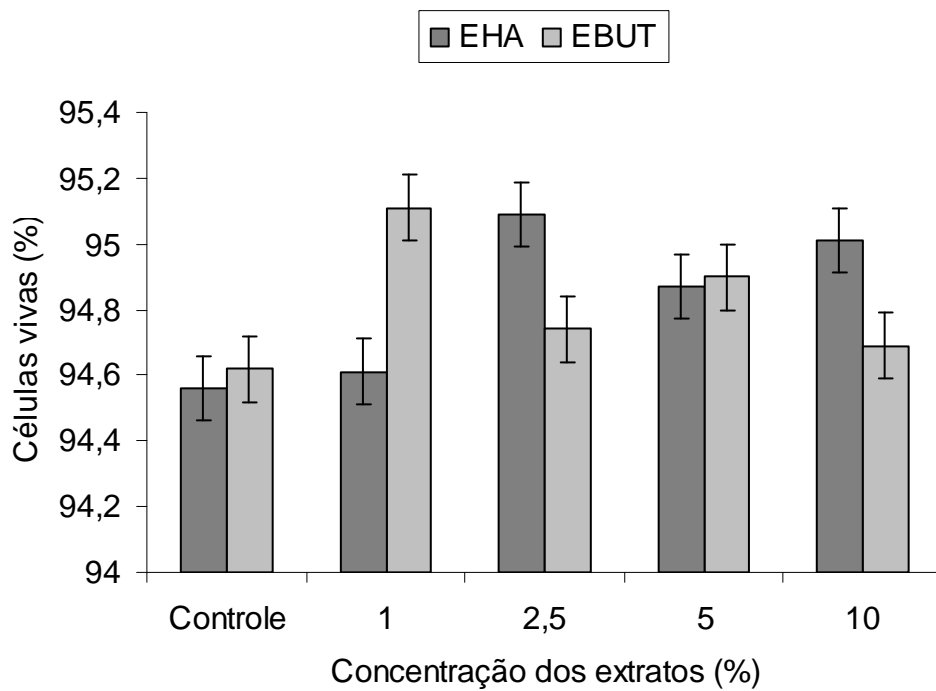


Figura 3. Percentagem de células HeLa vivas após contato com diferentes concentrações dos extratos aquoso (EHA) e butanólico (EBUT) de *S. saponaria*, sem diferença significativa entre os controles os extratos em todas as concentrações testadas ($p > 0,05$). Média de células vivas nas concentrações de EHA= $94,22 \pm 0,1555$; Média de células vivas nas concentrações de EBUT= $94,41 \pm 0,1131$ (IC 95%= $-0,6295$ a $0,2575$).

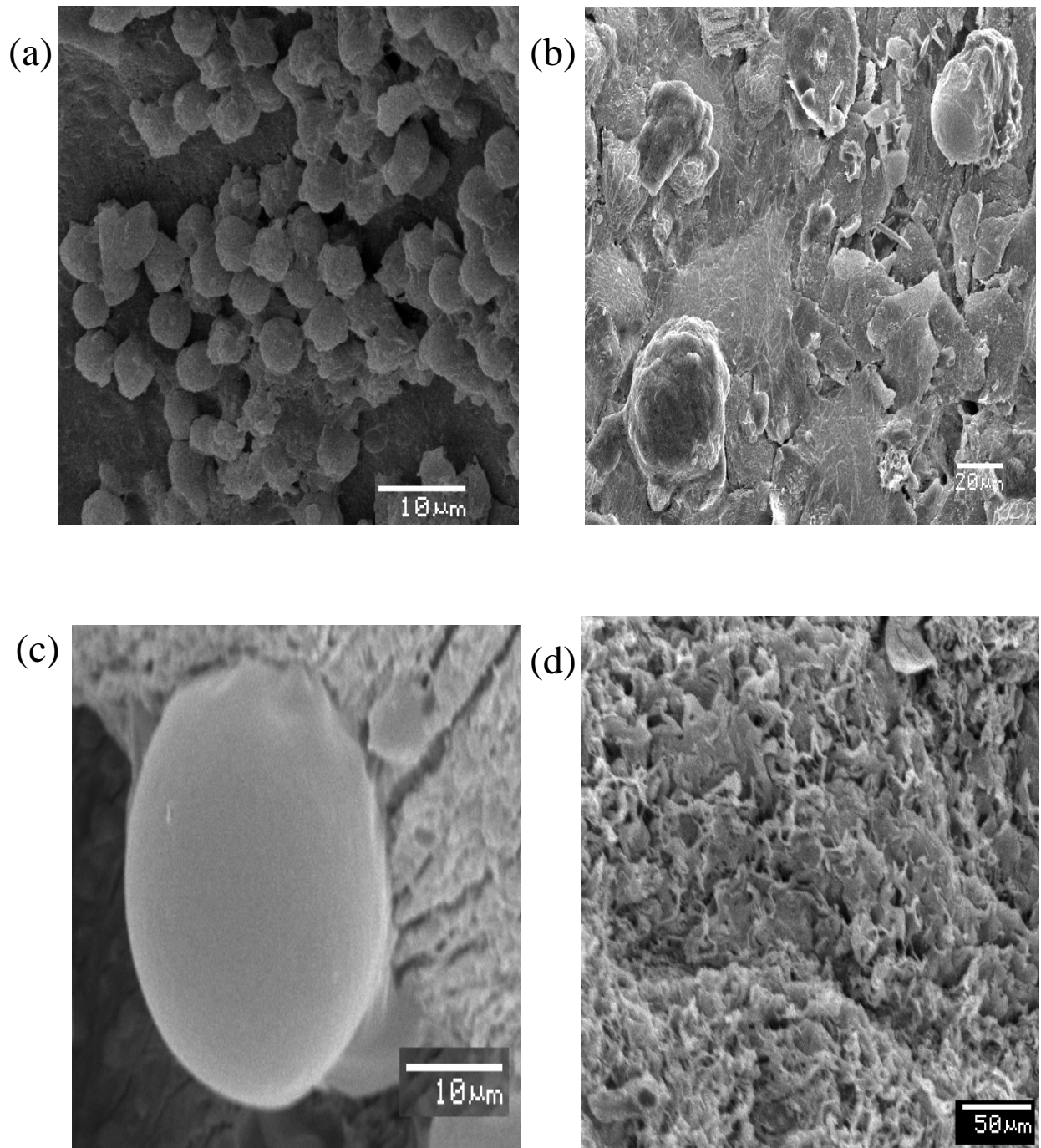


Figura 4. MEV do epitélio vaginal de ratas Wistar hiperestrogênicas após infecção com *Candida albicans*. Em (a) várias leveduras aderidas ao epitélio. Em (b) e (c) maiores detalhes da adesão de *C. albicans* às escamas anucleadas do epitélio vaginal, características do estado

de pseudo-estro e em (d) epitélio constituído apenas de escamas anucleadas, sem leveduras, após tratamento com fluconazol e com os extratos de *Sapindus saponaria*.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que EHA e EBUT de *S. saponaria* apresentam atividade inibitória e fungicida *in vitro*, além de excelente atividade *in vivo* sobre isolados vaginais de *C. glabrata* resistente e *C. albicans* sensíveis e resistentes aos azólicos. Considerando também a ausência de citotoxicidade e as pequenas concentrações dos extratos necessárias para a eliminação da infecção *in vivo*, EHA e EBUT constituem uma fonte muito promissora para o desenvolvimento de drogas antifúngicas para tratamento da CVV. Porém, existe a necessidade da realização de estudos pré-clínicos e clínicos, e de determinação dos mecanismos de atividade antifúngica para validar o uso de *S. saponaria* como um produto fitoterápico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Desenvolver e testar em animais formas farmacêuticas com os extratos de *S. saponaria*;

Desenvolver e testar em mulheres formas farmacêuticas com os extratos;

Avaliar o potencial antifúngico sobre leveduras que causam outras patologias;

Avaliar o potencial antifúngico sobre outros tipos de fungos patogênicos;

Avaliar a toxicidade dos extratos por outras metodologias com vistas ao desenvolvimento e formas farmacêuticas de administração oral.