

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ARTHUR LADEIRA MACEDO

ATIVIDADES ANTIBACTERIANA CONTRA
Gardnerella vaginalis, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DE EXTRATOS DE FOLHAS DE
Gossypium barbadense L. (Malvaceae).

JUIZ DE FORA, MG

2013

ARTHUR LADEIRA MACEDO

ATIVIDADES ANTIBACTERIANA CONTRA
Gardnerella vaginalis, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *Gossypium barbadense* L. (Malvaceae).

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Moreira Chedier

JUIZ DE FORA

2013

Macedo, Arthur Ladeira.

Atividades antibacteriana contra *Gardnerella vaginalis*, anti-inflamatória e antiproliferativa in vitro de extratos de folhas de *Gossypium barbadense* L. (Malvaceae). / Arthur Ladeira Macedo. -- 2013.

108 p. : il.

Orientador: Daniel Sales Pimenta

Coorientadora: Luciana Moreira Chedier

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. Algodoeiro. 2. *Gardnerella vaginalis*. 3. *Gossypium barbadense* L.. 4. inflamação. 5. leucorreia. I. Pimenta, Daniel Sales, orient. II. Chedier, Luciana Moreira, coorient. III. Título.

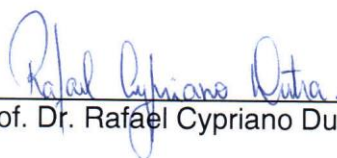
Atividades antibacteriana contra *Gardnerella vaginalis*, anti-inflamatória e antiproliferativa *in vitro* de extratos de folhas de *Gossypium barbadense* L. (Malvaceae).

Arthur Ladeira Macedo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta
CO-ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Luciana Moreira Chedier

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 17/07/2013


Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra


Prof.^a Dr.^a Elita Scio Fontes


Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta

“Sempre me dizem quando fico sério
‘Ele é um homem e entende tudo’
Por dentro com a alma atarantada
Sou uma criança e não entendo nada.”

ErasmO Carlos

***Aos meus pais Norival e Simone, à minha irmã Maryah e
à minha Karla, pelo apoio incondicional e
conselhos de grande valia, dedico.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Norival e Simone por minha formação como pessoa, pelo apoio, amor e compreensão.

À minha irmã, Maryah, pelo amor e incentivo.

À minha namorada, Karla, por estar ao meu lado, mesmo quando longe.

Aos Professores Dr. Daniel Sales Pimenta e Dr.^a Luciana Moreira Chedier, pelo apadrinhamento acadêmico e ensinamentos.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Fitoquímica, pela ajuda e convivência, em especial, à aluna de Iniciação Científica, Lorena, pela ajuda durante todos os experimentos.

Aos Professores Dr. Cláudio Galuppo Diniz, Dr.^a Elita Scio Fontes, Dr. José Otávio do Amaral Correa, Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar, Dr.^a Valquíria Pereira de Medeiros, pelo fornecimento da estrutura para a realização de parte deste estudo e aos seus alunos pela ajuda no trabalho de bancada e acolhimento em seus laboratórios.

À equipe da Plataforma Analítica de Farmanguinhos (FIOCRUZ), pelas análises realizadas, em especial à Eliane Gonçalves de Carvalho.

Ao Prof. Dr. Alviclér Magalhães do IQM da UNICAMP pelos espectros de RMN de última hora.

Aos amigos da segunda turma do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFJF pelo compartilhamento de sabedorias e experiências.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos grandes ensinamentos passados.

Aos meus amigos da Turma do Bota, presentes em todos os momentos, pela amizade e descontração em momentos de tensão.

À CAPES pela bolsa concedida.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa pudesse ser completada.

RESUMO

Folhas de *Gossypium barbadense* L. (Malvaceae), conhecido como algodoeiro, são utilizadas popularmente para o tratamento de corrimento vaginal. A principal etiologia é a vaginose bacteriana (VB). VB é uma infecção complexa, na qual várias bactérias anaeróbias estão presentes, sendo a de maior incidência *Gardnerella vaginalis*. VB causa o aumento do corrimento vaginal, lise de células epiteliais vaginais, podendo causar parto prematuro (PPM), e outras complicações durante a gravidez. O mecanismo de PPM não está totalmente elucidado, porém uma proposta bem aceita é a de inflamação das membranas fetais. No presente trabalho avaliaram-se as atividades de extratos brutos e frações semi-purificadas de folhas de *G. barbadense*: 1) contra *G. vaginalis*, 2) citotóxica contra *Artemia salina*, 3) na viabilidade celular de células saudáveis (3T3) e cancerosas (MCF7) e 4) anti-inflamatória no perfil de citocinas (IL-17, TNF- α e INF- γ) e NO. Além disso, foi realizado o perfil cromatográfico dos extratos e frações semi-purificadas em CCD, CLAE-DAD e CG-EM e o isolamento de um flavonoide que foi identificado utilizando-se RMN ^1H , COSY e HSQC como sendo uma quercetina com substituição na hidroxila do carbono 3. Os extratos e frações polares mostram-se ricos em flavonoides, enquanto os apolares mostraram-se ricos em terpenoides e ácidos graxos saturados e insaturados. A fração diclorometânica (FDM) do extrato bruto metanólico (EBM) apresentou substâncias dos extratos polares e apolares. EBM e FDM apresentaram atividade expressiva contra *G. vaginalis*, aparentemente devido ao sinergismo entre flavonoides e substâncias apolares. EBM e FDM não apresentaram citotoxicidade contra *A. salina* e, em conjunto com as frações hexânica (FH), e em acetato de etila de EBM (FAE), apresentaram aumento da viabilidade de 3T3 e o extrato bruto aquoso e FDM reduziram a de MCF7. O extrato bruto hexânico (EBH) apresentou melhor atividade anti-inflamatória. Os demais extratos apresentaram menor atividade. Extratos e frações de folhas de *G. barbadense*, principalmente EBM e FDM, apresentam potencial para futuros estudos *in vivo* visando a confirmação das atividades em sistemas biológicos complexos.

Palavras-chave: Algodoeiro, *Gardnerella vaginalis*, *Gossypium barbadense* L., inflamação, leucorreia, Malvaceae.

ABSTRACT

Gossypium barbadense L. (Malvaceae) leaves, known as cotton, have been used for vaginal discharge treatment. Bacterial vaginosis (BV) is the major etiology. BV is a complex infection, involving a wide variety of anaerobes, being *Gardnerella vaginalis* the most incident. BV increases the amount of vaginal discharge, causing epithelial cells' lysis, it can cause, also, preterm delivery (PTD) and other complications during pregnancy, as well. PTD mechanism is not totally known, but the inflammation of fetal membranes is one accepted theory. The present work evaluated 1) antimicrobial against *G. vaginalis*, 2) cytotoxicity against *Artemia salina*, 3) cell viability of health (3T3) and cancer (MCF7) cells and 4) anti-inflammatory evaluating cytokines (IL-17, TNF- α e INF- γ) and NO activities of crude extracts and semi-purified fractions of *G. barbadense* leaves. Moreover, the chromatographic profile of crude extracts and semi-purified fractions were evaluated by TLC, HPLC-DAD and GC-MS. A flavonoid was isolated, being elucidated as a replaced quercetin, probably in hydroxyl group of carbon 3, by NMR ^1H , COSY and HSQC. Flavonoids were abundant in polar extracts and fractions, and fatty acids and terpenoids were abundant in nonpolar ones. Polar and nonpolar compounds were observed in dichloromethane fraction (DMF) of methanol crude extract (MCE). MCE and DMF showed a expressive activity against *G. vaginalis* and the synergism between flavonoids and nonpolar substances appear to be crucial. MCE and DMF do not show cytotoxicity against *A. salina*, and with the hexane fraction (HF) and ethyl acetate fraction (EAF) of MCE showed an increase in cell viability of 3T3. Aqueous crude extract and DMF reduced the cell viability of MCF7. A most promising anti-inflammatory activity was presented by hexanic crude extract. Other crude extracts showed a less intense activity. *G. barbadense* leaves extracts and semi-purified fractions, chiefly MCE and DMF, presented good potential for future *in vivo* studies seeking the confirmation of these activities in complex biological systems.

Keywords: cotton, *Gardnerella vaginalis*, *Gossypium barbadense* L., inflammation, leucorrhea, Malvaceae.

LISTA DE ABREVIATURAS

3T3	- Fibroblasto de camundongo
ATCC	- <i>American type culture collection</i>
CCD	- Cromatografia de camada delgada
CCDP	- Cromatografia de camada delgada preparativa
CL ₅₀	- Concentração letal para 50% da amostra
CLAE-DAD	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo (<i>diode array detector</i>)
CG-EM	- Cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CIM	- Concentração inibitória mínima
CVV	- Candidíase vulvovaginal
<i>d</i>	- Dupleto
<i>dd</i>	- Duplo dupleto
DST	- Doença sexualmente transmissível
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EBH	- Extrato bruto hexânico
EBH ₂ O	- Extrato bruto aquoso
EBM	- Extrato bruto metanólico
EI	- Ionização por <i>spray</i> de elétrons (<i>electronspray ionization</i>)
ELISA	- Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAE	- Fração em acetato de etila
FDM	- Fração diclorometânica
FH	- Fração hexânica
IL	- Interleucina
IFN- γ	- Interferon <i>gamma</i>
MCF7	- Adenocarcinoma mamário humano
MTT	- Brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil
NO	- Óxido nítrico
NP/PEG	- Difenilaminoborato/polietilenoglicol (<i>natural products-polyethylene glycol reagent</i>)

PBS	- Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate tamponed salin</i>)
pH	- Potencial hidrogeniônico
ppm	- partes por milhão
PPM	- Parto prematuro
T _H	- T auxiliar (<i>T helper</i>)
THF	- Tetraidrofurano
TNF- α	- Fator de necrose tumoral <i>alfa</i> (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
RA	- Resíduo aquoso
Rf	- Fator de retenção (<i>retention factor</i>)
RMN	- Ressonância magnética nuclear
UV	- Ultravioleta
VB	- Vaginose bacteriana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Primeiros flavonoides isolados do gênero <i>Gossypium</i>	20
Figura 2	Estrutura química do gossipol e outros terpenoides provenientes da mesma rota biossintética, encontrada no gênero <i>Gossypium</i>	22
Figura 3	Fotomicrografias mostrando a citotoxicidade de diferentes patógenos associados à vaginose bacteriana em células de epitélio vaginal ME-180.	31
Figura 4	Micrografia de alta resolução de <i>clue cell</i>	33
Figura 5	Esquema de obtenção de extratos e frações do extrato metanólico de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L.	43
Figura 6	Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. e suas frações semi-purificadas frente aos diferentes reveladores cromatográficos.	58
Figura 7	Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico, resíduo aquoso do extrato bruto metanólico e extrato bruto aquoso das folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. frente aos diferentes reveladores.	58
Figura 8	Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico, suas frações diclorometânica e hexânica e extrato bruto hexânico de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. frente aos diferentes reveladores cromatográficos.	59
Figura 9	Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. utilizando-se $\lambda = 220$ nm.	61
Figura 10	Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. utilizando-se $\lambda = 335$ nm.	62

Figura 11	Espectro de ultravioleta do padrão de flavonóis e gossipol. A: Quercetina-3-O-glicosídeo; B: Campferol, C: Gossipol e seus análogos.	63
Figura 12	Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência das frações dos extratos brutos metanólicos de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. utilizando-se $\lambda = 335$ nm.	64
Figura 13	Espectro de COSY na região do acoplamento aromático de GbFlav-3.	68
Figura 14	Espectro de HSQC na região do acoplamento aromático de GbFlav-3.	69
Figura 15	Estrutura química da quercetina.	69
Figura 16	Bioautografia do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> contra <i>Gardnerella vaginalis</i>	74
Figura 17	Viabilidade celular de adenocarcinoma mamário humano (MCF7) e fibroblasto murino (3T3), quando desafiado por extratos de <i>Gossypium barbadense</i>	78
Figura 18	Variação da produção de Óxido Nítrico (NO) por esplenócitos estimulados com concanavalina A na presença de extratos brutos de <i>Gossypium barbadense</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais fatores associados ao corrimento vaginal.	26
Tabela 2	Rendimento das extrações e das partições do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L.	57
Tabela 3	Substâncias detectadas no extrato bruto hexânico de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. em análise por cromatografia com fase gasosa com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.	65
Tabela 4	Substâncias presentes na fração hexânica do extrato bruto metanólico de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. em análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.	66
Tabela 5	Sinais do flavonol GbFlav-3 comparados aos sinais obtidos na literatura.	68
Tabela 6	Efeito dos extratos e frações semi-purificadas de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. frente a diferentes cepas bacterianas.	70
Tabela 7	Efeito do extrato e fração semi-purificada de folhas de <i>Gossypium barbadense</i> L. frente a diferentes cepas bacterianas.	72
Tabela 8	Perfil de resistência das cepas testadas de <i>Gardnerella vaginalis</i> aos antibióticos presentes no mercado brasileiro. ..	109

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.	Espécie em estudo, <i>Gossypium barbadense</i> L.	19
2.1.1.	Descrição botânica e dispersão	19
2.1.2.	Utilização popular e importância econômica	19
2.1.3.	Composição química	20
2.1.4.	Atividades biológicas	23
2.2.	Leucorreia	25
2.2.1.	Variações no corrimento vaginal por alteração fisiológica	26
2.2.2.	Infecções	28
2.2.2.1.	Tratamento da vaginose bacteriana	33
2.2.3.	Inflamação e suas implicações no trato reprodutor feminino	35
3.	OBJETIVOS	41
3.1.	Objetivo Geral	41
3.2.	Objetivos Específicos	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1.	Material vegetal	42
4.2.	Extratos e frações semi-purificadas	42
4.3.	Perfil químico de extratos brutos e respectivas frações	44
4.3.1.	Cromatografia de camada delgada (CCD)	44
4.3.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD)	44
4.3.3.	Cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)	45
4.4.	Isolamento e purificação	46
4.4.1.	Coluna cromatográfica em gel de sílica	46
4.4.2.	Cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP)	47
4.4.3.	CLAE-DAD escala semi-preparativa	47
4.5.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	48

4.6.	Atividade antibacteriana contra <i>Gardnerella vaginalis</i>	48
4.6.1.	Teste de difusão em ágar	48
4.6.2.	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	49
4.6.3.	Bioautografia	50
4.7.	Citotoxicidade contra <i>Artemia salina</i>	51
4.8.	Teste de viabilidade celular (MTT)	52
4.9.	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	52
4.9.1.	Animais	52
4.9.2.	Obtenção de esplenócitos	53
4.9.3.	Grupos experimentais	53
4.9.4.	Utilização dos sobrenadantes de cultura de esplenócitos	54
4.9.5.	Produção de óxido nítrico (Nitrito)	54
4.9.6.	Doseamento de citocinas	55
4.9.7.	Análise estatística	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	Obtenção dos extratos e frações semi-purificadas	57
5.2.	Caracterização química dos extratos	57
5.2.1.	Cromatografia de camada delgada	57
5.2.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotiodo	60
5.2.3.	Cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	65
5.3.	Identificação	67
5.4.	Atividade antibacteriana contra <i>Gardnerella vaginalis</i>	70
5.4.1.	Teste de difusão em ágar	70
5.4.2.	Concentração inibitória mínima (CIM)	71
5.4.3.	Bioautografia	74
5.5.	Citotoxicidade contra <i>Artemia salina</i>	76
5.6.	Teste de viabilidade celular (MTT)	77
5.7.	Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	80

6.	CONCLUSÃO	85
7.	REFERÊNCIAS	86
	ANEXOS	
	Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.	107
	Anexo B – Perfil de resistência das cepas testadas de <i>Gardnerella vaginalis</i> aos antibióticos presentes no mercado brasileiro.	108

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática comum entre diversas populações ao redor do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998), 80% da população dos países em desenvolvimento recorre às medicinas tradicionais para atender suas necessidades básicas de saúde. Esta agência também considera que o incentivo à utilização de plantas medicinais na atenção primária à saúde tem aumentado a popularidade das plantas medicinais em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

No Brasil não é diferente. Como um exemplo do incentivo governamental à fitoterapia, cita-se a Portaria nº 971/2006 (BRASIL, 2006), a qual aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde e o Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Além disso, novas legislações estão sendo publicadas, destacando-se a RDC nº 10, de 9 de março de 2010, que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à ANVISA (BRASIL, 2010a) e a Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010, que institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2010b). No estado de Minas Gerais, foi aprovada a Política Estadual de Práticas Integrativas e Complementares, que segue as diretrizes nacionais (MINAS GERAIS, 2009).

Dados preliminares anteriores obtidos em pesquisas etnofarmacológicas (ALVIM et al., 2008; CALIL et al., 2008; MACEDO et al., 2008; PIMENTA et al., 2009; SANTO et al., 2008) indicam vasta utilização de folhas do algodoeiro, *Gossypium barbadense* L., para o tratamento de corrimento vaginal (leucorreia) por usuários da Estratégia Saúde da Família na Zona da Mata Mineira.

Segundo Nelson, A.C. e Kursar (1999), as indicações terapêuticas de extratos de plantas são, na maioria dos casos, empíricas, e praticantes da fitoterapia acreditam que o extrato total tem ação melhor que a dose equivalente da substância isolada. Trabalhos recentes têm demonstrado a presença de interação e amplificação do efeito em diferentes extratos de plantas, assim como entre substâncias do mesmo extrato (BIAVATTI, 2009), este efeito também é descrito por Wagner, H. e Wiesenauer (2006).

Doenças que envolvem alteração no corrimento vaginal, principalmente a vaginose bacteriana, são de etiologia muito complexa. Em doenças de etiologia muito variável, a terapia multialvo é mais efetiva e menos vulnerável à resistência adaptativa, pois os sistemas biológicos apresentam maior dificuldade em compensar a ação de duas ou mais substâncias ao mesmo tempo. Como resultado, a terapia focada em apenas um alvo tem se mostrado incapaz de combater eficientemente quadros patológicos complexos como as doenças infecciosas (KEITH; ZIMMERMANN, 2004).

Neste âmbito, a seleção etnofarmacológica de plantas para pesquisa e desenvolvimento, baseada na alegação feita de um dado efeito terapêutico em seres humanos, pode ser um valioso “atalho” para a descoberta de novos fármacos ou substâncias promissoras. Neste contexto, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica (ELISABETSKY, 2003). Porém, a OMS (1998) preconiza que para que as plantas medicinais possam ser usadas pela população com segurança, suas atividades, composição química e toxicidade devem ser estudadas.

Dado o exposto, este trabalho se torna relevante pela contribuição para a comprovação da utilização popular de *G. barbadense* contra o corrimento vaginal, com enfoque em algumas atividades que participam desta doença, tais como atividade antibacteriana contra *Gardnerella vaginalis*, viabilidade de células normais e atividade anti-inflamatória.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espécie em estudo, *Gossypium barbadense* L.

2.1.1. Descrição botânica e dispersão

Malvaceae Juss. é uma família constituída de ervas, subarbustos, arbustos, lianas e raramente árvores de pequeno porte, com cerca de 250 gêneros e 4200 espécies, sendo que, no Brasil, ocorrem cerca de 80 gêneros e 400 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

Gossypium L., pertencente à Malvaceae, é conhecido popularmente pelas espécies de algodoeiros. Atualmente são descritas 49 espécies, as quais estão distribuídas principalmente nos trópicos e subtropicais, onde são encontradas em regiões áridas ou semi-áridas. As duas espécies cultivadas mais importantes são *Gossypium hirsutum* L. e *Gossypium barbadense* L. (ADAMS, K.L.; WENDEL, 2004; FRYXELL, 1965). A espécie *G. hirsutum*, mais amplamente estudada, é originária da região que compreende a Guatemala e o México, na América Central, e *G. barbadense* entre o norte do Peru e o sul do Equador, sendo endêmica na América do Sul (BRUBAKER et al., 1999; STEPHENS, 1967). No Brasil, esta espécie é encontrada em quase todos os estados na forma domesticada, e na forma de cultivo de fundos de quintais (BARROSO et al., 2005).

2.1.2 Utilização popular e importância econômica

Plantas pertencentes à família Malvaceae são amplamente conhecidas por suas propriedades medicinais. Em estudos etnofarmacológicos realizados em diferentes regiões do mundo, as espécies são relatadas para o tratamento de inflamações, feridas, depurativo do sangue, vitiligo, gonorreia, diarreia, doenças renais, bronquite, cólica, gripe, inflamação uterina, dor, ansiedade, taquicardia,

labirintite, mordida de cobra, pneumonia, hipertensão, úlcera, conjuntivite, diurese, febre, reumatismo, amigdalite, obesidade, menorragia, hemorragia uterina, fratura, infertilidade feminina, leishmaniose, urina adstringente, anúria, entre outras (BIESKI et al., 2012; BOURDYA; WALTERB, 1992; CARRIÓ; VALLÈS, 2012; KALAYOU et al., 2012; NGUEGUIM et al., 2012; ODONNE et al., 2011; SHANG et al., 2012).

O gênero *Gossypium* L. é conhecido principalmente pelas fibras têxteis, naturais. Sua utilização concentra-se na indústria de fiação e tecelagem e na indústria de alimentação animal, na forma de farelo, e humana, como óleo, além de amplo número de produtos secundários, apresentando grande importância socioeconômica, com uso principalmente das sementes (RIGON et al., 2008). As plantas deste gênero são tão importantes economicamente que estudo atual conduzido por Paterson et al. (2012) demonstrou a herança genética de espécies de *Gossypium* e como esta herança influencia na produção de fibras.

São plantas de grande utilização popular para o tratamento de doenças. *G. hirsutum* apresenta indicações das folhas para disenteria, hemorragia uterina, cicatrizante; da raiz para perda de memória, amenorreia, distúrbios da menopausa, impotência sexual; das flores e dos frutos verdes para micoses; do óleo da semente como purgativo, vermífugo, combate a piolhos, além de ser indicada para o atraso da puberdade em veterinária (DILSHAD et al., 2008; LORENZI; MATOS, 2008). *G. barbadense* apresenta citações populares para depurativo do sangue, dor de estômago, vitiligo, inflamação, gonorreia e leishmaniose, (BIESKI et al., 2012; ODONNE et al., 2011), além de ser utilizada para corrimento vaginal (2008; ALVIM et al., 2008; CALIL et al., 2008; MACEDO et al., 2008; PIMENTA et al., 2009; SANTO et al.).

2.1.3. Composição química

Das várias espécies de *Gossypium* já foram isolados terpenoides fixos e voláteis, quinonas terpenoídicas, ácidos graxos, flavonoides, taninos condensados e oligossacarídeos (BELL et al., 1975; BELL et al., 1978; BUCHS et al., 2012; CHUG; MEHTA; DUA, 2012; ELZEN et al., 1985; HANNY, 1980; KHIDYROVA et al., 2002;

KUMAMOTO et al., 1979; LANE; SCHUSTER, 1981; PAKUDINA; SADYKOV, 1967; PAKUDINA; SADYKOV, 1970; SMITH, 1967; STIPANOVIC et al., 2006; STRUCK; KIRK, 1970; UZBEKOV et al., 2013; WAGNER, T.A. et al., 2012; ZHENG; MORT, 2008).

As substâncias quercetina, campferol, quercimeritrina, isoquercitrina, gossipitrina, gossipina e herbacitrina foram os primeiros flavonoides isolados para o gênero (PAKUDINA; SADYKOV; DENLIEV, 1965). Essas substâncias estão ilustradas na Figura 1. Desde então, muitos outros flavonoides, que diferem principalmente pelas glicosilações e metilações, foram isolados e caracterizados de espécies de algodoeiros (FENG et al., 2013; PAKUDINA; SADYKOV, 1967; PAKUDINA; SADYKOV, 1970; PAKUDINA; SADYKOV; DENLIEV, 1965; PARKS, 1965; SHAMURATOV et al., 2003; STRUCK; KIRK, 1970; WAAGE; HEDIN, 1984). Geng et al. (2007) detectaram 58 flavonóis derivados de quercetina ou campferol em extrato hidroalcoólico de flores de *G. herbaceum*.

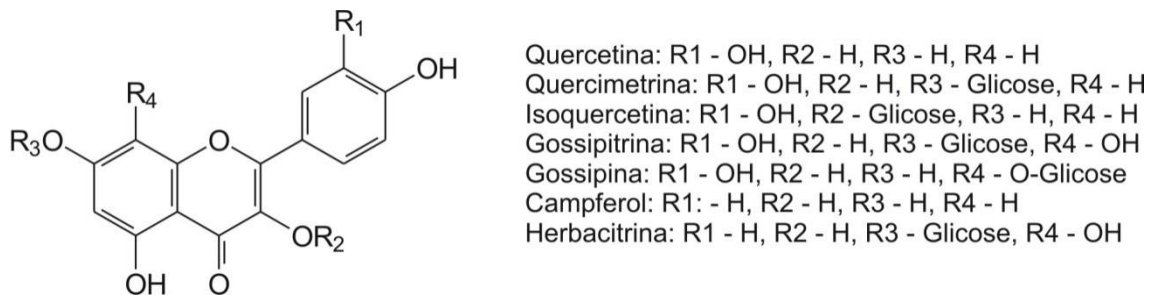


Figura 1 – Primeiros flavonoides isolados do gênero *Gossypium*.

Karimdzhanov, Kuznetsova e Dzhataev (1997) isolaram derivados de catequina e cianidina de cultura de células do calo de *G. hirsutum* e de diferentes partes da planta de desenvolvimento normal e concluíram que os fenólicos diferem qualitativa e quantitativamente nas formas *in vitro* e *in vivo* de cultivo.

Outro metabolito especial de grande importância encontrado nos algodoeiros é o gossipol (Figura 2), um dímero de sesquiterpenos aromáticos que foi caracterizado isolado primeiramente em 1886 por Longmore e caracterizado em 1899 por Marchlewski (GARDNER JR; HRON; VIX, 1976). Este terpenoide é um pigmento amarelo de ocorrência natural em espécies de Malvaceae, podendo ser encontrado naturalmente nas sementes, folhas e raízes de plantas de *Gossypium*

(ABOU-DONIA, 1976). Porém, segundo Bell et al. (1975) a quantidade desta substância pode ser muito pequena, tornando sua detecção muito difícil.

Outros terpenoides provenientes da mesma rota biossintética do gossipol foram descritos. Bell et al. (1975) e Dowd e Pelitire (2006) descreveram o 6-metoxi gossipol e o 6,6'-dimetoxi gossipol, na casca do caule, raízes das plântulas e sementes de *G. hirsutum* e *G. barbadense* (Figura 2). Os sesquiterpenos 6-metoxidesoxihemigossipol (6MDH) e o 6-metoxihemigossipol (6MH) (Figura 2), foram descritos por Wagner, T.A., et al. (2012) e Benedict, Liu e Stipanovic (2006).

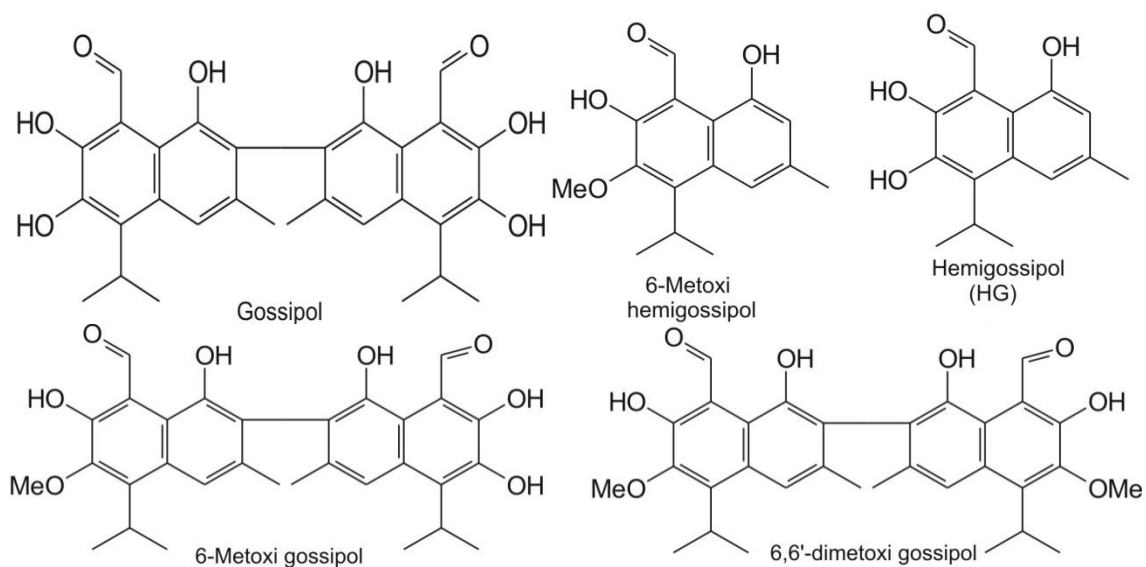


Figura 2 – Estrutura química do gossipol e outros terpenoides provenientes da mesma rota biossintética, encontrada no gênero *Gossypium* (Malvaceae).

O óleo essencial de *G. barbadense* foi investigado por Essien, Aboaba e Ogunwande (2011), onde foram identificados os terpenos triciclono, acetato de bornila, α -pineno, α -terpineno, isodieno e β -pineno. Não foi identificado nenhum sesquiterpenoide oxigenado, sendo notada também a ausência de α - e β -bisabolol, óxido de bisaboleno, óxido de cariofileno e α -copaeno, que são marcadores específicos de outras espécies de *Gossypium*.

2.1.4. Atividades biológicas

Diversos trabalhos já foram realizados com espécies de *Gossypium*, variados órgãos, para verificar as suas atividades biológicas de diversas partes da planta.

O extrato metanólico de sementes de *G. barbadense* apresentou boa atividade antioxidante e não demonstrou atividade antifúngica e citotóxica contra células amnióticas humanas. Este estudo demonstrou ainda, a atividade antimicrobiana dos extratos aquoso, metanólico e diclorometânico das sementes contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* e *Pseudomonas aeruginosa* (AL-FATIMI et al., 2007). A atividade antimicrobiana foi demonstrada também utilizando óleo fermentado de sementes de *G. hirsutum* contra patógenos entéricos (FALEGAN; DAVID, 2007). O extrato aquoso da farinha de sementes de *G. barbadense* apresentou-se tóxico, causando danos aos tecidos testicular, hepático, renal e muscular (THOMAS et al., 1991). Porém, em estudo com objetivo de se verificar a toxicidade de um fitoterápico a base de *G. herbaceum*, o extrato hidroalcoólico não mostrou toxicidade sistêmica na dose terapêutica. Em doses mais altas, o extrato apresentou alterações no ganho de peso, parâmetros bioquímicos e hematológicos (MELLO et al., 2008).

Foi demonstrado por Sarr et al. (2010) e Mans et al. (2004) que o extrato hidrometanólico de folhas de *G. barbadense* aumenta a contração do músculo liso traqueal por ter ação agonista à acetilcolina, não podendo ser usado como espasmolítico. Hasrat, Pieters e Vlietinck (2004) demonstraram a atividade hipotensora do dococto de folhas de *G. barbadense*, sugerindo que a atividade também poderia estar relacionada com receptores colinérgicos e não com os receptores histaminérgicos e adrenérgicos.

O extrato metanólico de folhas *G. herbaceum* apresentou atividade diurética semelhante à da furosemida (NARASIMHA et al., 2008). Patil et al. (2008) demonstraram que o extrato metanólico de *G. arboreum* apresentou atividade antiúlcera.

O trabalho realizado por Essien, Aboaba e Agunwande (2011) demonstrou que o óleo essencial de folhas de *G. barbadense*, rico em hidrocarbonetos e

terpenoides oxigenados, apresenta atividade moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella* sp. e *Escherichia coli*, e não é ativo contra *Klebsiella aerogenes*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Segundo Annan e Houghton (2008), o tratamento com extrato aquoso de folhas de *G. arboreum* aumentou a proliferação de fibroblastos e demonstrou atividade antimicrobiana e antioxidante. Os autores sugerem que os flavonoides presentes no extrato poderiam ser os responsáveis por efeitos que favorecem a cicatrização.

Choi et al. (1998) demonstraram que o fracionamento do extrato metanólico de bolas de algodão imaturo de *G. indicum* apresentou atividade antiproliferativa seletiva contra células tumorais (melanoma murino e células de leucemia), não apresentando atividade contra timócitos. Os flavonoides aparentemente majoritários, catequina e (-)-epicatequina apresentaram atividade aproximadamente 10 vezes menor quando testados isoladamente.

O gossipol funciona como defesa natural na planta, causando infertilidade nos insetos que se alimentam de sua seiva e sementes, reduzindo assim a proliferação de seu predador. Badria et al. (2001) mostraram que o gossipol e gossipolona apresentam atividade antifúngica. Bell e Stipanovic (1977) demonstraram que embora esteja presente nas glândulas lisígenas, o gossipol não é o principal responsável pela atividade antimicrobiana deste tecido. Além disto, dois derivados do desoxigossipol, isolados por Piccinelli et al. (2008) de sementes de *G. hirsutum* apresentaram atividade antiproliferativa contra células Jurkat T.

O (-)-gossipol é o único isômero que é significativamente tóxico para animais, e a proporção de (+) ou (-)-gossipol não afeta a toxidez contra insetos (STIPANOVIC et al., 2006; STIPANOVIC, PUCKHABER e BELL, 2006; PUCKHABER et al., 2002). Dowd e Pelitire (2006) descreveram o 6-metoxi gossipol e o 6,6'-dimetoxi gossipol como substâncias antimicrobianas.

2.2. Leucorreia

A secreção vaginal é uma resposta fisiológica do organismo feminino. Quando não existe processo patológico envolvido, a secreção vaginal apresenta-se de cor clara ou branca, sendo composta de líquidos cervicais, podendo variar na quantidade e no aspecto, dependendo do período do ciclo menstrual. No entanto, quando algum processo infeccioso ou inflamatório encontra-se presente, as características da secreção modificam-se, caracterizando o corrimento vaginal patológico (BATES, 2003; MCCATHIE, 2006).

A leucorreia, também conhecida como corrimento vaginal, é uma das preocupações mais frequentes entre as mulheres, principalmente, nas que estão em idade reprodutiva (FERRACIN; OLIVEIRA, R.M.W., 2005). Uma mulher adulta em idade fértil produz cerca de 1 a 4 mL de secreções vaginais por dia. Este corrimento consiste de secreções de glândulas endocervicais, descamação de células vaginais, bactérias (parte da microbiota vaginal residente), exsudato do plexo venoso perivaginal e secreção das glândulas vulvares. Um fluxo constante drena as secreções da vagina para o vestíbulo, permitindo a externalização dos componentes desta secreção. Este processo é conhecido como corrimento vaginal clássico ou fisiológico (BOHBOT, 2008).

Muitas mulheres tem a percepção de que o corrimento vaginal é causado por alguma forma de doença. Embora seja um sintoma inespecífico e pouco preditivo de doenças sexualmente transmissíveis (DST), as mulheres geralmente assumem que qualquer diferença na secreção vaginal é devido às DST (MCCATHIE, 2006). No Brasil, esta alteração, é um dos principais motivos para a procura do serviço de saúde em DST (BRASIL, 2008).

Um estudo, conduzido em Fortaleza/CE, analisou 5148 formulários de registro médico de pacientes que apresentavam sintomas de doença genital atendidos no serviço de atenção primária à saúde entre 1999 e 2008. Este trabalho mostrou que a condição de maior prevalência (44%) foi a presença de corrimento vaginal e/ou cervicite (CAVALCANTE et al., 2012).

Na Tabela 1 estão descritos os principais motivos de alteração na secreção vaginal. Além de descreverem os principais fatores associados à alteração do

corrimento vaginal, McCathie (2006) e Ferracin e Oliveira, R.M.W. (2005) indicam que o fator de maior incidência na alteração do corrimento vaginal é a vaginose bacteriana, seguida da candidíase.

Tabela 1 – Principais fatores associados à alteração do corrimento vaginal.

Infecioso	Não infeccioso
Vaginose bacteriana (VB)	Ectrópio cervical
Candidíase	Pólipo cervical
<i>Chlamydia trachomatis</i> *	Retenção de contraceptivos
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	Alergia
<i>Trichomonas vaginalis</i> *	latrogenia/Trauma
Herpes simplex cervical*	Neoplasma
Verrugas cervicais*	Fístula (retovaginal/vesicovaginal)
Sífilis primária (vaginal/cancro cervical)	Vaginite atrófica
Pós-operatório/pós-aborto/ Infecção pélvica puerperal	Gravidez
Síndrome do choque tóxico	Condições dermatológicas

* - Infecções transmitidas sexualmente.

Fonte: Adaptado de McCathie (2006) e Ferracin e Oliveira, R.M.W. (2005).

2.2.1. Variações no corrimento vaginal por alterações fisiológicas

As secreções vaginais estão sujeitas a variações fisiológicas como idade, ciclo menstrual (aumentada no período pré-ovulatório), gravidez, pós-parto, uso de medicamentos (hormônios, contraceptivos) e uso de excitantes sexuais. É importante ressaltar que este tipo de leucorreia fisiológica pode, transitoriamente, apresentar-se irritante ou com odores fortes (BOHBOT, 2008), no entanto não caracteriza uma doença.

As primeiras secreções vaginais aparecem meses antes da menarca. Estes primeiros fluidos são muito variáveis quantitativa e qualitativamente, dependendo do período e de irregularidades hormonais. Já durante a menopausa, sem o uso da

terapia de reposição hormonal, observa-se um espessamento e diminuição da secreção, causando desconforto. No entanto, a reposição hormonal e/ou a adição de estrogênio terapia vaginal suplementar podem reverter este quadro. A grande carga hormonal da gravidez é acompanhada por grande quantidade de secreção vaginal (BOHBOT, 2008).

No período da ovulação, as secreções se tornam abundantes, como resultado da secreção de muco para favorecer o trânsito dos espermatozoides até o útero. Na fase pré-menstrual, as secreções se tornam mais espessas, devido à descamação significativa do epitélio vaginal. As secreções de pacientes que utilizam contraceptivos hormonais variam dependendo do tipo de contracepção, apresentando tendência a diminuição com o uso de progestina (BOHBOT, 2008).

A flutuação dos níveis de estrogênio podem causar alterações no corrimento vaginal. A vaginite atrófica, caracterizada por uma inflamação relacionada com a atrofia da mucosa vaginal está associada à esta flutuação. Esta atrofia pode ocorrer na menopausa, período pós-parto, amamentação, durante radio ou quimioterapia ou ainda em mulheres em tratamento antiestrogênico (BATES, 2003). Com a diminuição do estrogênio, o epitélio vaginal torna-se fino e a lubrificação vaginal diminui. Estas alterações levam a uma redução da microbiota de Döderlein (lactobacilos) e um consequente aumento do pH, favorecendo a proliferação de outras bactérias, levando assim à alteração da leucorreia (LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002). O corrimento vaginal neste caso se apresenta delgado, aquoso, malcheiroso, de cor amarelada e ocasionalmente podendo conter sangue (SOBEL, 1997).

O pH vaginal varia normalmente entre 4,0 e 4,5 em mulheres adultas em idade fértil, aumentando para 4,5 a 5,0 após a menopausa, se não houver reposição hormonal. A acidez das secreções vaginais é importante para limitar a proliferação bacteriana (bacteriostase fisiológica) e a adesão de bactérias às células epiteliais vaginais, sendo importante para o controle de infecções vaginais. Os lactobacilos são responsáveis por esta ação por liberarem ácido láctico, produzido por hidrólise do glicogênio contido nas células vaginais (BOHBOT, 2008).

Em uma mulher adulta em idade fértil são encontrados aproximadamente 10^8 a 10^9 microrganismos/mL de secreção vaginal, sendo cerca de 90% lactobacilos. Os lactobacilos mais frequentemente encontrados na microbiota vaginal de mulheres

sadias são *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus iners* (SRINIVASAN et al., 2012; VASQUEZ et al., 2002; VERHELST et al., 2005), porém, em razão das variações naturais, nem todas as mulheres apresentam as mesmas bactérias em sua microbiota vaginal, podendo ser composta por uma ou várias espécies deste gênero além de outras bactérias (DEVILLARD et al., 2004).

A função dos lactobacilos na manutenção da microbiota vaginal normal é particularmente importante durante a gravidez, onde a ocorrência de vaginose bacteriana e/ou vaginite pode estar associada ao risco de parto prematuro ou aborto (DONATI et al., 2010; DONDERS; BELLEN; ROZEBERGA, 2011), mesmo quando assintomático (LEITICH; KISS, 2007).

Os demais 10% que compõem a microbiota residente da vagina são representados por bactérias, sendo a maioria de anaeróbios. Podem ser citados como exemplo *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp., *Atopobium vaginae*, *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *G. vaginalis*, dentre outros. Leveduras como *Candida albicans*, também estão presentes, compondo uma pequena parcela da microbiota vaginal (PRIESTLY et al., 1997; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008). O equilíbrio entre estes microrganismos e os lactobacilos (naturalmente acidófilos) é fornecido pelo pH vaginal. Muitos fatores endógenos, como deficiência de estrogênio, e exógenos, como duchas vaginais, excesso ou falta de higiene e uso de antibióticos, podem alterar este equilíbrio, criando condições favoráveis para o surgimento de infecções (BOHBOT, 2008).

2.2.2. Infecções

A vagina, do ponto de vista ecológico, pode ser considerada um sítio anatômico complexo, onde mais de 50 espécies de microrganismos já foram isoladas e vivem em harmonia, e por isso são consideradas comensais, mas que

podem, em situações de desequilíbrio, tornarem-se patogênicas (GIRALDO et al., 2005; LIVENGOOD, 2009). Segundo Bohbot (2008), a maioria das leucorreias patológicas é encontrada nesta categoria, sendo causadas tanto por bactérias quanto por fungos. Estas infecções estão relacionadas a mudanças imunológicas ou na microbiota vaginal.

Baksu et al. (2005) e McCathie (2006) indicam que a segunda maior causa de corrimento vaginal patológico é a infecção por *Candida albicans*. Estudos indicam este patógeno como principal agente responsável pela candidíase vulvovaginal (CVV) em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (DE VOS et al., 2005; FERRAZZA et al., 2005).

A CVV é uma infecção comum causada por espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans* (FLEURY, 1981; SOBEL, 1985). Esta espécie pode ser encontrada em cerca de 90% das mulheres (NYIRJESY, 2008; SOBEL, 2007). Devido à propensão de colonização por *C. albicans*, até 30% das mulheres desenvolvem CVV como complicação do tratamento de VB (FERRIS et al., 1995), sendo que a incidência desta afecção tem aumentando consideravelmente nas últimas décadas (DAN; POCH; LEVIN, 2002). Esta condição é caracterizada por erosão do colo uterino e inflamação (RIVERO; CENTENO; DÍAZ, 2003) devido à invasão do epitélio por pseudohifas (ZIARRUSTA, 2002).

Um estudo conduzido por Khan et al. (2009) demonstrou que o maior fator causador de corrimento é a VB causada por *G. vaginalis*, com incidência de 28%, seguida de *Streptococcus* grupo B (5%) e *Trichomonas vaginalis* (4%). Outro estudo demonstrou que *G. vaginalis* é o microrganismo mais frequente (26,6% dos casos) envolvido com os sintomas encontrados em mulheres férteis (CASARI et al., 2010). Lefevre et al. (1983) relataram que *G. vaginalis* era o único agente etiológico encontrado significativamente maior em mulheres com vaginose, na época ainda chamada de vaginite inespecífica, do que em mulheres saudáveis, não significando porém que é o único microrganismo responsável por esta enfermidade.

Gardnerella vaginalis é um cocobacilo Gram variável e anaeróbio facultativo que faz parte da microbiota vaginal residente em humanos (CHATTOPADHYAY, 1984; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008). Foi originalmente descrito em 1955 por Gardner e Dukes, como um microrganismo causador de infecção, previamente classificado como vaginite não-específica, sendo detectado em pacientes

sintomáticos. O interesse científico pelo seu estudo se relaciona ao fato desta bactéria ser identificada na quase totalidade das mulheres com vaginose bacteriana, exercendo papel importante na sua patogênese (CASTELLANO-FILHO; DINIZ; SILVA, 2010; LIVENGOOD, 2009; SRINIVASAN; FREDRICKS, 2008).

Segundo Fredricks et al. (2007), *G. vaginalis* sozinha nem sempre é capaz de desenvolver um quadro de vaginose bacteriana. Com o avanço das ferramentas moleculares, Oakley et al. (2008) confirmaram que *G. vaginalis* não é a única responsável pela VB, sendo esta patologia associada à uma quantidade e diversidade maior de anaeróbios. Hoje sabe-se que a vagina é, indiscutivelmente, colonizada por diversas bactérias anaeróbias durante a VB, mas há décadas vem sendo discutido se os sintomas são consequência da ação de todas as bactérias ou se existe uma espécie principal que dá origem à desordem (PATTERSON et al., 2010).

Segundo Srinivasan et al. (2012), mulheres com vaginose bacteriana apresentam a microbiota muito complexa, com maior variedade de espécies, quando comparadas com mulheres saudáveis. Neste estudo foram encontrados 47 *taxon* presentes em mulheres com vaginose bacteriana. Deste total, 24 foram considerados mais significativos, sendo estes: BVAB-1, BVAB-2, *Prevotella* spp., *Sneathia sanguinegens*, *Leptotrichia amnionii*, *Megasphaera* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Aerococcus christensenii*, *Dialister micraerophilus*, *Prevotella timonensis*, entre outras. BVAB são descritas como novas bactérias da ordem Clostridiales que apresentam alta especificidade para vaginose bacteriana. Este estudo mostrou ainda que *G. vaginalis* estava presente em 97,4% dos casos de vaginose bacteriana.

Criswell et al. (1969) demonstraram que, embora *G. vaginalis* não cause vaginose bacteriana isoladamente, geralmente são as bactérias que iniciam o processo de infecção, sugerindo que estes cocobacilos podem ter maior potencial de patogenicidade em condições que promovam a expressão de seus fatores de virulência.

Estudos associam fatores de virulência desta bactéria à sua patogenicidade, como no trabalho realizado por Swidsinski et al. (2005), no qual a capacidade de formação de biofilme que adere ao epitélio vaginal das mulheres com VB foi mostrada. Este biofilme incorpora diferentes bactérias em suas camadas,

favorecendo a colonização dos demais anaeróbios. *G. vaginalis* produz a toxina vaginolisina, a qual é da família de toxinas formadoras de poros dependentes de colesterol, que lisam os eritrócitos do sangue humano e as células do epitélio vaginal (GELBER et al., 2008). Patterson et al. (2010) demonstraram que após a aderência, *G. vaginalis* causa lise das células epiteliais vaginais apresentando o alto nível de citotoxicidade, sendo que nenhum dos demais anaeróbios testados causaram danos as células, como mostrado na Figura 3. Segundo Knupp (2013), o gene responsável pela vaginolisina está presente na maioria das cepas desta bactéria abordadas em seu estudo. Segundo Moncla e Pryke (2009), algumas cepas desta bactéria produzem enzimas chamadas lipases. A produção de lipases extracelulares aumenta a habilidade de certos microrganismos de colonizar as superfícies do hospedeiro (GATTO et al., 2002).

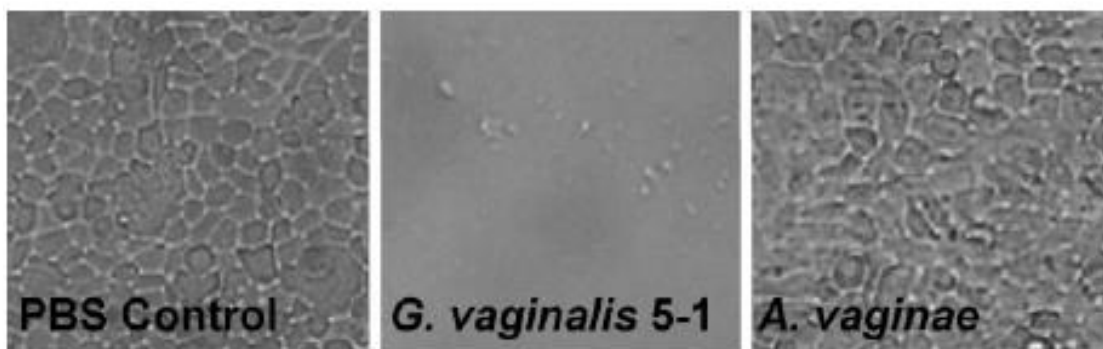


Figura 3 – Fotomicrografias mostrando a citotoxicidade de diferentes bactérias associadas à vaginose bacteriana em células do epitélio vaginal (ME-180). Nota-se a presença de células no controle com PBS e na co-cultura com *Atopobium vaginae* e a ausência de células na co-cultura com *Gardnerella vaginalis*.

Fonte: Adaptado de Patterson et al. (2010).

Além dos inúmeros fatores de virulência que contribuem para sua patogênese, *G. vaginalis* já foi identificada como agente etiológico isolado de doenças fora do sistema reprodutor feminino, como osteomielite vertebral e discite, vasculite retinal, artrite aguda no quadril e bacteremia (GRAHAM et al., 2009; LAGACÉ-WIENS et al., 2008; NERI et al., 2009; SIVADON-TARDY et al., 2009). Alguns estudos destacam que a infecção por esta bactéria pode evoluir para quadros mais graves, como doença inflamatória pélvica, neoplasia intraepitelial cervical (MORRIS et al., 2001).

Em pacientes de obstetrícia, este patógeno é reconhecido por causar infecções incomuns, porém graves. *G. vaginalis* já foi identificada como agente etiológico em sepse puerperal, endometrite, aborto septicêmico, infertilidade tubária, além de poder causar parto prematuro (AMAYA; AL-DOSSARY; DEMMLER, 2002; AROUTCHEVA et al., 2001; MCCOOL; DEDONATO, 2012; MORRIS et al., 2001; NELSON, D.B., et al., 2009; REID; BOCKING, 2003). Estas infecções são consideradas oportunistas, espalhando-se da vagina para o útero e trato geniturinário como resultado do dano à mucosa durante o parto (AROUTCHEVA et al., 2001). Wiesenfeld et al. (2002) demonstraram que, apesar de a vaginose bacteriana ser um quadro não inflamatório, ele pode aumentar o risco do surgimento da doença inflamatória pélvica.

Os fatores de virulência citados, em conjunto com a facilidade que este anaeróbio facultativo apresenta em desenvolver outros quadros patológicos, sugerem que *G. vaginalis* é um fator chave na patogênese da VB (PATTERSON et al., 2010).

Klomp et al. (2008) demonstraram a relação de *G. vaginalis* x *Lactobacillus* sp. em casos de mulheres com VB e de mulheres sadias. Embora os autores concluam que estudos com uma população maior são necessários, eles demonstraram que mulheres doentes apresentaram aumento da população de *G. vaginalis* em detrimento da população de *Lactobacillus* sp., sendo o inverso encontrado em mulheres sadias.

O diagnóstico de vaginose bacteriana é simples e segue o critério estabelecido por Amsel et al. (1983), que leva em consideração quatro condições: a) corrimento branco-acinzentado aderente, b) positivo no teste de *sniff/whiff* após adição de hidróxido de potássio 10%, c) pH vaginal acima de 4,5 e d) presença de *clue cells* em microscopia (Figura 4).

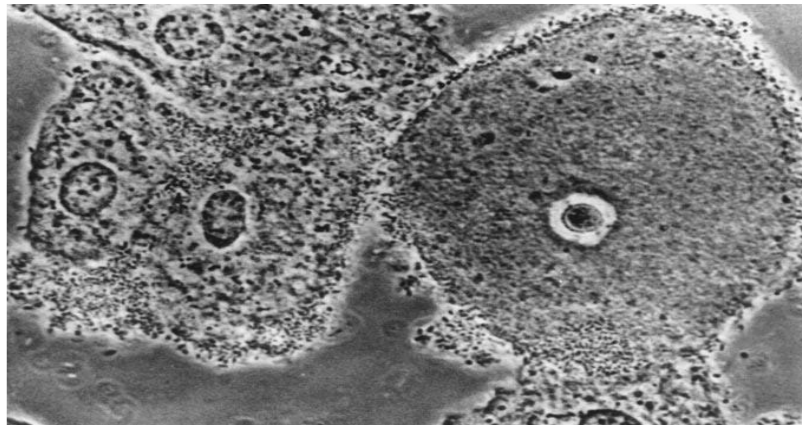


Figura 4 – Micrografia de alta resolução de *clue cell*, na qual se observa a perda dos limites das células epiteliais vaginais devido à aderência dos cocobacilos
Fonte: Adaptada de Sobel, 2000.

2.2.2.1. Tratamento da vaginose bacteriana

O objetivo do tratamento da VB é restabelecer a microbiota vaginal e aliviar a sintomatologia. Como medidas gerais, preconiza-se abstinência sexual e utilização de duchas vaginais com peróxido de hidrogênio a 1,5 %. O tratamento farmacológico de escolha consiste em metronidazol ou clindamicina, com opções de formulações para uso oral ou tópico (FERRACIN; OLIVEIRA, R.M.W., 2005). Porém, Knupp (2013) demonstrou altos níveis de resistência bacteriana ao metronidazol e outros nitroimidazóis, como o secnidazol o tinidazol. A clindamicina mostrou-se com boa atividade contra *G. vaginalis*, com 6,9% de resistência.

Segundo Ferracin e Oliveira, R.M.W. (2005), o uso do metronidazol não deve ser associado ao consumo de álcool durante a terapia, e por três dias após a suspensão do tratamento, para se evitar a possibilidade de efeito dissulfiram, que é uma hipersensibilidade ao álcool com reações adversas como depressão respiratória, arritmias cardíacas e convulsões. Além disso, a terapêutica sistêmica com metronidazol deve ser evitada no primeiro trimestre da gestação (BATES, 2003), no entanto, existindo indicação, o metronidazol ou clindamicina podem ser utilizados com sucesso. O creme de clindamicina, por ser uma forma farmacêutica de base oleosa, pode comprometer a efetividade de preservativos e diafragmas (CDC, 2002).

Outros fármacos que podem ser utilizados no tratamento são ampicilina e amoxicilina, sendo que estes apresentam taxas de cura de aproximadamente 66%, sendo considerados de média eficácia (SOBEL, 2000). Knupp (2013), no entanto, observou altos níveis de resistência e também resistência intermediária à ampicilina. Entretanto, ao se avaliar a associação do β -lactâmico com inibidor de β -lactamase, o sulbactam, a autora observou que todas as amostras de *G. vaginalis* avaliadas foram sensíveis. Também não foi observada resistência contra o cloranfenicol.

Por se tratarem de fármacos de amplo espectro de ação, a utilização do cloranfenicol, da amoxicilina e da ampicilina deve ser feita com muito critério, uma vez que este tipo de fármaco não tem ação seletiva e pode ajudar no desenvolvimento e seleção de resistência de outras bactérias além da que está sendo tratada.

Algumas das formas de tratamento mais tradicionais, como a utilização de cremes triplo-sulfa (sulfatiazol/sulfacetamida/sulfabenzamida), eritromicina, tetraciclina, gel de ácido acético e duchas vaginais de iodopovidona tem se mostrado ineficazes (SOBEL, 2000).

Segundo Aroutcheva et al. (2001), não existe um fenótipo ou genótipo específico de *G. vaginalis* para vaginose. Segundo Knupp (2013), dada a origem comunitária da VB, não é possível estabelecer relações baseada na tipagem por susceptibilidade aos antimicrobianos entre amostras de *G. vaginalis* isoladas de pacientes sintomáticas e assintomáticas.

O tratamento é efetivo em curto prazo, mas, segundo Larsson (1992), a VB apresenta taxa de recorrência de 20 a 30% em mulheres que fizeram tratamento de um mês. Bradshaw et al. (2006) demonstraram que após o tratamento oral com metronidazol, mulheres com VB causada apenas por *G. vaginalis* apresentaram recorrência do quadro de 38% e mulheres que possuíam *Atopobium vaginae* na microbiota apresentaram 83% de recorrência. Além disso, o estudo de Swidsinski et al. (2008) demonstrou que o tratamento com metronidazol vem sendo falho em eliminar o biofilme formado durante a VB, o que pode estar relacionado com a recorrência. O tratamento do parceiro sexual não tem mostrado benefícios nem redução das recorrências (FERRACIN; OLIVEIRA, R.M.W., 2005).

Em um estudo de revisão de casos de VB, Dayan e Wines (2001) concluem que as recidivas desta doença estão pouco associadas à reinfecção, podendo estar

relacionadas a deficiências no sistema imunológico. Embora não haja consenso sobre as causas da recorrência, está claro que ela ocorre com grande frequência. Além disso, segundo Bradshaw et al. (2012), há necessidade de novas formas de tratamento tanto para VB quanto para sua recorrência, a fim de aliviar os sintomas e reduzir os efeitos adversos. Segundo Nagaraja (2008) um dos problemas do tratamento atual de VB é que, mesmo com microrganismos sensíveis e antimicrobianos específicos, as taxas de cura e de recorrência estão longe de estarem ótimas. Ao mesmo tempo, a grande resistência encontrada hoje nos microrganismos causadores de corrimento vaginal associada aos fortes efeitos colaterais da quimioterapia antimicrobiana justificam a busca de novas alternativas para o tratamento desta condição.

2.2.3. Inflamação e suas implicações no trato reprodutor feminino

Segundo Leitich et al. (2003), a vaginose bacteriana está associada com abortos tardios, ruptura de membrana e parto prematuro. O parto prematuro (PPM), antes de 37 semanas de gestação, é a principal causa de morbidade e mortalidade neonatal e está associado a problemas mentais e debilidades físicas a longo prazo (GOLDENBERG et al., 2008; MOSTER; LIE; MARKESTAD, 2008).

As vias que conduzem ao PPM são complexas e não foram totalmente elucidadas. O sistema imunológico materno tem um papel importante durante a gravidez no que diz respeito à tolerância materna ao feto e à proteção contra infecções (WITKIN et al., 2011). Segundo estes autores, os processos imunológicos também estão envolvidos na manutenção do crescimento, remodelagem e diferenciação tecidual. Segundo Goldenberg et al. (2008), o processo inflamatório está envolvido, em uma ou mais vias no PPM.

Alguns autores demonstraram a associação entre PPM espontâneo com corioamnionite histológica (inflamação das membranas fetais devido à infecção bacteriana) e altos níveis de citocinas no soro, no líquido amniótico e no muco vaginal em humanos (GARGANO et al., 2008; PUCHNER et al., 2011; SIMHAN et al., 2011). Grigsby et al. (2010) e Kemp et al. (2010) demonstraram, em modelos

animais, que a inflamação cório-decídua leva à maturação do colo uterino, ruptura das membranas e ao PPM. Além disso, Kemp et al. (2010) mostraram que a expressão de citocinas, inclusive IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , está associada ao PPM através da regulação positiva de prostaglandinas, metaloproteinases de matriz e outros fatores cérvico-uterinos. Estes dados são reforçados pelo trabalho de Taylor et al. (2013).

Estudos mais antigos demonstram que os níveis de citocinas, prostaglandinas, endotoxinas, proteases, mucinases, sialidases e fosfolipases foram encontradas nas secreções vaginais e cervicais associadas com a VB (GLASSON; WOODS, 1988; KAPATAIS-ZOUMBO; CHANDLER; BARILE, 1985; MCGREGOR et al., 1992; MCGREGOR et al., 1994; PLATZ-CHRISTENSEN; BRANDBERG; WIGVIST, 1992; PLATZ-CHRISTENSEN et al. 1993; WATTS et al., 1990). Estudos atuais como o de Weissenbacher et al. (2010) e Taylor et al. (2013) demonstram que, aparentemente, o quadro de VB não está fortemente associado ao aumento da concentração de citocinas nas secreções vaginais. O fato é que a natureza da resposta imune à VB ainda é pouco elucidada e deve ser encarada com cuidado, uma vez que os pacientes não são diferenciados pelos tipos de bactérias presentes e por suas capacidades imunológicas (WEISSENBACHER et al., 2010).

O que se sabe hoje é que embora a VB não seja um fator predisponente para a doença inflamatória pélvica (NESS et al., 2004), sua presença está muitas vezes associada a esta doença, mesmo quando assintomática (HAINER; GIBSON, 2011). Além disso, a presença de vaginose bacteriana está associada com o aumento de aproximadamente três vezes no risco de apresentar corioamnionite histológica (SILVER et al., 1989) e de aproximadamente quatro vezes no risco de apresentar endometrite pós-parto (WATTS et al., 1990). Como descrito, a inflamação também pode estar presente em outros casos de corrimento vaginal patológico como cervicites, vaginites atróficas, vulvovaginites, candidíase vulvovaginal, dentre outras (FERRACIN; OLIVEIRA, R.M.W., 2005).

O processo inflamatório faz parte do complexo mecanismo de defesa presente nos seres humanos. Este processo ocorre como uma resposta ao dano celular, que pode ser causada por agentes físicos (trauma, calor, radiação e frio), químicos (substâncias causticas, álcalis, irritantes, entre outros) e biológicos (microrganismos e reações imunológicas) e desencadeia um fenômeno complexo,

dinâmico, multimediado que envolve, dentre outros processos, a liberação de mediadores químicos (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Os principais mediadores do processo inflamatório são: histamina e serotonina (aminas vasoativas); prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas, provenientes do metabolismo do ácido araquidônico; proteínas plasmáticas provenientes do sistema complemento, das cininas e da coagulação; fator de ativação de plaquetas, citocinas, óxido nítrico (NO), componentes lisossômico dos leucócitos e radicais livres de oxigênio (FRANCISCHETTI et al., 2010). Todos estes mediadores e seus respectivos sistemas de produção representam potenciais alvos de fármacos anti-inflamatórios, porém esta revisão irá se ater às citocinas (IL-17, IFN- γ e TNF- α) e ao NO, alvos deste estudo.

As citocinas são hormônios proteicos responsáveis pela fase efetora da imunidade, seja ela inata ou específica. São produzidas por vários tipos celulares como fagócitos mononucleares e linfócitos T. De um modo geral, as secretadas pelos fagócitos mononucleares provocam reações inflamatórias com grande número de neutrófilos, na tentativa de impedir ou erradicar infecções microbianas. As produzidas por linfócitos T agem principalmente regulando o crescimento e a diferenciação de várias populações linfocitárias, ativando células inflamatórias como fagócitos mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. Ambas são capazes de produzir as citocinas, chamadas de fatores estimulantes de colônia (FEC), os quais são responsáveis por estimular o crescimento e a diferenciação de leucócitos imaturos na medula óssea, que irão substituir as células consumidas durante a inflamação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Após se ligarem aos receptores na célula-alvo, as citocinas provocam a transdução dos sinais no interior da célula culminando na ação desejada, como a ativação e regulação da resposta imune celular (IFN- γ) e humoral (IL-4 e IL-10), a regulação da hematopoese (fatores de crescimento) e a diferenciação celular (IL-2, IL-4 e IL-12), além da ativação do endotélio e de leucócitos com geração da resposta de fase aguda (GÓMEZ-ESTRADA; GONZÁLEZ-RUIZ; MEDINA, 2011).

As citocinas da imunidade inata desempenham várias funções. O TNF- α , por exemplo, é uma das principais citocinas envolvidas no recrutamento dos neutrófilos e monócitos para os locais da infecção. Esta citocina, juntamente com a IL-1, quando secretada por macrófagos ou células T CD4⁺, agem nas células endoteliais

dos pequenos vasos sanguíneos adjacentes à infecção, estimulando o aumento da produção de selectinas e dos ligantes de integrinas pelas células endoteliais e a liberação de quimiocinas. Este processo permite a migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos T efetores para o local da infecção. Esta infiltração e uma reação vascular concomitante, são típicas da inflamação (HAMAI et al., 2009).

A produção excessiva de TNF- α porém, está relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças. Um efeito patogênico direto desta citocina é a indução da produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-8 e FEC, causando ampliação da cascata inflamatória. Além disso, pode aumentar a expressão de COX-2, induzir metástases, depósito de fibrina, produção de NO, dentre outras funções. Estas disfunções, juntamente com infecções disseminadas, graves, causadas por bactérias Gram-negativas podem levar ao choque séptico, caracterizado por hipotensão arterial, coagulação vascular disseminada e distúrbios metabólicos. É sabido que sua produção e ativação inapropriada também estão envolvidas com o desenvolvimento da artrite reumatoide, diabetes, Alzheimer, tumorigênese, dentre outras doenças (LI et al., 2012).

O óxido nítrico (NO) é produzido quando os leucócitos são ativados por estímulos inflamatórios, pois passam a produzir a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que passará a produzir NO por um mecanismo de produção enzimática envolvendo a participação do oxigênio molecular e da L-arginina. O NO produzido terá ação citotóxica e citostática, afim de destruir microorganismos parasitas e células tumorais (DUSSE et al., 2003) e, juntamente com as prostaglandinas, causar vasodilatação, facilitando assim a migração leucocitária (HEBEDA, 2008; MONCADA; PALMER; HIGGS, 2004). A migração leucocitária ocorre pela expressão de moléculas de adesão pelo endotélio previamente ativado por TNF- α e IL-1 (CRUVINEL et al., 2010). O NO pode ainda reagir com outros componentes celulares produzindo substâncias com capacidade microbicida como o peroxinitrito, o S-nitrosotiol e o dióxido de nitrogênio que são espécies altamente oxidantes (GRACE, 1994; MITCHELL et al., 2006; YOSHIDA, 1996).

As células T auxiliares CD4⁺ podem se diferenciar em subpopulações de células efectoras que produzem grupos distintos de citocinas. As subpopulações mais bem descritas são denominadas células T_{H1}, T_{H2} e T_{H17}. A citocina mais importante produzida pelas células T_{H1} é o INF- γ (KORN et al., 2009).

Interferons são um grupo de citocinas pleiotrópicas que desempenham papéis importantes na comunicação celular durante a resposta imunológica inata e a adquirida, na defesa contra infecções virais e bacterianas. O INF- γ é um potente ativador dos macrófagos e, por ser produzida também pelas células natural killer (NK) é considerada uma citocina tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida. O INF- γ tem como principal função a ativação dos macrófagos e também estimula a regulação positiva do MHC e ativam a iNOS (ZAIDI; MERLINO, 2011). O excesso de produção de INF- γ é perigoso por poder causar doenças autoimunes (RODA et al., 2006). Foi reportado também que INF- γ pode apresentar tanto atividade citostática e citotóxica quanto proliferativa, dependendo do contexto (ZAIDI; MERLINO, 2011).

Segundo Korn et al. (2009), a citocina efetora IL-17 é produzida principalmente por linfócitos T_H17, mas também é encontrada na imunidade inata nas células NK, nos neutrófilos e nos eosinófilos. As células T_H17 constituem um ramo adaptativo do sistema imunológico, apresentando a função de eliminar patógenos específicos que requerem um efeito inflamatório massivo e não são adequadamente tratados pela imunidade T_H1 e T_H2.

Alguns patógenos que podem dar início à resposta T_H17 são: o Gram-positivo *Propionibacterium acnes*, os Gram-negativos *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides* spp. e *Borrelia* spp., além de *Mycobacterium tuberculosis* e os fungos *Pneumocystis carinii* *Candida albicans* (KORN et al., 2009). Segundo Acosta-Rodriguez et al. (2007), as células de memória CD4⁺ produtoras de IL-17 contém uma grande fração de células reativas contra antígenos fúngicos, sugerindo que estas células são induzidas preferencialmente nas respostas à infecções fúngicas e apresentam um papel importante na organização da resposta contra os fungos. Além disso, as células T_H17 são potente indutoras da inflamação tecidual e vem sendo associada com a patogênese de algumas doenças autoimunes humanas, tais como a esclerose múltipla (BECHER; SEGAL, 2011; LOVETT-RACKE; YANG; RACKE, 2011).

Como pode ser observado, a leucorreia patológica pode estar presente devido a várias etiologias diferentes. Pode-se destacar dentre estas, a vaginose bacteriana, que é um quadro infeccioso muito complexo que vem sendo estudado há décadas e ainda não se apresenta totalmente elucidado. Neste contexto, o presente

trabalho visa auxiliar na comprovação da utilização popular de folhas de *G. barbadense* no tratamento da leucorreia abordando atividades biológicas que envolvem causas e consequências da VB.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar atividades biológicas *in vitro* relacionadas à leucorreia utilizando extratos brutos de folhas de *Gossypium barbadense* L. e respectivas frações semi-purificadas bem como caracterizá-las quimicamente, visando contribuir para a validação científica de seu uso popular.

3.2. Objetivos específicos

Caracterizar quimicamente por CLAE-DAD e CCD extratos brutos aquoso, metanólico e hexânico e frações do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* L..

Caracterizar quimicamente por CG-EM o extrato bruto hexânico e a fração hexânica proveniente do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* L..

Isolar, purificar e identificar substâncias provenientes dos extratos e/ou frações ativas.

Investigar a atividade antimicrobiana de extratos brutos aquoso, metanólico e hexânico e frações do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* L. contra *Gardnerella vaginalis*.

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos brutos aquoso, metanólico e hexânico e frações do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* L..

Avaliar efeitos anti-inflamatórios dos extratos brutos aquoso, metanólico e hexânico de folhas de *Gossypium barbadense* L. e frações do extrato bruto metanólico, na produção de óxido nítrico e citocinas IL-17, IFN- γ e TNF- α .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Folhas de *Gossypium barbadense* L. (*voucher* CESJ 48612) foram coletadas de um espécimen cultivado no horto medicinal da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em dois dias distintos. A primeira coleta foi no dia 03 de setembro de 2008 às 9 horas da manhã e a segunda foi no dia 19 de dezembro de 2008 às 10h da manhã, sendo as folhas de ambas as coletas misturadas. Após as coletas, as folhas foram levadas para o Laboratório de Fitoquímica/Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da mesma instituição, onde foram espalhadas sobre a bancada para secagem em temperatura ambiente até atingirem peso constante. Depois de reunidas e secas, as folhas atingiram o peso de 300 g.

4.2. Extratos e frações semi-purificadas

As folhas secas foram divididas em duas alíquotas de 150 g. Uma alíquota foi submetida à extração por infusão com 3 L de água destilada por 4 h. Após este tempo, o sobrenadante foi filtrado em algodão e congelado em béqueres tampados com papel de filtro a -80°C . O material congelado foi liofilizado na Embrapa Gado de Leite, Unidade Juiz de Fora. O extrato bruto aquoso liofilizado foi mantido em *freezer* a -18°C .

A outra alíquota foi submetida à extração por maceração estática sucessiva com n-hexano (21 vezes), seguido de metanol (8 vezes) sempre na concentração de 2 L de solvente para 150 g de planta. Os extratos obtidos tiveram os solventes retirados com auxílio de evaporador rotativo, da marca Fisatom modelo 802, a 40°C e pressão reduzida por bomba de vácuo da marca Tecnal. Os solventes utilizados para extrações foram da marca Vetec e grau PA.

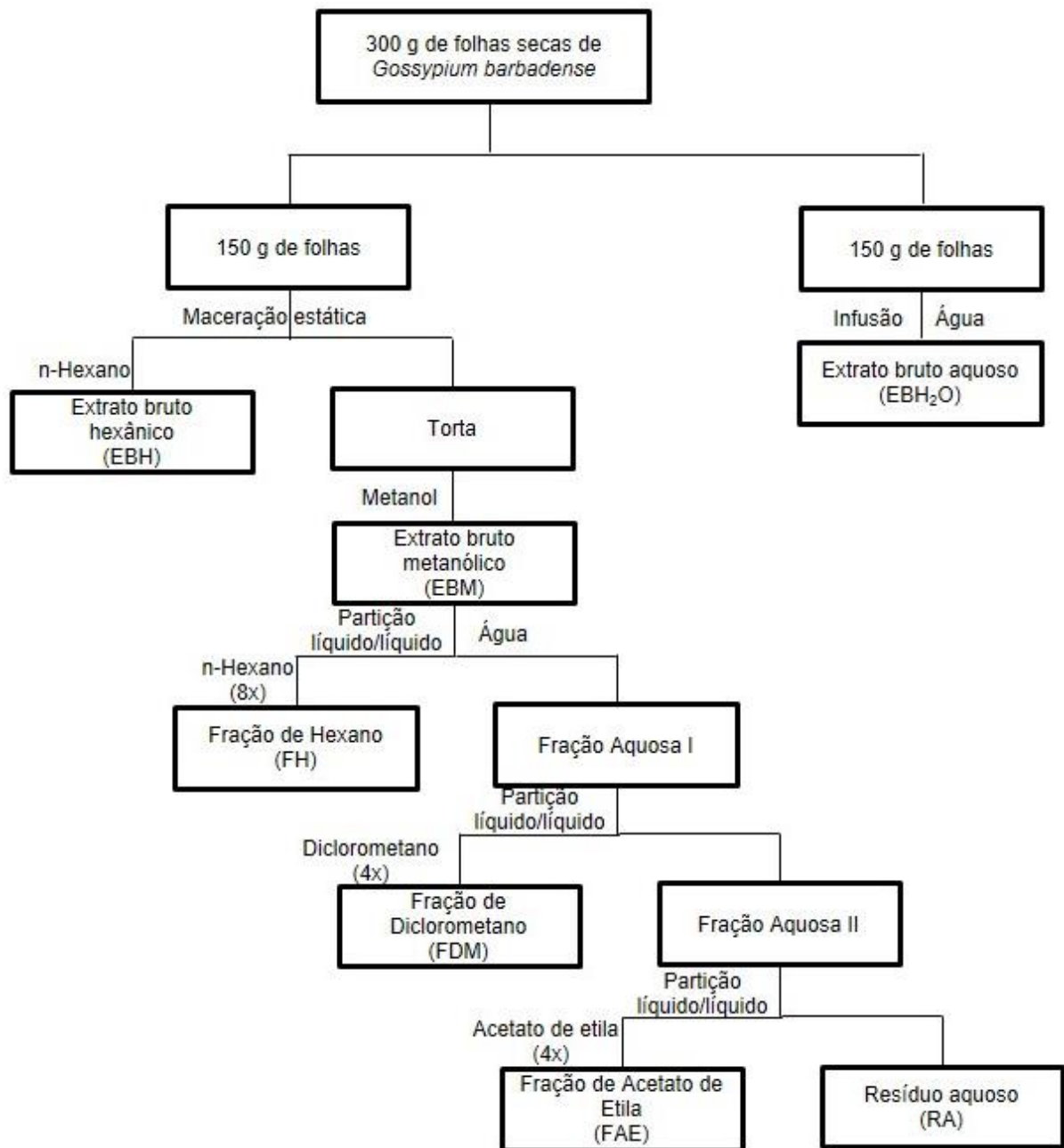


Figura 5 – Esquema de obtenção de extratos e frações de folhas de *Gossypium barbadense* L.

Uma alíquota de 5 g do extrato metanólico foi solubilizada em 600 mL de água destilada. Este volume foi dividido igualmente em três funis de separação e submetido à partição líquido-líquido (v/v) com n-hexano (oito vezes), diclorometano (quatro vezes) e acetato de etila (quatro vezes). Todos os processos de partição foram realizados na proporção de 1:1 (água : solvente orgânico). As frações orgânicas foram reduzidas em evaporador rotativo a 40°C e pressão de vácuo, obtendo-se frações semi-purificadas hexânica, diclorometânica e em acetato de

etila, além de resíduo aquoso, que foi liofilizado (liofilizador da marca Torroni modelo Enterprise I) no Laboratório de Fitoquímica/ICB. Os extratos e frações semi-purificadas secos foram mantidos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar.

4.3. Perfil químico dos extratos brutos e frações

4.3.1. Cromatografia de camada delgada (CCD)

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em cromatoplasmas da marca Alugram em gel de sílica modelo SIL G/UV₂₅₄ e com solventes de grau PA da marca Vetec. EBM, EBH₂O, FAE e RA foram solubilizados em metanol PA, EBH e FH foram solubilizados em n-hexano PA e FDM foi solubilizada em diclorometano PA, todos na concentração de 10 mg/mL, sendo aplicados 10 µL nas placas em forma de bandas de 0,5 cm.

O sistema de eluição para EBM, FH, FDM, FAE foi acetato de etila : metanol : água (100:13,5:10), para EBM, EBH₂O e RA, acetato de etila : ácido acético glacial : água (100:11:26) e para EBM, FDM, FH e EBH, tolueno : acetato de etila (93:7). Todas as amostras foram analisadas em luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm antes da utilização de reveladores químicos. Os reveladores químicos utilizados foram cloreto férrico, NP/PEG e vanilina/ácido sulfúrico. Os sistemas e reveladores foram utilizados segundo Wagner, H. e Bladt (2001).

4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD)

Uma alíquota de 5 mg dos extratos e frações semi-purificadas do extrato bruto metanólico foram enviadas para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na Plataforma Analítica de Farmanguinhos, FIOCRUZ/RJ. Os

perfis químicos das amostras foram obtidos por CLAE–DAD, em equipamento Shimadzu com 2 bombas LC-10AD, desgaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A e detector por arranjo de diodos SPD-M10AVP. Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A. Aquisição de dados e controle pelo *software* Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2.

Todos os solventes utilizados foram grau CLAE/UV, marca TEDIA.

As amostras foram diluídas para obtenção da concentração de 2 mg/mL. EBM, EBH₂O e RA foram solubilizados na fase móvel e EBH, FAE, FDM e FH foram solubilizados em tetraidrofurano. Foram injetados 20 µL de cada amostra em coluna Supelcosil - C18 – 25 cm X 4,6 mm - 5 µm, na presença de coluna guarda do tipo supelcoguard: LC 18 – 2 cm. Foi utilizado um sistema com gradiente linear que consistiu de uma fase móvel: TFA 0,05% em água (A) e acetonitrila (B), com fluxo de fase a 1 mL/min, variando de 5% a 65% de B (0 – 60 min), 65% a 100% de B (60 – 70 min), mantendo os 100% até 80 min. Foi realizado um monitoramento utilizando-se o detector UV em varredura entre 200 a 400 nm, sendo selecionadas as leituras a 220, 270, 335 e 360 nm, das quais posteriormente foram priorizadas para comparação química os comprimentos de onda 220 e 335nm.

4.3.3. Cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

Uma alíquota de 5 mg do extrato bruto hexânico e da fração hexânica do extrato metanólico bruto foram enviadas à Plataforma Analítica de Farmanguinhos para serem analisadas em um cromatógrafo com fase gasosa Hewlett-Packard 6890 acoplado ao espectrômetro de massas Hewlett-Packard 5972, utilizando-se coluna capilar de sílica fundida (DP-5MS, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm de espessura da camada), tendo hélio como gás de arraste, com fluxo de 0,5 mL/min, por 60 min e injeção de 1 µL da amostra. A temperatura foi programada para variar de 70°C a 325°C. A temperatura do injetor foi 270°C e a do forno 300°C. Os parâmetros de operação do EM foram: 70 eV, fonte de íons a 250°C equipada com EI. O quadrupolo foi configurado para selecionar íons com m/z de 40 a 700.

Os espectros de massa obtidos na análise foram confrontados com o banco de dados WILEY 7n.1 do próprio equipamento. Quando não foi possível a identificação pelo banco de dados, os espectros foram comparados com espectros presentes em Adams, R.P. (1985) e na base de dados Pherobase (2013). O índice de retenção foi calculado utilizando-se a fórmula:

$$IR = 100 \times \left(n + \frac{t_s - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right)$$

Onde: IR – índice de retenção; n – número de carbonos do hidrocarboneto anterior; t_s – tempo de retenção da substância analisada; t_n – tempo de retenção do hidrocarboneto anterior; t_{n+1} – tempo de retenção do hidrocarboneto posterior.

Os índices de retenção de literatura foram retirados da base Pherobase (2013).

4.4. Isolamento e purificação

4.4.1. Coluna cromatográfica em gel de sílica

Visando o isolamento do constituinte encontrado em FDM de maior sinal em CLAE-DAD, foi utilizada uma coluna de gel de sílica 60. Foram utilizados 450 mg da FAE. Esta fração foi utilizada por também apresentar o mesmo constituinte, porém em maior quantidade. Utilizou-se gradiente de polaridade crescente de eluição com hexano, hexano / acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/metanol e metanol. As frações obtidas foram reduzidas em evaporador rotativo e após secas, foram realizadas CCDs, utilizando-se para observação luz UV (254/365nm) e NP/PEG como revelador.

4.4.2. Cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP)

Foram realizadas duas cromatografias em camada delgada preparativas (CCDPs) da fração que apresentou revelação em NP/PEG para flavonoide, obtida da coluna de gel de sílica na eluição metanol : acetato de etila (25:75). As cromatoplasmas utilizadas foram da marca Uniplate com dimensões de 20 cm x 20 cm com gel de sílica e granulometria de 1000 μm . Em cada uma das placas foi aplicado 100 mg da amostra e eluídas com o sistema acetato de etila : metanol : água (100:13,5:10). O constituinte de coloração amarela, com R_f de 0,51, foi retirado de ambas as placas, e solubilizado com metanol. Após secas, ambas as frações foram analisadas em CLAE-DAD, para monitoramento do fracionamento.

Foi utilizado um cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series, com detector de arranjo de fotodiodos e injetor automático no Laboratório de Bioquímica/ICB/UFJF. As frações foram solubilizadas na concentração de 1 mg/mL e injetados em coluna analítica de fase reversa (Zorbax SB-18; 15 cm X 4,6 cm X 5 μm). A análise foi realizada utilizando-se um sistema com gradiente linear que consiste de uma fase móvel: água com pH = 3, acidificada com ácido fosfórico (A) e acetonitrila (B), com fluxo de fase a 1 mL/min, partindo no tempo zero com 5% de acetonitrila, chegando à 65% em 30 minutos. Foi realizado um monitoramento utilizando-se o detector UV em varredura entre 200 a 400 nm, sendo selecionadas as leituras de 230, 354, 280, 335 e 360 nm.

Após a confirmação de perfis semelhantes, as duas amostras foram reunidas, resultando em 140 mg da fração.

4.4.3. CLAE-DAD escala semi-preparativa

Os 140 mg obtidos na CCDP foram solubilizados em 1 mL de metanol e injetados (100 μL por injeção) no cromatógrafo no Laboratório de Bioquímica/ICB/UFJF, porém utilizando-se coluna de escala semi-preparativa de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 9,4 cm X 5 μm) e sistema isocrático com 15%

de acetonitrila em água utilizando fluxo de 3,5 mL/min. Foram coletadas seis frações.

A fração 6 (24,5 a 30 min) foi reinjetada utilizando-se sistema de gradiente que consistiu de uma fase móvel: água (A) e metanol (B), com fluxo de fase a 3,5 mL/min, partindo no tempo zero com 10% de B chegando a 50% em 10 minutos. Entre 10 e 20 minutos, o gradiente partiu de 50% a 70% de B, ao atingir os 20 minutos até os 25 minutos o gradiente foi de 70% a 100% de B. A coleta foi automática realizada de acordo com o aparecimento dos sinais emitidos pelo DAD. Foram coletadas três substâncias com espectros UV característico de flavonoide. Estas substâncias foram denominadas GbFlav-1, GbFlav-2 e GbFlav-3.

Os flavonoides foram enviados para análise de RMN ^1H , COSY e HSQC porém, devido a um baixo rendimento de GbFlav-1 e GbFlav-2, gerando espectros com baixa qualidade, apenas GbFlav-3 será abordado.

4.5. Ressonância Magnética Nuclear

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , COSY e HSQC foram realizadas em aparelho da marca Bruker modelo Avance III com frequência de 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , utilizando como solvente metanol deuterado. As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Campinas pelo Dr. Alviclér Magalhães.

4.6. Atividade antibacteriana contra *Gardnerella vaginalis*

4.6.1. Teste de difusão em ágar

No teste de difusão em ágar, realizado no Laboratório de Bacteriologia/Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas,

com *G. vaginalis* foram utilizadas três ATCCs (14019, 14018 e 49145) e duas cepas de isolados clínicos (103.2 e 126,2) de vaginose bacteriana.

As placas de Petri foram preparadas com 40,0 mL de ágar Mueller Hinton suplementado com 1% de proteose peptona com 5% de sangue de cavalo, de acordo com o padronizado pelo CLSI (2012) para microrganismos anaeróbios, com modificações. Após secas, as placas de Petri foram inoculadas com soluções de *Gardnerella vaginalis* padronizados na escala de 1,0 Mc Farland. Foram feitos oito poços no ágar para a aplicação dos extratos e do controle (DMSO), utilizando-se a extremidade maior de uma ponteira de 1000 µL, formando um furo de 1 cm de diâmetro. Em seguida, foram adicionados 50 µL dos extratos diluídos em DMSO (1 mg/mL) e do controle (DMSO) em cada poço. As placas foram incubadas em anaerobiose mecânica (jarra de CO₂), a 37° C, por 72 h. A leitura foi feita 72 h após a incubação.

4.6.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado no Laboratório de Bacteriologia/Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas.

Para avaliação do perfil de susceptibilidade aos extratos que apresentaram resultados relevantes no teste de halo de inibição, o método a ser utilizado foi a diluição em ágar, utilizando ágar Mueller Hinton suplementado com 1% de proteose peptona, de acordo com o padronizado pelo CLSI (2012) para microrganismos anaeróbios, com modificações. Soluções iniciais dos extratos foram preparadas em cabine de fluxo laminar em duas concentrações (10 mg/mL e 1 mg/mL), utilizando-se água MilliQ e DMSO estéril, para que não fosse necessário filtrar a solução em membrana de 22 µm, visto que a solução de maior concentração apresentou viscosidade elevada. A partir das soluções iniciais foram preparadas placas com concentrações crescentes (de 0,0625 µg/mL a 1024,00µg/mL) dos extratos adicionados em 20,0 mL do meio de cultura fundido (45°C) com 5% de sangue de cavalo.

Com o uso do Replicador de Steers (STEERS, FOLTZ e GRAVES, 1959), inóculos padronizados na escala de 1,0 Mc Farland das amostras foram adicionados às placas contendo os extratos (em duplicata), sequencialmente, em ordem crescente de concentração, as quais foram incubadas em anaerobiose mecânica (jarra de CO₂), a 37° C, por 72h. Placas de controle negativo, sem adição dos extratos, foram inoculadas ao início e ao final de cada série de diluição dos extratos. A leitura dos resultados foi feita após 72 horas de incubação, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos para 22 isolados clínicos e cepas de referência ATCC 14019 e 14018. Os resultados foram confrontados com os de Knupp (2013) que testou a susceptibilidade destas linhagens utilizando o mesmo protocolo experimental frente à ampicilina (pura e em associação com sulbactam), metronidazol, clindamicina, cloranfenicol, secnidazol e tinidazol.

4.6.3. Bioautografia

A cromatografia em camada delgada foi realizada em cromatoplaça da marca Alugram em gel de sílica modelo SIL G/UV254 e com solventes de grau PA da marca Vetec. Foram utilizadas cromatoplaças de 12 x 4 cm, respeitando-se 1 cm da base e um 1 cm do topo da placa, gerando um campo cromatográfico de 10 cm. Em cada placa, 1 mg de EBM foi aplicado em dois pontos distintos, respeitando-se 1 cm de cada borda e entre as aplicações. Além disso, foram preparadas placas de 1 x 1 cm onde foi aplicado 1 mg de EBM, às quais foram utilizadas como controle e, para tanto, não foram eluídas.

O sistema de eluição foi acetato de etila : metanol : água (100:13,5:10). Após a eluição, as placas foram secas e cortadas ao meio, separando os dois cromatogramas, um para a bioautografia e outro para revelação com NP/PG.

Após cortadas, as cromatoplaças não reveladas e os controles de cada extrato foram colocados em uma placa de Petri estéril. Sobre as placas foi adicionado 40 mL de ágar Mueller Hinton suplementado com 1% de proteose peptona e 10% de soro de cavalo, de acordo com o padronizado pelo CLSI (2012) para microrganismos anaeróbios.

Para a bioautografia foi utilizada a linhagem 109.1 de isolado clínico de *G. vaginalis*, por ser a linhagem experimental que apresentou maior susceptibilidade ao extrato testado. Foram preparados inóculos padronizados na escala de 1,0 Mc Farland. As soluções foram inoculadas por esgotamento sobre o ágar solidificado utilizando *swab* estéril. As placas foram incubadas em anaerobiose mecânica (jarra de CO₂), a 37° C, por 72 h, após as quais foi observada a presença ou ausência de halos de inibição. O protocolo experimental foi realizado em triplicata.

4.7. Citotoxicidade contra *Artemia salina*

A presença de constituintes citotóxicos em EBM e FDM foi avaliada utilizando-se a metodologia proposta por Meyer et al. (1982) e modificada por Afonso-Neto (2003). Ovos de *Artemia salina* da marca TROPFISH® foram colocadas para eclodir em aquário com água do mar artificial arejada durante 48h para a obtenção dos náuplios. As amostras foram solubilizadas em água do mar artificial, com a ajuda de diluente Tween 80:DMSO 12,5% (3:7). Os testes foram realizados em tubos de ensaio com 10 náuplios, preenchidos com 3 mL da amostra a ser analisada nas concentrações de 5000, 1000, 500, 100, 50 µg/ml. Após 24 horas foram contados os náuplios vivos nas diferentes concentrações. Água do mar artificial + Tween 80: DMSO 12,5% foram usados como controles negativo. Os testes foram realizados em quadruplicata, gerando um total de 40 náuplios por concentração de extrato testada. Os resultados foram expressos em CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% dos náuplios) que foi calculado pelo método estatístico Probit. As análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica/ICB/UFJF.

4.8. Teste de viabilidade celular (MTT)

Foram realizados testes de viabilidade celular após a adição dos extratos e frações, obtidos de acordo com procedimento proposto por Mosmann (1983) no Laboratório de Glicoconjugados/Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas. Em placas de 96 poços, as células de fibroblasto murino (3T3) e adenocarcinoma mamário humano (MCF7) foram incubadas com EBH, EBH₂O, EBM, RA, FAE FDM e FH na concentração de 100 µg/mL por 20 horas, quando foi adicionado o sal de tetrazólio MTT (brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil). A viabilidade celular foi medida pela conversão do sal de tetrazólio (amarelo) em cristais de formazam (azul) que foram ressuspensos em DMSO para análise em leitor de microplacas a 492 nm. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, com a análise estatística realizada pelo programa *Graphpad Prism®* e o teste de Tukey utilizado, sendo considerado $p < 0,05$ para indicar uma estatística significativamente diferente.

4.9. Atividade anti-inflamatória *in vitro*

4.9.1. Animais

Para o desenvolvimento deste estudo, foi utilizado um modelo experimental com 20 camundongos BALB/c, fêmeas, adultas, que se encontravam no período de 8 a 12 semanas de vida. Estes animais foram obtidos do Biotério do Centro de Biologia e Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de fora (UFJF). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa/UFJF com o número 068/2012-CEEA (ANEXO A). Os animais foram alojados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais – Faculdade de Farmácia. A temperatura foi mantida ao redor de 22°C, pela ventilação

natural no verão, e no inverno, com ajuda de aquecedores. A iluminação foi mista – luz natural e lâmpadas fluorescentes – sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6h e apagarem às 18h. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno por quarentena, sendo um total de 05 camundongos por gaiola, providas de camas de maravalhas selecionadas, mas não esterilizadas, mamadeira para água e cocho para ração do tipo peletizada.

4.9.2. Obtenção dos Esplenócitos

Após eutanásia com xilasina (30 mg/kg) e quetamina (160mg/kg) (DAMY, et al, 2010) os animais tiveram o baço retirado por dissecação.

Os baços dos animais foram coletados de forma asséptica e, após lavagem com solução de RPMI estéril, foram macerados em 5 mL desta mesma solução. Estas células foram centrifugadas (1200 rpm, 8 min, 4°C) e o botão celular ressuspense em solução de cloreto de amônio para lise das hemácias. Este processo foi repetido até completa lise das hemácias. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo (10% SFB – soro bovino fetal) e ajustadas na concentração de 2×10^7 células/ml. Após ajustada a concentração, as células foram novamente centrifugadas (1500 rpm/10 min/ 4°C) e o precipitado obtido suspenso em meio RPMI completo (10% de SFB).

4.9.3. Grupos experimentais

Ao todo foram utilizados cinco grupos de células nesse estudo. As células foram utilizadas como controle negativo e não receberam qualquer tipo de tratamento. Os demais grupos foram expostos aos extratos brutos em diferentes concentrações e/ou imuno-estimulantes (concanavalina A) para avaliar o padrão de resposta sobre os mediadores inflamatórios.

Grupo I (controle negativo basal): Células mantidas em cultura sem qualquer tratamento ou estímulo;

Grupo II (controle negativo estimulado): Células mantidas em cultura e estimuladas com concanavalina A;

Grupo III, IV e V: Células mantidas em cultura na presença de concanavalina A e de extrato bruto aquoso, extrato bruto metanólico e extrato bruto hexânico das folhas de *G. barbadense* nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL.

4.9.4. Utilização dos sobrenadantes de cultura de esplenócitos

Para determinação de NO, TNF- α , IL-17 e IFN- γ foram utilizados os sobrenadantes da cultura de células. As células em suspensão foram incubadas em placas de seis poços por uma hora em estufa a 37°C e 5% de CO₂, transferidas para tubos do tipo falcon de 15 mL para serem contadas em câmara de Neubauer com azul de Tripán, avaliando-se a viabilidade das células. Foi realizado o ajuste de 2×10^6 células/mL, que foram incubadas em cultura por 48 horas com estímulo e expostas aos extratos. Após este procedimento, o sobrenadante foi coletado para a realização do doseamento.

4.9.5. Produção de óxido nítrico (Nitrito)

Uma alíquota de 50µL do sobrenadante de cultura de esplenócitos foi adicionada nos poços da microplacas de ELISA com fundo chato tipo Corning. Foram adicionados 50 µL de sulfanilamida a 1% e a solução foi incubada por cinco minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Adicionou-se 50 µL de NED (0,1% dihidroclorato de naftiletlenodiamina diluído em 2,5% de H₃PO₄) nos poços e a solução foi novamente incubada por cinco minutos em temperatura ambiente e protegida da luz, permitindo a Reação de Griess (Ding et al., 1988). A absorbância foi medida utilizando-se um filtro de 540 nm em um leitor automático de ELISA

(SPECTRAMAX 250, Molecular Devices) e a produção de NO quantificada através de comparação com uma curva padrão de nitrito em concentrações variando de 3,12 a 100 μ M, sendo os resultados expressos em mols/mL.

4.9.6. Doseamento de citocinas

Suspensões de esplenócitos foram cultivadas na densidade de 2×10^5 /poço em meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina (RPMI 5%, Sigma), em câmara úmida, a 37° C e em atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram estimuladas com concanavalina A a 10 μ g/ml. Sobrenadantes foram coletados após 48 h e transferidos para Placas de ELISA onde foram sensibilizadas com um primeiro anticorpo (anti-TNF- α , anti-IFN- γ e anti-IL-17) (PeProtech Inc, New Jersey), diluídos em PBS, incubados durante 16 horas a 4°C e bloqueadas com PBS-Tween 20 (PBS-T) + 10% SFB, por duas horas. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e, em seguida, adicionados padrões das citocinas recombinante de camundongo (PeProtech Inc, New Jersey) e as amostras dos sobrenadantes das culturas. As placas foram então incubadas por mais duas horas em temperatura ambiente. Terminada a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes em PBS-T e o segundo anticorpo (biotinilado) dos respectivos anticorpos primários (PeProtech Inc, New Jersey) foram adicionados e incubados por mais uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, quatro lavagens com PBS-T foram feitas e foi adicionado o conjugado enzimático constituído do complexo streptoavidina-peroxidase, na diluição de 1/400 (SIGMA - Co, St. Louis), seguido de incubação por mais 1 hora. Após este período, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo Tampão citrato (pH 5,5), cromógeno OPD (1mg/mL) e água oxigenada 30% (1 μ g/mL). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4 N e a leitura feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 250, *Molecular Devices*) a 440 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com as curvas padrões recombinantes (as concentrações dos anticorpos e recombinantes foram de acordo com recomendações do fabricante PeProtech Inc, New Jersey).

4.9.7. Análise estatística

Dados foram expressos em média \pm erro padrão e a análise estatística realizada pelo programa *Graphpad Prism*® e o teste de Dunn's com Kruskal – Wallis utilizado, sendo considerado $p < 0,05$ para indicar diferença estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos extratos e frações semi-purificadas

A massa e o rendimento obtido nas extrações estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimento das extrações e das frações do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* L.

	EBH ₂ O	EBH	EBM	FH	FDM	FAE	RA
Massa (g)	30,16	3,37	18,91	1,07	0,87	0,83	2,04
Rendimento (%)	20,11	2,25	12,61	21,42	17,38	16,52	40,88

EBH₂O – Extrato bruto aquoso; EBH – Extrato bruto hexânico; EBM – Extrato bruto metanólico; FH – Fração hexânica de EBM; FDM – Fração diclorometânica de EBM; FAE – Fração em acetato de etila de EBM; RA – Resíduo aquoso de EBM.

5.2. Caracterização química dos extratos

5.2.1. Cromatografia em camada delgada

A caracterização química dos extratos e frações teve início com a análise por cromatografia em camada delgada (CCD), como pode ser observado na Figura 6. A observação da Figura 6A indica a presença de uma mesma substância no centro da cromatoplaça ($R_f \sim 0,51$) no extrato bruto metanólico (EBM) e suas frações semi-purificadas. A Figura 6C, mostra que a substância é fenólica e a Figura 6 D indica que seja um flavonoide. Além disso, na Figura 6 D, pode-se detectar na fração semi-purificada em acetato de etila do extrato bruto metanólico (FAE) outros dois flavonoides ($R_f \sim 0,57$ e $\sim 0,92$), devido à coloração alaranjada e dois prováveis arilpropanoides ($R_f \sim 0,62$ e $\sim 0,93$), devido à coloração azulada, obtida após a revelação com NP/PEG e observação em UV 365 nm (WAGNER, H.; BLADT, 2001).

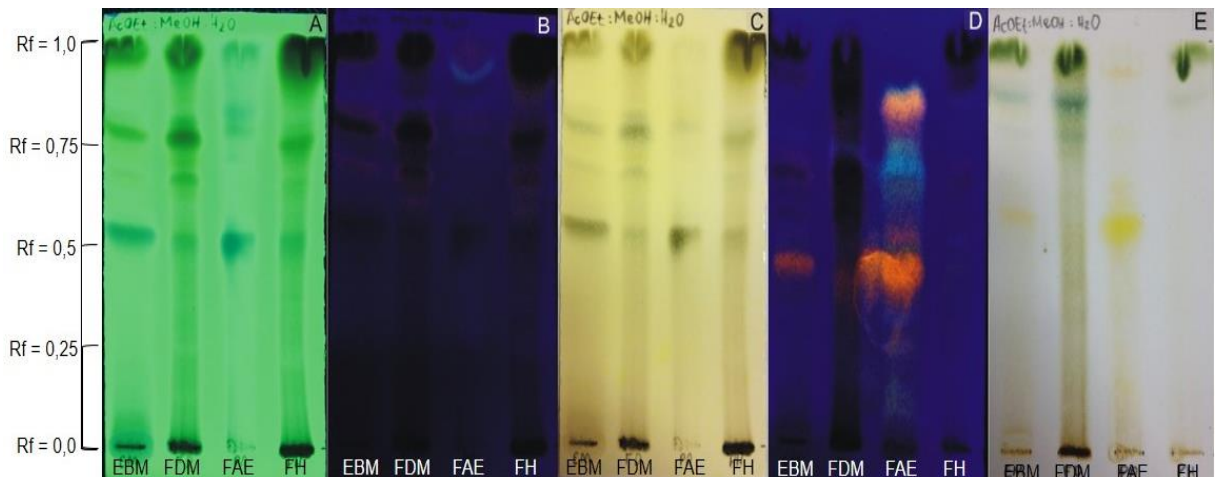


Figura 6 – Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* L. e suas frações semi-purificadas frente aos diferentes reveladores cromatográficos. A – luz UV a 254 nm, B – luz UV a 365 nm, C – cloreto férrico, D – NEP/PG e luz UV de 365 nm, E – vanilina sulfúrica. Fase móvel: acetato de etila : metanol : água (100:13,5:10).

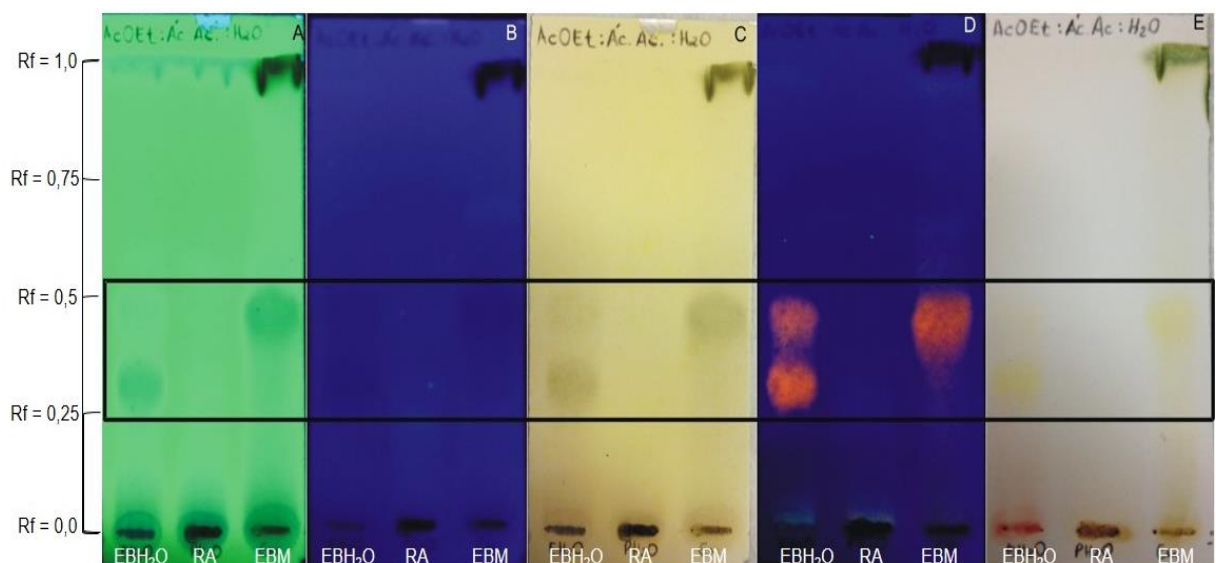


Figura 7 - Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico (EBM), resíduo aquoso de EBM e extrato bruto aquoso das folhas de *Gossypium barbadense* L. frente aos diferentes reveladores. A – luz UV a 254 nm, B – luz UV a 365 nm, C – cloreto férrico, D – NEP/PG e luz UV a 365 nm, E – vanilina sulfúrica. Fase móvel: acetato de etila : metanol : água (100:11:26).

Na Figura 7 (A, C e D) pode ser observada a presença de um flavonoide em EBM ($R_f \sim 0,45$) e dois no extrato bruto aquoso (EBH₂O), com R_f de aproximadamente 0,45 e 0,39, sendo que, aparentemente, a substância de R_f 0,45 é a mesma em EBH₂O e EBM.

Miranda et al. (2013) constataram a presença de substâncias fenólicas e flavonoides nas folhas de *G. hirsutum*. Chugh, Mehta e Dua (2012) constataram a presença de substâncias fenólicas nas folhas de *G. herbaceum*. Estes trabalhos corroboram com os resultados apresentados na Figura 6 e na Figura 7.

Na Figura 8 podem ser observadas as substâncias mais apolares de EBM, FDM, FH e EBH. Na Figura 8 D, pode ser observada a presença de substâncias que, após reveladas com vanilina/ácido sulfúrico, apresentaram coloração violácea, com maior variedade em EBH, estando distribuídas por toda a cromatoplaça, e em um sinal de FH, com Rf de aproximadamente 0,95. Além disto, pode-se observar a presença de sinais esverdeadas em todos os extratos, o que indica a presença de substâncias apolares não terpenoídicas. É importante ressaltar também a presença de sinais equivalentes em FDM e FH, delimitados na Figura 8 E, mostrando que as substâncias presentes na fração hexânica também estão presentes na fração diclorometânica, porém em menor concentração relativa.

Chugh, Mehta e Dua (2012) constataram a presença de terpenoides nas folhas de *G. herbaceum*, corroborando com os resultados apresentados na Figura 8.

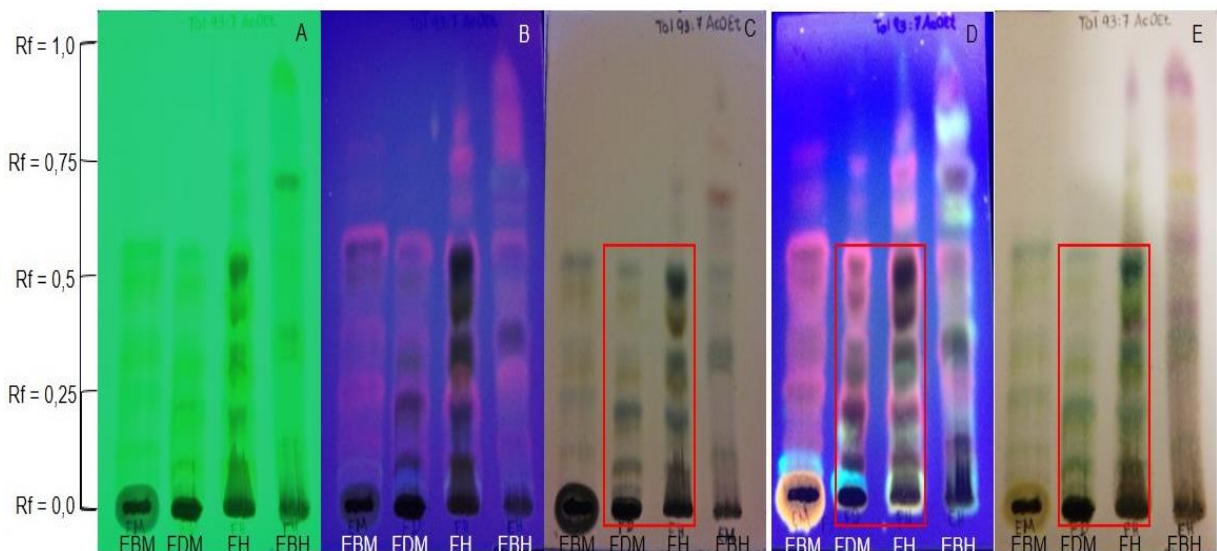


Figura 8 - Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico, suas frações diclorometânica e hexânica e extrato bruto hexânico de folhas de *Gossypium barbadense* L. frente aos diferentes reveladores cromatográficos. A – luz UV a 254 nm, B – luz UV a 365 nm, C – cloreto férrico, D – NEP/PG e luz UV de 365 nm, E – vanilina sulfúrica. Fase móvel: acetato de etila : metanol : água (100:13,5:10).

5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo

A análise por CLAE-DAD dos extratos brutos (Figuras 9 e 10) detectou duas substâncias com espectro de UV semelhante à de arilpropanoides (Figuras 9 e 10 A e B), que também apresentaram revelação característica em CCD e dois possíveis flavonóis em EBH₂O (Figuras 9 e 10 C e D), um possível flavonol em EBM (Figuras 9 e 10 C'), e quatro substâncias que não podem ter a classe química inferida somente pelo espectro de UV em EBH. A análise por CCD mostrada na Figura 7, corrobora com a presença dos dois flavonóis em EBH₂O, mas não mostra os arilpropanoides. Os espectros mostrados nas Figuras 9 e 10 (C, D e C') sugerem que os flavonoides encontrados nos extratos são semelhantes à quercetina, uma vez que apresentam o espectro de UV muito semelhante ao da quercetina-3-O-glicosídeo (Figura 11).

Hedin, Jenkins e Parrott (1992) encontraram três derivados da quercetina, quercetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3'-O-glicosídeo e quercetina-7-O-glicosídeo em grande quantidade em *G. arboreum* e *G. hirsutum*. Zhang et al. (2003) demonstraram grande quantidade de flavonoides como, rutina, isoquercitrina e quercetina nas folhas de *G. hirsutum*. Edreva et al. (2006) também evidenciaram a presença de flavonoides nas folhas de *G. hirsutum*. Estes autores demonstraram também a presença de derivados do ácido cinâmico. Estes trabalhos corroboram com os dados do presente estudo, ratificando a possibilidade da presença de arilpropanoides e flavonoides nos extratos.

Embora o gossipol e seus derivados possam ser encontrados nos extratos obtidos de *G. barbadense*, a presente análise não os detectou, uma vez que é mais comum sua presença nas sementes, nas raízes e nas flores do que nas folhas (ABOU-DONIA, 1976). Além disso, segundo Bell et al. (1975) a quantidade desta substância pode ser muito pequena, tornando sua detecção muito difícil.

Com base nos espectros de UV e nos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das Figuras 9 e 10 pode-se sugerir que o flavonol encontrado em menor quantidade em EBH₂O (R_f ~ 0,39 na Figura 7 e Figura 10 C) seja o mesmo encontrado em EBM, uma vez que ambos apresentaram mesmo espectro de UV, tempo de retenção em CLAE e R_f em CCD, corroborando com a proposta anterior.

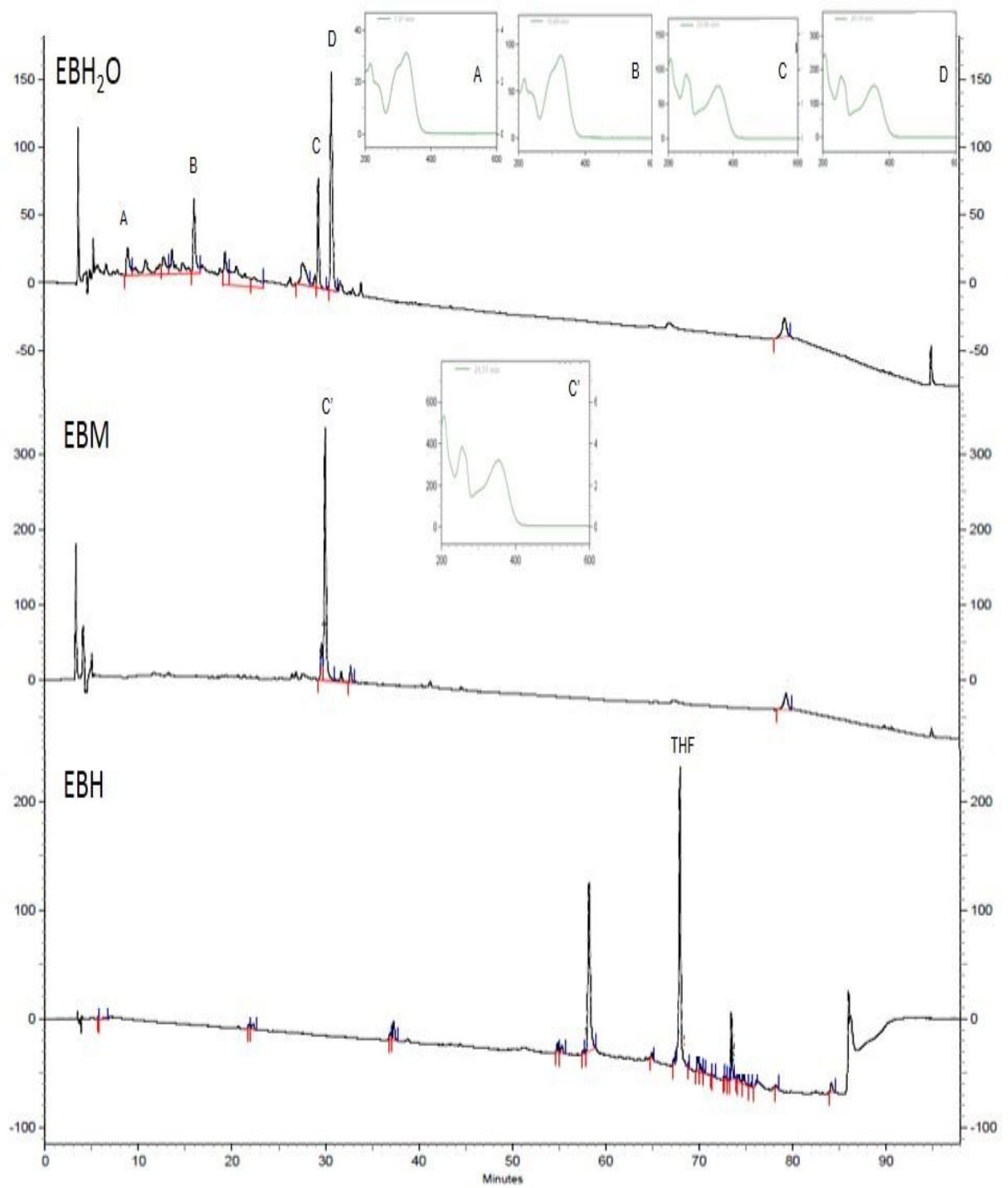


Figura 9 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de *Gossypium barbadense* L. utilizando-se $\lambda = 220$ nm. O sinal em 69 min representa o THF.

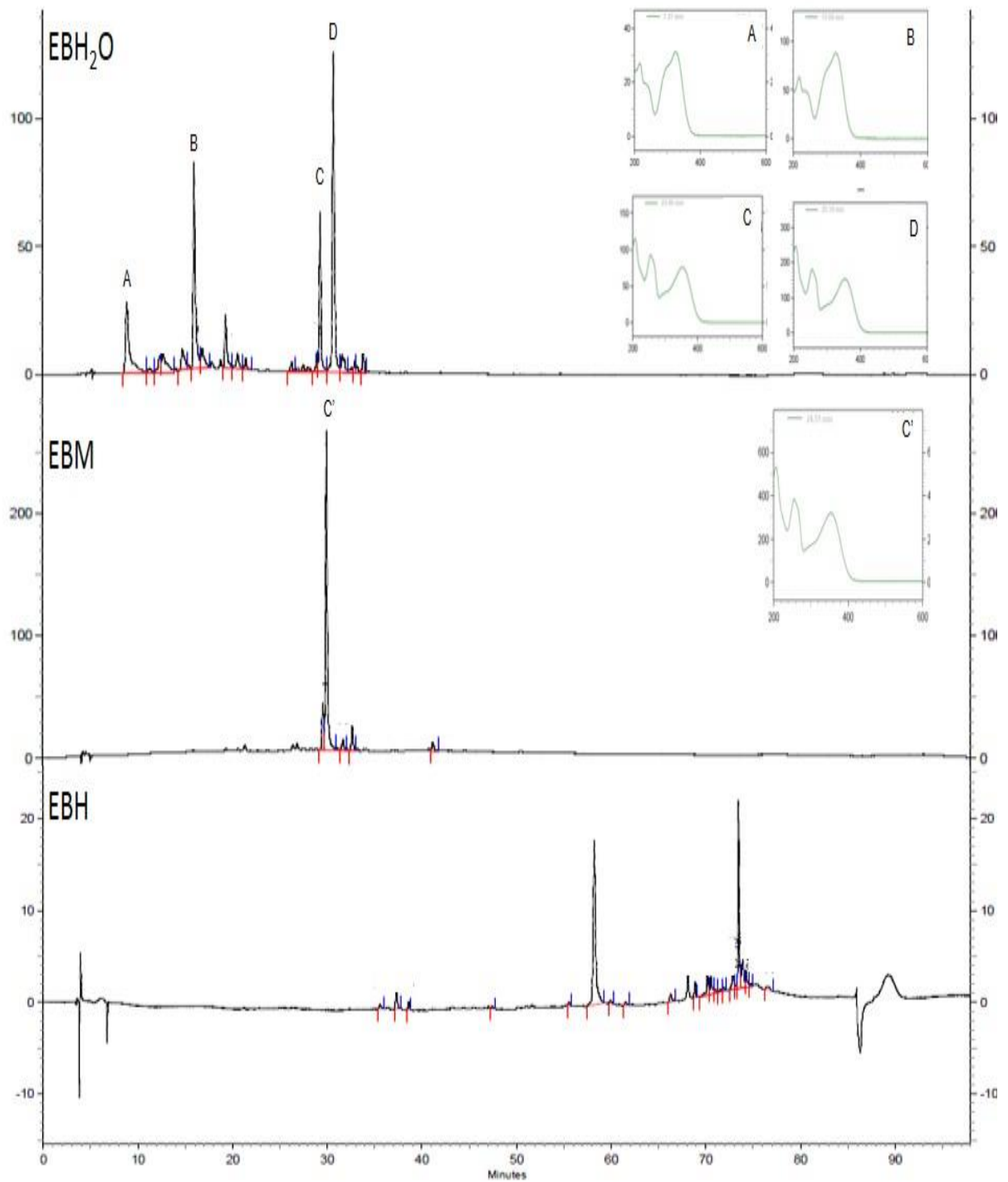


Figura 10 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de *Gossypium barbadense* L. utilizando-se $\lambda = 335$ nm.

Como se pode observar, o flavonol detectado no cromatograma de EBM (Figuras 10 C') está presente em todas as frações (Figura 12 E, E' e E''), porém,

pode-se aceitar que o processo foi eficiente, uma vez que, de modo geral, as demais substâncias detectadas apresentaram comportamento esperado, em que as mais apolares se concentraram na partição hexânica e as mais polares se concentraram em RA.

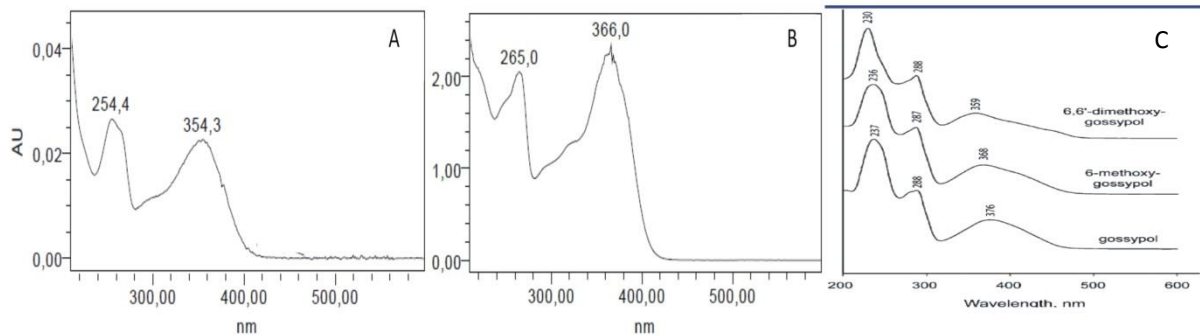


Figura 11 – Espectros de ultravioleta de padrão de flavonóis e gossipol. A: Quercetina-3-O-glicosídeo; B: Campferol, C: Gossipol e seus análogos.

Fonte: A e B – gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Fabíola Dutra Rocha, C – (DOWD; PELITIRE, 2006)

A substância em destaque na FDM (Figura 12 E') é o mesmo flavonol encontrado em FAE e, além dele, podem ser observadas substâncias de polaridade menor, no intervalo de 30 a 38 e a partir de 70 minutos de corrida, também observados na Figura 6 com Rf maior que 0,51. Estas mesmas substâncias com Rf maior que 0,51 da Figura 6 podem ser observadas com mais detalhes na Figura 8. Na FH destacam-se as substâncias de menor polaridade, com tempo de retenção próximo à 70 min da Figura 12, mas estas não puderam ter a classe química inferida apenas pelo espectro de UV. Estas substâncias encontraram-se sobrepostas na Figura 6 E, mas podem ser vistas na Figura 8.

A fração que se apresentou mais rica em substâncias foi RA, onde podem ser observados pelo menos três prováveis arilpropanoides, sinais A, B e C da Figura 12. Também estão presentes substâncias que não tiveram a classe química inferida somente pelo espectro de UV. Não foram observados espectros similares ao do gossipol (Figura 11 C) e seus análogos em nenhum dos extratos e partições.

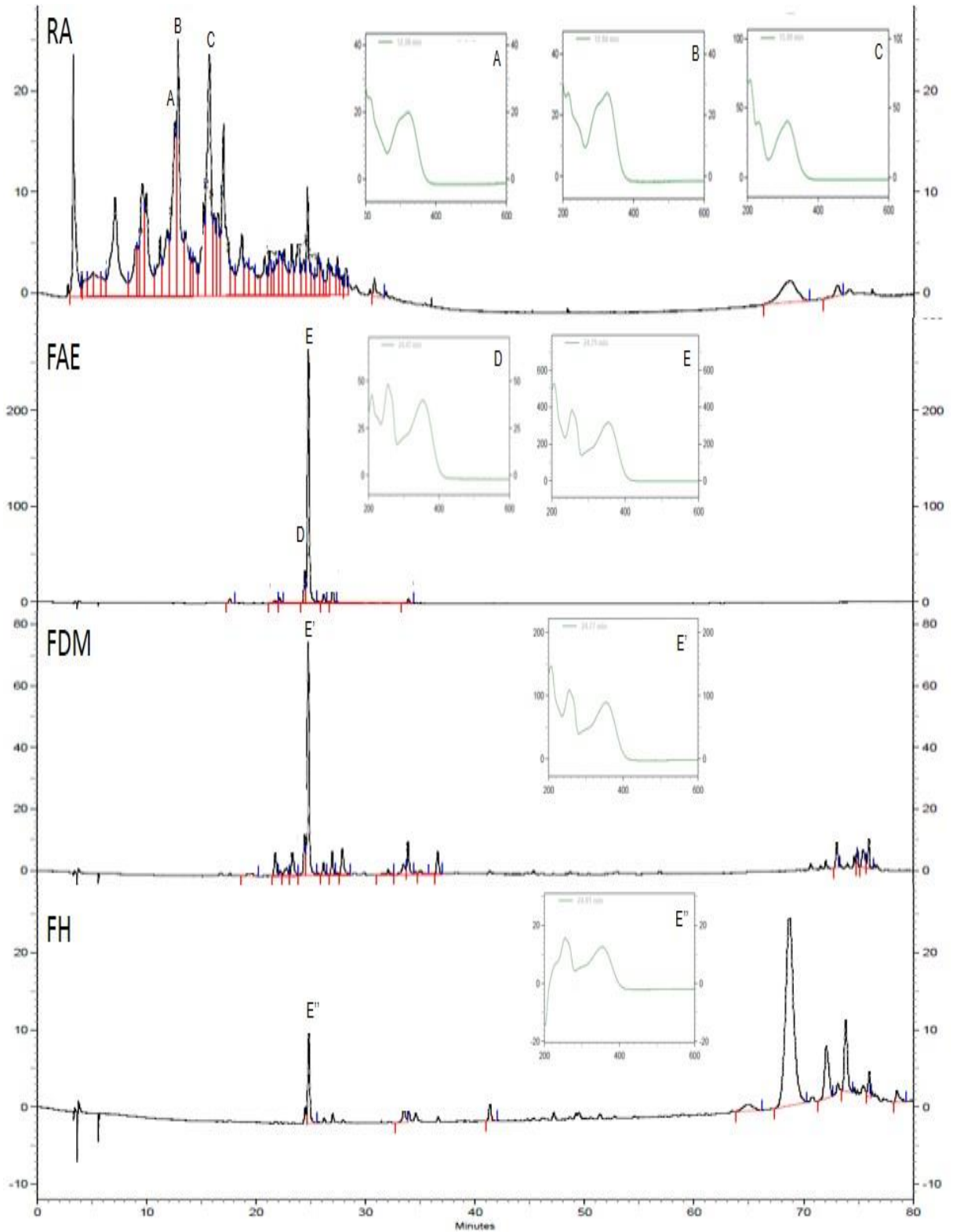


Figura 12 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência das frações dos extratos brutos metanólicos de folhas de *Gossypium barbadense* L. utilizando-se $\lambda = 335$ nm. Espectros de ultravioleta do flavonoide presente em todas as frações, dos arilpropanoides presentes no resíduo aquoso e da substância majoritária na fração hexânica semi-purificada.

5.2.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas

A análise por CG-EM de EBH revelou a presença de 19 substâncias que, pela fragmentação de massas e comparação com banco de dados Wiley 7n.1, indicam a presença de sete sesquiterpenos (22,28% da área), um diterpeno (5,22% da área), seis ácidos graxos saturados (36,59% da área), quatro ácidos graxos não saturados (29,16% da área) e uma substância não identificada (6,75% da área), mas que apresenta o perfil de fragmentação semelhante ao do sesquiterpeno acorenol (ADAMS, R.P., 1985), totalizando 93,25% da área total do cromatograma com sugestão de substâncias.

Tabela 3 – Substâncias detectadas no extrato bruto hexânico de folhas de *Gossypium barbadense* L. em análise por cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

Constituintes	TR	IR _{calc}	IR _{lit} *	Área (%)	Classe química
<i>trans</i> -Cariofileno	17,286	1421	1418	4,91	ST
α -Humuleno	18,184	1456	1454	1,94	ST
β -Selineno	19,015	1490	1485	4,79	ST
α -Selineno	19,171	1496	1494	4,50	ST
<i>cis</i> - γ -bisaboleno	19,438	1501	1515	1,37	ST
δ -Cadineno	19,624	1504	1524	1,56	ST
Laureato de etila	20,997	1535	1597	0,22	AGS
Óxido de cariofileno	21,272	1584	1606	3,21	ST
Não identificado [#]	23,194	1668	-	6,75	-
Miristato de etila	25,680	1781	1793	2,63	AGS
Neofitadieno	26,601	1825	1830	2,46	AGS
Palmitato de metila	28,412	1914	1928	6,88	AGS
Palmitato de etila	29,740	1981	1991	22,30	AGS
<i>cis</i> -Linoleato de metila	31,633	2082	2093	1,36	AGI
Linolenato de metila	31,744	2087	2098	4,32	AGI
Fitol	31,922	2097	2114	5,22	DT
Linoleato de etila	32,850	2140	2159	4,20	AGI
Linolenato de etila	32,962	2147	2169	19,28	AGI
Estearato de etila	33,429	2175	2193	2,10	AGS
Total	-	-	-	100	-

ST – Sesquiterpeno, DT – Diterpeno, AGS – Ácido graxo saturado, AGI – Ácido graxo insaturado, IR_{calc} – Índice de retenção calculado, IR_{lit} - Índice de retenção de literatura, * - Retirado de Pherobase (2013), # - perfil de fragmentação semelhante ao do sesquiterpeno β - acorenol.

Estes resultados vão ao encontro dos encontrados na Figura 8 E, onde se pode observar a presença de bandas violáceas (terpenoides) e bandas esverdeadas

(substâncias não terpenoídicas). Os majoritários, mostrados na Tabela 3, foram palmitato de etila (22,30%) e linolenato de etila (19,28%).

Essien, Aboaba e Ogunwande (2011) estudaram o óleo essencial de *G. barbadense* e demonstraram a presença dos terpenos triciclono, acetato de bornila, α -pineno, α -terpineno, isodieno e β -pineno. Embora estes terpenoides sejam diferentes dos encontrados no presente trabalho, o que pode ser justificado pela diferença entre a extração do óleo essencial e o extrato hexânico, o trabalho destes autores ratifica o aparato celular de *G. barbadense* para a produção desta classe de substâncias. Chugh, Mehta e Dua (2012) constataram a presença de terpenoides nas folhas de *G. herbaceum*, corroborando com os resultados apresentados na Tabela 3.

Em FH foram detectadas sete substâncias que, pela fragmentação de massas e comparação com banco de dados Wiley 7n.1, indicam a presença de três ácidos graxos saturados (23,89% da área), dois ácidos graxos não saturados (22,47% da área), e o diterpeno majoritário fitol (51,51% da área), gerando 97,87% da área total do cromatograma com sugestão de substâncias. Estes resultados são corroborados pela Figura 8 E, onde pode ser observado apenas um sinal de coloração violácea no cromatograma referente à FH. Os outros dois constituintes majoritários encontrados foram o palmitato de metila e linolenato de metila, com 17,33% e 18,85% da área total, sucessivamente (Tabela 4). Isto sugere que as substâncias apolares observadas na Figura 8 E sejam ácidos graxos, uma vez que não apresentaram-se violáceas. As substâncias majoritárias e o linoleato de metila, também estão presentes em EBH em menor concentração relativa.

Tabela 4 – Substâncias presentes na fração hexânica obtida a partir do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* L. (FH) em análise por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Constituintes	TR	IR _{calc}	IR _{lit} *	Área (%)	Classe química
Palmitato de metila	28,396	1913	1928	17,33	AGS
Ácido palmítico	29,050	1946	1984	3,40	AGS
Linoleato de metila	31,620	2081	2093	3,62	AGI
Linolenato de metila	31,724	2086	2098	18,85	AGI
Fitol	31,917	2097	2114	51,51	DT
Estearato de metila	32,222	2114	2088	3,16	AGS
Não identificado	34,718	2255	-	2,13	-
Total	-			100	-

AGS – Ácido graxo saturado, AGI – Ácido graxo insaturado, DT – Diterpeno, IR_{calc} – Índice de retenção calculado, IR_{lit} - Índice de retenção de literatura, * - Retirado de Pherobase (2013).

O trabalho de Ebrahim (2005) demonstrou a presença ácidos graxos saturados e insaturados nas folhas de *G. barbadense* expostas à luz ultravioleta. Dowd (2012) demonstrou a presença de ácidos graxos insaturados nas sementes de *G. hirsutum*. Estes trabalhos ratificam os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4 por comprovarem a capacidade de espécies de *Gossypium* produzirem diferentes tipos de ácidos graxos.

Apesar da caracterização de EBH e FH por CG-EM, não é possível relacionar as substâncias encontradas nesta técnica com as apolares encontradas na CLAE, uma vez que as substâncias identificadas em CG-EM, neste caso, não apresentam cromóforos. É possível verificar que EBH apresentou maior variabilidade de constituintes apolares tanto na análise por CG-EM (Tabela 3) quanto na CCD (Figura 8) do que FH (Tabela 4 e Figura 8)

A análise de CG-EM se mostrou eficaz, uma vez que todos os constituintes foram listados na Tabela 3 e 4, gerando 100% da área tabelada e sugestão de constituintes para 93,25% da área relativa ao EBH e 97,87% da área relativa à FH.

5.3. Identificação

Com o objetivo de se isolar os flavonoides que apresentaram maior sinal nos cromatogramas provenientes de CLAE-DAD das frações semi-purificadas, foram realizados ensaios cromatográficos sucessivos (item 4.4) que resultaram no isolamento de GbFlav-3, um amorfo de coloração amarela. Análise de CCD dessa substância, após revelação com NP/PEG, apresentou coloração amarelada característica de flavonoides e, ao ser submetida à luz UV de λ de 365 nm, apresentou coloração fluorescente alaranjada intensa, similar à da quercetina (WAGNER, H.; BLADT, 2001). O espectro na região do ultravioleta de GbFlav-3, em água : acetonitrila (71:29), mostrou sinais máximos de absorção em λ 211, 251 e 351 nm, regiões específicas de absorção de flavonóis (SIMÕES, C.M.O., et al., 2007). Os dados de RMN ^1H são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Sinais do flavonol GbFlav-3 comparados aos sinais obtidos na literatura

Sinal	δ , ppm (J, Hz) multiplicidade			
	GbFlav-3	Quercetina (DAI et al., 2009)	Quercetina (NASCIMENTO et al., 2006)	Quercetina (JASINSKI, 2010)
H6	6,21 (2,1) <i>d</i>	6,19 (1,2) <i>d</i>	6,17 (2,0) <i>d</i>	6,18 (2,0) <i>d</i>
H8	6,42 (2,1) <i>d</i>	6,40 (1,2) <i>d</i>	6,39 (1,8) <i>d</i>	6,42 (1,7) <i>d</i>
H2'	7,77 (2,2) <i>d</i>	7,67 (1,8) <i>d</i>	7,66 (2,2) <i>d</i>	7,67 (2,1) <i>d</i>
H5'	6,92 (9,0) <i>d</i>	6,88 (9,0) <i>d</i>	6,86 (8,6) <i>d</i>	6,86 (8,6) <i>d</i>
H6'	7,67 (8,5; 2,2) <i>dd</i>	7,53 (8,5; 1,8) <i>dd</i>	7,52 (8,5; 2,1) <i>dd</i>	7,53 (8,8; 2,0) <i>dd</i>

d – dubleto; *dd* – duplo dubleto.

Análise do espectro de RMN ^1H mostrou um duplo dubleto em $\delta 7,67$ (*dd*, $J = 8,52$ Hz e $J' = 2,23$ Hz), além de dubletos em $\delta 7,7767$ (*d*, $J = 2,17$ Hz) e $\delta 6,92$ (*d*, $J = 8,96$ Hz), sugerindo o acoplamento do tipo AMX do anel aromático C dissustituído do flavonol, representando os hidrogênios dos carbonos 6', 2' e 5,' respectivamente. Os dubletos em $\delta 6,42$ (*d*, $J = 2,10$ Hz) e $\delta 6,21$ (*d*, $J = 2,14$ Hz) sugerem o acoplamento *meta* no anel aromático A dissustituído do flavonol. A comparação dos sinais obtidos nesta análise (Tabela 5 e Figuras 13 e 14) com os obtidos por Dai et al. (2009), pode-se afirmar que se trata do flavonol quercetina.

A Figura 13 mostra a ampliação do espectro de RMN, obtido utilizando-se a técnica de COSY, na região de deslocamento característica dos aromáticos. Esta técnica confirmou o acoplamento do hidrogênio do carbono 6 com o do carbono 8 e o acoplamento do hidrogênio do carbono 6' com os dos carbonos 2' e 5'.

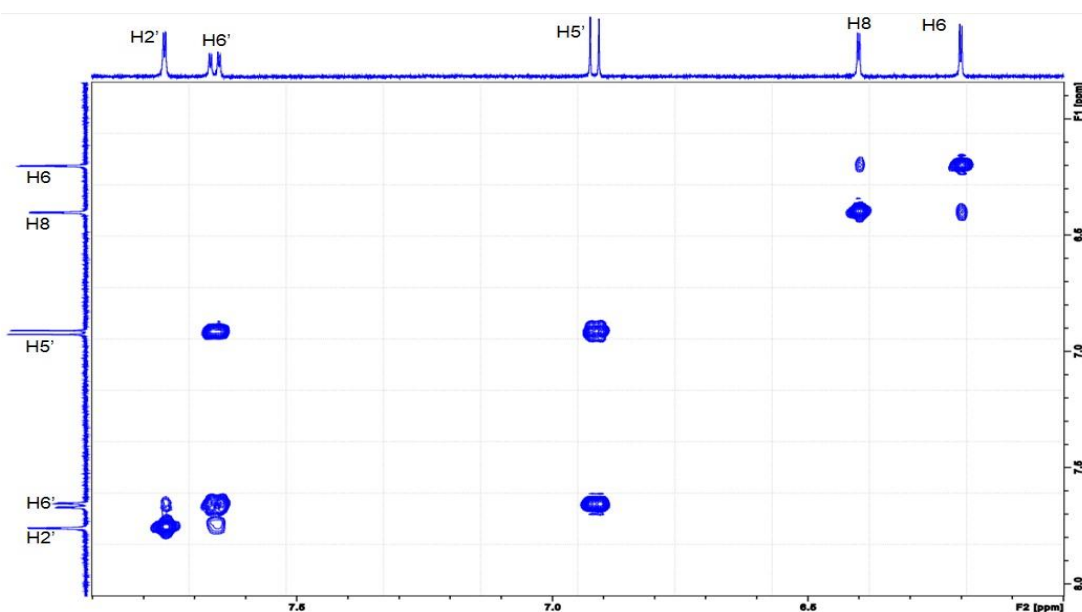


Figura 13 – Espectro de COSY na região do acoplamento aromático de GbFlav-3.

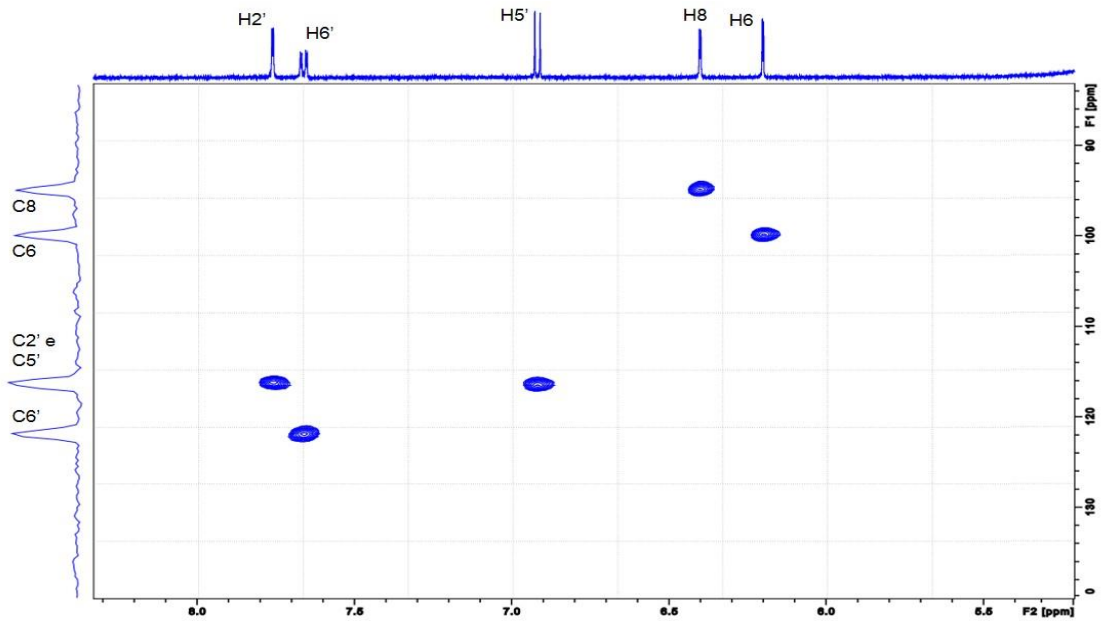


Figura 14 – Espectro de HSQC na região do acoplamento aromático de GbFlav-3.

Estes dados vão ao encontro da proposta formulada durante a análise do perfil cromatográfico dos extratos por CCD e CLAE-DAD, confirmando que o flavonoide isolado é uma quercetina com uma substituição provável na hidroxila do carbono 3, um provável resíduo de açúcar (dados não mostrados). A estrutura da quercetina pode ser vista na Figura 15. Espectros estão sendo aguardados para a confirmação da substituição em 3-O.

Cabe ressaltar que o isolamento de um glicosídeos de quercetina é comum em *Gossypium* (PAKUDINA; SADYKOV, 1970; PAKUDINA; SADIKOV; DENLIEV, 1965; WAAGE; HEDIN, 1984).

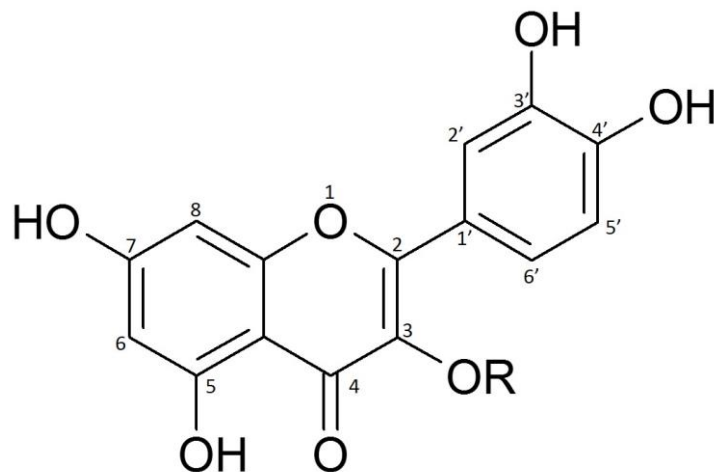


Figura 15 – Estrutura química da quercetina.

5.4. Atividade antibacteriana contra *Gardnerella vaginalis*

5.4.1. Teste de difusão em ágar

Neste teste, os EBM, EBH, FH, FDM, FAE e RA apresentaram um pequeno halo de inibição contra pelo menos uma cepa avaliada e o EBH₂O não apresentou atividade contra nenhuma das bactérias testadas (Tabela 6). O extrato metanólico e a fração de diclorometano foram os únicos que apresentaram atividade em todas as cepas testadas, sendo relevante no procedimento de biomonitoramento.

Tabela 6 – Efeito dos extratos e frações semi-purificadas de folhas de *Gossypium barbadense* L. frente à diferentes cepas bacterianas.

Cepas	Tamanho do halo de inibição (mm)							
	C(-)	EBH ₂ O	EBM	RA	FAE	FDM	FH	EBH
IC (103.2)	-	-	5	-	-	5	-	-
IC (126.2)	-	-	1	-	-	1	1	1
ATCC 14018	-	-	1	1	-	1	1	-
ATCC 14019	-	-	1	-	-	1	-	1
ATCC 49145	-	-	3	-	1	3	-	1

C(-) – Controle negativo (DMSO); IC- isolado clínico.

O flavonoide detectado em EBM e FDM (Figuras 6, 7, 9, 10 e 12) aparentara estar envolvido com a atividade antibacteriana, uma vez que apresentou-se como substância majoritária no sistema CLAE-DAD utilizado, em ambas as amostras que apresentaram atividade. O flavonoide parece, porém, não apresentar atividade isoladamente, uma vez que a FAE também possui o mesmo flavonoide (Figura 12) e nas mesmas condições como majoritário, além de estar em maior concentração relativa do que FDM e EBM na leitura à 335 nm (Figuras 10 e 12), e não apresenta atividade semelhante a estes extratos. Annan e Houghton (2008) também sugerem que a presença de flavonoides biologicamente ativos pode estar relacionada à atividade antimicrobiana. Waage e Hedin (1984) descrevem que os derivados de quercetina e gossipetina isolados das flores de *G. arboreum* apresentaram atividade antibacteriana, suportando a ideia de que os flavonoides, presentes nos extratos em estudo estejam relacionados à atividade contra *G. vaginalis*.

5.4.2. Concentração inibitória mínima (CIM)

Considerando os resultados obtidos no teste de difusão em ágar, foram selecionados para o teste de CIM o EBM, a FDM e 24 cepas, sendo duas ATCCs e 22 isolados clínicos. Segundo Knupp (2013), os isolados clínicos apresentaram resistência aos antibióticos metronidazol, secnidazol, tinidazol e ampicilina e foram sensíveis à clindamicina, ao cloranfenicol e à associação entre ampicilina e sulbactam (ANEXO B). Os valores de CIM_{50%}, CIM_{90%} e variação da CIM entre as cepas testadas estão descritas na Tabela 7.

Como pode ser observado na Tabela 7, foi encontrada CIM_{50%} de 512 µg/mL e 256 µg/mL e CIM_{90%} de 1024 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente para EBM e FDM. Apesar do resultado observado no teste de difusão em ágar, no qual ambos os extratos apresentaram o mesmo halo de inibição, no teste de CIM, FDM apresentou uma atividade aparentemente melhor, sugerindo que esta fração deve ser alvo de futuro fracionamento bioguiado. Considerando o perfil de resistência das cepas testadas, este resultado se torna mais relevante como indicativo para estudos posteriores visando a confirmação da atividade *in vivo*.

A terapia utilizada hoje no tratamento de vaginose bacteriana é, sobretudo, na restauração da microbiota saudável da vagina. Os fármacos de escolha atualmente são o metronidazol ou a clindamicina, com diferentes espectros de atividade, mas aparentemente sua eficácia é em curto prazo, com taxas aproximadas de cura de 80% a 90% em 1 mês (NAGARAJA, 2008). Porém, segundo Menard e Bretelle (2012), o tratamento está em uma condição subótima, com frequentes recidivas após a terapia antimicrobiana.

A recomendação primária para o tratamento de VB é o metronidazol, no entanto, vários estudos tem apontado para a resistência de *G. vaginalis* a esse fármaco (KNUPP, 2013; NAGARAJA, 2008; SIMÕES, A.A., et al., 2001) e a recorrência de sintomas dentro de um curto período de tempo da conclusão do tratamento vem se tornando frequente (BRADSHAW et al., 2006; LARSSON, 1992). Além disso, segundo Brandt et al. (2008) e Bates (2003), os efeitos adversos atribuídos ao metronidazol são frequentes.

Tabela 7 – Efeito de EBM e FDM frente à diferentes cepas bacterianas de *Gardnerella vaginalis*.

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	EBM 1	EBM 2	FDM 1	FDM 2
02.1	1024	1024	256	512
02.2	512	512	256	512
02.3	512	512	256	512
02.4	512	512	256	512
103.1	128	128	256	128
103.2	128	256	128	128
104.4	256	512	128	256
109.1	64	64	32	32
113.1	512	512	256	512
118.1	512	512	64	512
126.1	512	512	256	256
126.2	1024	1024	512	512
127.3	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
128.1	256	512	256	512
134.4	256	256	128	128
135.1 (saud)	512	512	256	256
135.2 (saud)	256	256	256	256
135.4 (saud)	256	128	128	128
135.5 (saud)	512	512	256	256
138.1	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
139.3	512	512	128	64
201.1	512	512	256	64
ATCC 14018	1024	1024	512	256
ATCC 14019	1024	1024	512	512
CIM 50%	512	512	1024	1024
CIM 90 %	256	256	512	512
Variação	64 a >1024	64 a >1024	32 a >1024	32 a >1024

EBM – Extrato Bruto Metanólico; FDM – Fração em Diclorometano do EBM; saud – linhagem isolada de pacientes saudáveis.

Vários trabalhos, como o de Knupp (2013), Teixeira (2010) e Nagaraja (2008), tem apontado para a eficiência da clindamicina, que vem apresentando baixa taxa de resistência, mas, segundo Nagaraja (2008), este fármaco, diferentemente do metronidazol, é conhecido por afetar também os lactobacilos, que são microrganismos residentes e importantes na prevenção de VB e CVV.

Sendo assim, acredita-se que FDM apresentou tendência à melhor atividade que o metronidazol nos testes *in vitro* realizados, com a CIM_{90%} de 512 $\mu\text{g/mL}$, e

EBM apresentou uma atividade similar à do metronidazol, com a CIM_{90%} de 1024 µg/mL, sendo a CIM_{90%} deste fármaco de 1024 µg/mL (KNUPP, 2013). É importante ressaltar, que por se tratarem de extratos brutos e frações semi-purificadas abordadas neste trabalho, o valor de CIM próximo e até inferior ao do metronidazol, que é um fármaco já estabelecido no mercado, mostra o potencial de *G. barbadense* para posteriores estudos envolvendo a atividade contra *G. vaginalis*.

Assim como os resultados encontrados no teste de difusão em ágar, esta tendência apresentada pela fração diclorometânica no teste de CIM, sugere que a atividade não seja restrita aos flavonóis, uma vez que ela apresentam-se em menor concentração relativa em FDM que em EBM (Figuras 9, 10, 12). Além disso, pode ser observado nos cromatogramas apresentados anteriormente, principalmente na Figura 10 e na Figura 12, que FDM apresenta constituintes de polaridade intermediária (32 a 38 min) e mais apolares (70 a 78 min), que não podem ser observados nos cromatogramas de EBM por estarem em menor concentração relativa.

A quercetina já foi descrita por vários autores por sua atividade antimicrobiana, porém, nenhum relato foi encontrado na literatura associando esta substância à atividade contra *G. vaginalis*. O trabalho de Gehrke et al. (2013) demonstrou a atividade desta substância contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus piogenes*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella sonnei*.

O único trabalho encontrado na literatura que avalia a atividade de *G. barbadense* contra *Gardnerella* sp. foi desenvolvido por Essien, Aboaba e Ogunwande (2011). Este estudo demonstrou que o óleo essencial de folhas do algodoeiro apresentam atividade moderada contra *Gardnerella* sp., *Staphylococcus aureus*, e *Escherichia coli*. Embora o óleo essencial desta espécie seja rico em terpenoides, substâncias de menor polaridade, não se pode usá-lo como base para justificar a ação encontrada em EBM e FDM, uma vez que os terpenoides, com exceção d fitol, foram encontrados apenas em EBH, tendo como base os dados obtidos por CCD (Figura 8 E) e CG-EM (Tabelas 3 e 4) neste trabalho.

5.4.3. Bioautografia

No teste de bioautografia foi possível observar a perda de atividade de EBM quando fracionado (Figura 16 C), no qual não foram observados halos de inibição. Na Figura 16D, observamos a presença do halo de inibição quando o extrato não foi submetido ao processo cromatográfico, assim como observado no teste de difusão em ágar. Este resultado sugere uma ação sinérgica das substâncias presentes no extrato.

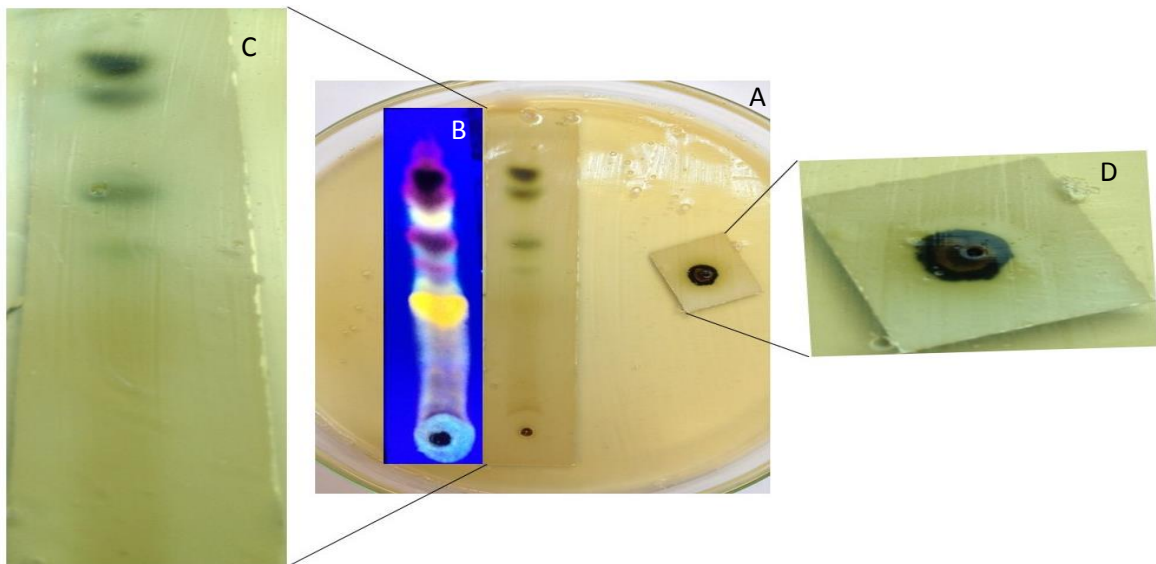


Figura 16 – Bioautografia do extrato bruto metanólico de folhas de *Gossypium barbadense* contra *Gardnerella vaginalis*. Sistema cromatográfico: acetato de etila : metanol : água (100:13,5:10). A – Placa de bioautografia, B – Revelação com NP/PEG e luz UV de 365 nm, C – Ampliação da bioautografia, D – Ampliação da placa controle.

Os benefícios da combinação de fármacos vêm sendo observados desde o último século. Foi observado que, geralmente, substâncias ativas que agem em apenas um alvo molecular são menos efetivas que a terapia multialvo utilizando-se fármacos combinados e, nos últimos anos, a medicina vem adotando cada vez mais esta postura (CSERMELY, AGOSTON, PONGOR, 2005).

É sabido que as plantas contêm uma grande diversidade de substâncias especializadas, os metabólitos especiais, e que essa diversidade pressupõe uma grande probabilidade de interações, podendo gerar atividade sinérgica entre suas substâncias (BIAVATTI, 2009).

As indicações terapêuticas de extratos de plantas são, na maioria dos casos, empíricas, e praticantes da fitoterapia acreditam que o extrato total tem ação melhor que a dose equivalente da substância isolada (NELSON; KURSAR, 1999). Através dos estudos de sinergismo é possível demonstrar a validade desta afirmação. Alguns trabalhos têm demonstrado a presença de interação e amplificação do efeito em diferentes extratos de plantas, assim como entre substâncias do mesmo extrato. Exemplos clássicos são os valepotriatos presentes em *Valeriana officinalis* e os gincólídeos, presentes em *Ginkgo biloba* (BIAVATTI, 2009).

A descoberta dos antibióticos foi um grande passo para a saúde pública no que tange as doenças infecciosas, porém seu uso indiscriminado levou ao desenvolvimento e seleção de patógenos multirresistentes (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008). Segundo Obiang-Obounou e Jang (2011), a avaliação do sinergismo tornou-se muito importante nos esforços para superar a resistência de diferentes patógenos aos antibióticos atuais.

O exemplo mais conhecido desta combinação é o da penicilina com o ácido clavulânico, um inibidor de β -lactamase. De forma similar, o galato de epigalocatequina parece ser um produto natural adequado para a manutenção da atividade da penicilina. Alguns outros produtos naturais como atelimagrandina I, a rugosina B, a corilagina e os flavonoides catequina e baicalina são capazes de bloquear o sistema de bomba de efluxo desenvolvido por várias bactérias como forma de resistência aos antibióticos (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Como foi demonstrado, *G vaginalis* tem apresentado cada vez mais resistência ao metronidazol. Sendo assim, novas opções terapêuticas se fazem necessárias. Neste contexto, o extrato bruto metanólico e sua fração diclorometânica de folhas de *G. barbadense* mostraram-se eficientes na inibição do crescimento das cepas de *G. vaginalis* no protocolo experimental utilizado, porém quando EBM foi submetido ao processo cromatográfico, separando assim suas substâncias, a atividade antibacteriana não foi mais observada.

Estes resultados apontam para uma possível atividade sinérgica entre as substâncias presentes nos extratos, corroborando com os resultados encontrados no teste de difusão em ágar. Como demonstrado por Hemaishwarya, Kruthiventi e Doble (2008), alguns flavonoides tem a capacidade de proteger as demais substâncias

ativas contra a oxidação ou contra a degradação, o que justificaria a maior atividade antibacteriana de FDM, que é uma fração de transição entre FH e FAE, ou seja, apresenta um pouco dos constituintes de cada uma destas frações (Figuras 6, 8 e 12. Este tipo de interação também foi encontrado por Oliveira, F.Q., et al. (2004) ao estudarem a atividade de *Bidens pilosa* contra malária. Estes autores verificaram que a atividade estava presente apenas na presença concomitante de poliacetileno e de flavonoides.

Ramadan e Asker (2009), evidenciaram que uma formulação de lecitina, já conhecida por sua atividade antimicrobiana, ao ser enriquecida com quercetina, apresentou grande aumento em sua atividade. Os autores sugerem que isso ocorra devido ao sinergismo entre os fosfolípídeos, provenientes do metabolismo primário, e a quercetina, proveniente do metabolismo secundário (especial), e sua atividade antioxidante, atuando como protetora das substâncias ativas. Este trabalho corrobora a proposta do presente estudo. Além disso, Gatto et al. (2002), demonstraram que este flavonol possui atividade anti-lipase, podendo ser utilizado como adjuvante para aumentar a eficiência do tratamento de infecções causadas por microrganismos produtores desta enzima.

5.5. Citotoxicidade contra *Artemia salina*

Neste modelo experimental, não foi observada morte dos náuplios em nenhuma das concentrações testadas tanto para EBM quanto para FDM, com isso tem-se CL_{50} maior que 5,0 mg/mL. Estes dados são corroborados pelo trabalho de Al-Fatimi et al. (2007) que demonstrou CL_{50} maior que 1,0 mg/mL contra uma linhagem de células humanas epiteliais e de Ajaiyeoba et al. (2006) que encontraram $CL_{50} = 3,86$ mg/mL contra náuplios de *A. salina*.

O resultado encontrado reforça a ausência do gossipol nos extratos analisados, uma vez que esta substância é conhecida também por sua citotoxicidade (Coyle et al., 1994). Esta hipótese é corroborada ainda pelo trabalho de Ajaiyeoba et al. (2006) que além de demonstrar a baixa citotoxicidade do extrato

hidrometanólico de *G. barbadense*, encontrou CL_{50} de 94,1 e 257,2 $\mu\text{g/mL}$ para *G. arboreum* e *G. hirsutum* respectivamente e atribuiu este efeito ao gossipol.

Neste trabalho, ter encontrado no teste de citotoxicidade o CL_{50} pelo menos cinco vezes maior que a $CIM_{90\%}$ do EBM e pelo menos dez vezes maior que a $CIM_{90\%}$ de FDM é relevante, uma vez que não foram realizados testes *in vivo* de toxicidade dos extratos. Segundo Benbow et al. (2010), uma simples avaliação de citotoxicidade pode ser adicionada às demais informações de grande importância no estudo de fármacos, como potência farmacológica, seletividade e ADME (administração, distribuição, metabolização e excreção). Estes autores demonstraram que resultados gerais de segurança estão correlacionados de tal forma que, quanto maior a concentração necessária para determinada substância causar um efeito citotóxico, maior é a probabilidade de se encontrar, em um estudo de curto prazo *in vivo*, uma dosagem segura.

5.6. Teste de viabilidade celular (MTT)

Para este trabalho, tão importante quanto a toxicidade seletiva contra células tumorais seria um possível aumento da viabilidade celular e/ou da proliferação celular observado sobre a linhagem normal (3T3). Swidsinski et al. (2005), demonstraram a capacidade de *G. vaginalis* de formar um biofilme que adere ao epitélio vaginal das mulheres com VB. Os trabalhos de Patterson et al. (2010) e Gelber et al. (2008) demonstraram que a toxina vaginolisina produzida por *G. vaginalis*, após a aderência às células do epitélio vaginal e formação de biofilme, lisam as células do epitélio vaginal, apresentando assim alto grau de citotoxicidade. Devido a este fato fármacos que apresentam atividade protetora celular podem ajudar no tratamento da VB, evitando a lise das células epiteliais vaginais.

Neste contexto, foi realizado o teste de viabilidade celular com MTT com uma linhagem de células normais e uma linhagem de células cancerosas, a fim de verificar a atividade protetora celular e a especificidade desta atividade.

Contra adenocarcinoma mamário humano (MCF7), EBH₂O e FDM apresentaram redução significativa em relação ao controle (Figura 17), obtendo-se

respectivamente 82,9% e 87,53 de viabilidade. Os demais extratos apresentaram viabilidade de 102,0% (EBH); 91,2% (FH); 140,3% (FAE); 92,1% (RA) e 91,8% (EBM).

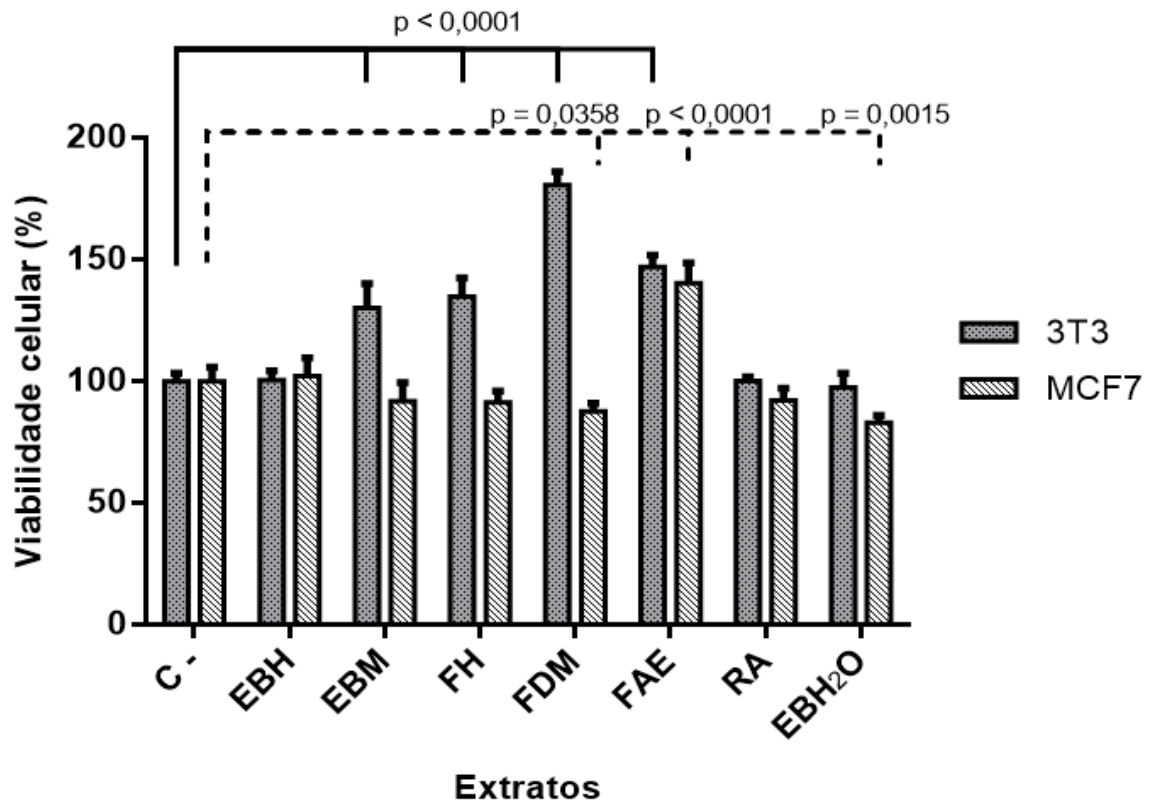


Figura 17 – Viabilidade celular de adenocarcinoma mamário humano (MCF7) e fibroblasto murino (3T3), quando desafiado por extratos de *Gossypium barbadense* L..

Lee et al. (2013) demonstraram que a quercetina, presente em EBH₂O e FDM, possui atividade citotóxica contra seis das sete linhagens cancerosas testadas por eles. Esta substância pode ser uma chave para a ação encontrada em EBH₂O, mas aparentemente não é a principal responsável, uma vez que outros extratos como FAE, RA e EBM também apresentam este flavonol.

Gossipol é um terpenoide muito estudado no gênero *Gossypium*, que apresenta relevantes atividades biológicas. O estudo realizado por Leblanc et al. (2002) mostra que o gossipol tem efeito antiproliferativo sobre linhagens de células de carcinoma humano. No presente trabalho, esta substância não foi detectada pelos métodos de análise química empregados, e seria mais provável sua presença

nos extratos de polaridade intermediária dentre os solventes orgânicos comumente utilizados (BELL et al., 1975; DECHARY; PRADEL, 1971; STIPANOVIC et al., 2009).

O teste contra fibroblasto murino (3T3) indicou para um aumento da viabilidade celular (Figura 17). EBM, FH, FDM e FAE apresentaram incremento significativo da viabilidade celular em relação ao controle (Figura 17), obtendo-se respectivamente 130,4%, 134,8%, 180,7% e 147,0% de viabilidade celular. Os demais extratos não interferiram significativamente na viabilidade celular, apresentando os seguintes valores: 100,4% (EBH); 100,1% (RA) e 97,4% (EBH₂O).

Estes resultados indicam para uma citotoxicidade específica de EBH₂O e FDM contra células tumorais e para o efeito seletivo de FH, FDM e EBM no aumento da viabilidade de células normais. Choi et al. (1998) demonstraram que frações do extrato metanólico de bolas de algodão imaturo de *G. indicum* possuem atividade antiproliferativa seletiva contra células tumorais. Estes autores sugerem também que a atividade é incrementada por efeito sinérgico, uma vez que os flavonoides isoladamente apresentaram atividade mais baixa que as frações, corroborando com a proposta elaborada neste estudo. Além disso, Marcolin et al. (2013), demonstraram efeito hepatoprotetor da quercetina em ratos.

O experimento com MTT foi primeiramente proposto por Mosmann (1983) para avaliação da sobrevivência e proliferação de células de mamíferos, uma vez que a coloração, obtida através da formação de cristais de formazan só é possível através das mitocôndrias de células vivas e viáveis. Quando o aumento da proliferação celular de linhagens normais está presente, pode-se associá-lo à reparação tecidual (ADETUTU; MORGAN; CORCORAN, 2011), o que também é um fenômeno importante no reestabelecimento do equilíbrio da mucosa vaginal (PATTERSON et al., 2010).

Quanto ao resultado encontrado em FAE, que apresentou aumento na viabilidade celular de MCF7 e 3T3, pode-se sugerir tratar-se da redução do MTT a formazan pelos flavonoides, que estão em maior concentração relativa nesta fração do que nas demais. Esta interferência já foi descrita por alguns autores como Wang, Henning e Heber (2010), Di e Kerns (2006) e Bruggisser et al. (2002). Os demais extratos que apresentam flavonoides, porém em menor concentração relativa, aparentemente não sofreram interferência na redução do MTT ou, pelo menos, se

presente, não influenciou na diferença da resposta entre as diferentes linhagens de células.

5.7. Atividade anti-inflamatória *in vitro*

Ao se avaliar a produção de citocinas (IL-17, IFN- γ e TNF- α) e NO frente a EBH₂O, EBM e EBH em relação ao controle negativo estimulado, pode-se perceber que o único extrato que apresentou redução significativa de todos os quatro parâmetros analisados foi EBH na maior concentração testada. Este mesmo extrato reduziu significativamente a produção de NO e TNF- α na concentração de 50 μ g/mL e se apresentou, de maneira geral, como mais promissor para futuros testes *in vivo*. EBH₂O reduziu significativamente a produção de IL-17, IFN- γ e TNF- α na concentração de 100 μ g/mL e apenas a IL-17 com 50 μ g/mL. EBM, na concentração de 100 μ g/mL reduziu significativamente a produção de IL-17 e TNF- α e apenas IFN- γ na com 50 μ g/mL. Estes dados podem ser vistos na Figura 18.

Embora não tenha apresentado diferenças significativas entre os grupos desafiados com os extratos, observa-se uma tendência de comportamento dose dependente das atividades apresentadas na Figura 18, excetuando-se EBH₂O e EBM no teste de NO.

Na comparação com o controle negativo basal pode-se perceber que só houve aumento significativo nas menores concentrações testadas, ou seja, 25 μ g/mL. No tratamento com EBH₂O, IL-17 e NO estavam aumentados e, no tratamento com EBM, apenas a IL-17 estava aumentada.

Embora EBM e EBH₂O não tenham apresentado atividade contra NO, Lee et al. (2013) demonstraram esta atividade para a quercetina.

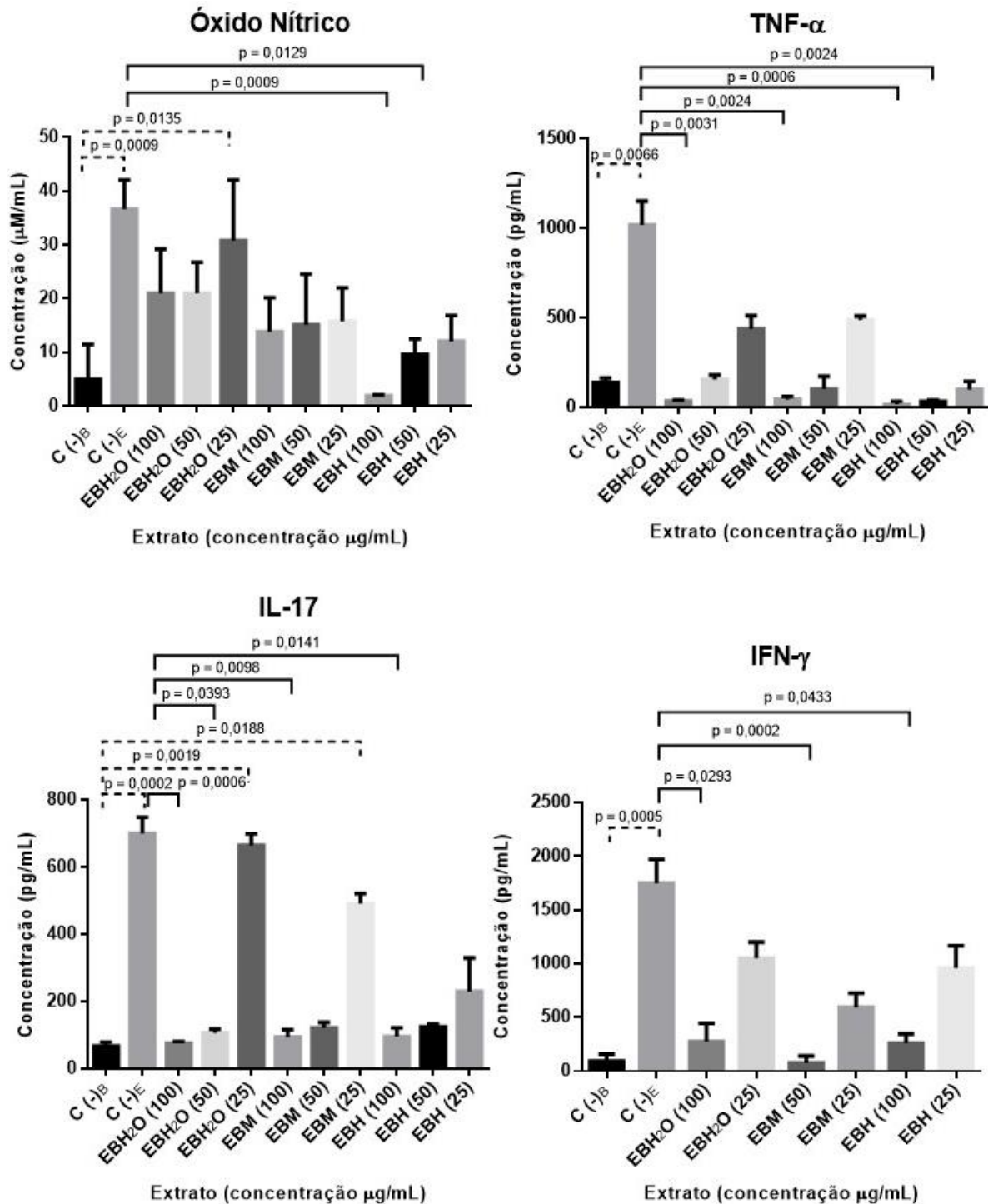


Figura 18 - Variação da produção de citocinas (IL-17, IFN- γ e TNF- α) e de Óxido Nítrico (NO) por esplenócitos estimulados com concanavalina A na presença de extratos brutos de *Gossypium barbadense* L. C (-)_B – Controle negativo basal, C (-)_E – Controle negativo estimulado.

Como pode ser observado na Tabela 3, os constituintes em maior proporção detectados em CG-EM de EBH são o palmitato de etila e o linolenato de etila. Apesar do linolenato de etila, do qual não são encontrados trabalhos na literatura

descrevendo sobre algum possível efeito anti-inflamatório, são encontrados alguns trabalhos que descrevem esta propriedade do palmitato de etila.

Um exemplo é o trabalho realizado por Saed et al. (2012). Este trabalho descreve a ação do palmitato de etila e do palmitato de metila, um dos constituintes minoritários do EBH, como anti-inflamatório utilizando-se diversos modelos sistêmicos animais. Os autores demonstraram a diminuição do edema de pata, da concentração de prostaglandina 2 nos exsudatos, da expressão de TNF- α , IL-6 e NF- κ B no plasma e do edema de orelha. Estes autores evidenciaram também a atividade nos parâmetros histopatológicos do processo inflamatório. A equipe ainda conclui que o palmitato de etila tem grande potencial como anti-inflamatório. O estudo realizado por Radziah, Najwa e Nurfadilah (2011) demonstrou que o óleo de *Adenantha pavonina* L. (Fabaceae) é rico em linolenato de metila, palmitato de etila e estearato de butila e o estudo realizado por Maruthappan e Shree (2010) demonstrou que o mesmo óleo tem atividade anti-inflamatória. Estes trabalhos corroboram com a atividade encontrada neste estudo.

A atividade contra IL-17, IFN- γ e TNF- α observada em EBM e EBH₂O provavelmente é devida à presença dos flavonoides, que podem ser observados nas Figuras 9 e 10. Vários estudos descrevem a atividade anti-inflamatória destas substâncias. O trabalho de Kim, Namgoong e Kim (1993) demonstrou a redução do edema de orelha para tratamentos com agliconas de flavan-3-óis, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonas. Pelzer et al. (1998) testaram 30 flavonoides (sete flavanonas, 13 flavonas e 10 flavonóis) e concluiu que todos apresentavam atividade anti-inflamatória, variando de acordo com sua estrutura e o método de uso.

Dentre os flavonoides encontrados nos extratos, destaca-se a quercetina em EBM e EBH₂O. Liu e Lin (2013), ao analisarem a produção de IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-10 e TNF- α , demonstraram que o suco do fruto de *Morus alba* L. (Moraceae), rico em quercetina, apresenta potente atividade imunomodulatória sobre macrófagos peritoneais e sobre esplenócitos. Guo et al. (2013), demonstraram que a quercetina e a quercetina-3-O-glicuronídeo apresentam atividade inibitória sobre inflamação causada por espécies reativas de oxigênio por bloquearem a ativação de IKK β /NF- κ B. Estudo realizado por García-Mediavilla et al. (2007) evidenciou que a quercetina apresenta atividade moduladora contra iNOS, ciclooxigenase-2 e proteína-C reativa aparentemente através do bloqueio da via do NF- κ B.

Há escassez de trabalhos na literatura associando o gênero *Gossypium* com a atividade anti-inflamatória. O trabalho de Ji et al. (2012) demonstra que o extrato de *G. herbaceum* é capaz de regular os níveis de IL-1RA/IL-1 β em ratos, sendo considerado pelo autor como um potencial agente para prevenir a progressão de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer. Porém, vasta literatura, como os trabalhos de Mika e Guruvayoorappan (2013), Romero-Cerecero et al. (2013), Chiclana, Enrique e Consolini (2009), Afolayan et al. (2010), Ali et al. (2011), entre outros, indicam extratos de plantas da família Malvaceae como anti-inflamatórios. Alguns destes trabalhos, como o de Afolayan et al. (2010) e o de Das, Datta e Nandy (2012) atribuem esta atividade aos flavonoides presentes nos extratos, corroborando com os resultados aqui encontrados.

Goldenberg et al. (2008) descreve que o processo inflamatório está envolvido em uma ou mais vias no PPM e alguns autores, como Leitich et al. (2003), associam o PPM à VB. Além disto, Silver et al. (1989) descrevem que pacientes com VB apresentam aproximadamente três vezes mais chance de desenvolver corioamnionite histológica. Alguns autores demonstraram a associação entre PPM espontâneo com esta doença e com o alto nível de citocinas no soro, no líquido amniótico e no muco vaginal em mulheres (PUCHNER et al., 2011; SIMHAN et al., 2011; GARGANO et al., 2008). Kemp et al. (2010) reforçam esta ideia descrevendo que a expressão de citocinas como, por exemplo, IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , está associada ao PPM através do regulação positiva de prostaglandinas, metaloproteinases de matriz e outros fatores cérvico-uterinos.

Assim sendo, a resposta anti-inflamatória encontrada para os extratos brutos de *G. barbadense* sugere um potencial para novos estudos *in vivo* relacionados com a prevenção do PPM, uma vez que estes extratos apresentaram atividade *in vitro* contra duas etiologias importantes, a bactéria *G. vaginalis* e a inflamação. Com este panorama em mente, vale destacar que a terapia multialvo é mais efetiva e menos vulnerável à resistência adaptativa, pois os sistemas biológicos apresentam maior dificuldade em compensar a ação de duas ou mais substâncias ao mesmo tempo (KEITH; ZIMMERMANN, 2004).

Sabe-se também que, embora a VB não seja um fator predisponente para a doença inflamatória pélvica (NESS et al., 2004), sua presença está muitas vezes associada a esta doença, mesmo quando assintomática (HAINER; GIBSON, 2011) e

também com o risco aproximadamente quatro vezes maior de a paciente apresentar endometrite pós-parto (WATTS et al., 1990). Mais uma vez os extratos testados aparecem como uma possibilidade para futuros estudos *in vivo*, visando demonstrar o potencial para terapia multialvo, uma vez que apresentou atividade *in vitro* contra o principal causador da VB e contra a inflamação, que está presente na doença inflamatória pélvica ou prevenindo a endometrite pós-parto.

A cada dia está mais evidente que diversas doenças possuem etiologia multicausal e uma complexa patofisiologia, que podem ser tratadas mais efetivamente com o sinergismo de fármacos do que com um fármaco que vise apenas um alvo (WAGNER, H., 2011). Isto pode ser observado nos tratamentos bem estabelecidos atuais contra AIDS, câncer, malária, hipertensão e infecções. Outra quebra de paradigma é a adoção da multiterapia que foca principalmente nos mecanismos de defesa e reparo do organismo em detrimento do combate apenas à doença (CSERMELY; AGOSTON; PONGOR, 2005). A própria PNPIC, entende a Fitoterapia como prática integrativa e complementar, buscando interagir mais de uma forma de tratamento das doenças (BRASIL, 2006).

Este trabalho associa-se a outros como os de Oliveira, A.P., et al. (2012), de Trinh et al. (2011) e de Leite et al. (2011) na busca de recursos naturais para o tratamento da vaginose bacteriana, mostrando a necessidade atual de novas opções terapêuticas para o tratamento desta doença. Cita-se em especial o trabalho de Vuuren e Naidoo (2010) no qual foi realizada uma triagem com 24 plantas que, assim como *G. barbadense*, são provenientes de pesquisa etnofarmacológica prévia.

Feitas estas considerações, os extratos de *G. barbadense*, principalmente EBM e FDM, apresentaram resultados *in vitro* relevantes que sugerem coerência com o hábito popular como tratamento da vaginose bacteriana, quadro muito complexo que envolve a proliferação de anaeróbios, principalmente *Gardnerella vaginalis*, destruição de células da mucosa vaginal e pode estar associada, como causa ou consequência, às doenças inflamatórias.

6. CONCLUSÃO

O flavonoide isolado de FAE, presente em EBM e suas frações é uma quercetina com substituição na hidroxila da posição 3.

G. barbadense apresentou-se rica em terpenoides e ésteres de ácidos graxos, sendo os majoritários de EBH o palmitato de etila e o linolenato de etila e os de FH o fitol, o palmitato de metila e o linolenato de metila.

Os extratos e frações não foram citotóxicos na metodologia *in vitro* empregada.

Dentre os extratos brutos, EBH apresentou a maior atividade anti-inflamatória *in vitro* para a produção de NO e citocinas (IL-17, IFN- γ e TNF- α).

EBM e FDM apresentaram atividade contra *G. vaginalis*, tendo o segundo se apresentado mais eficiente que o fármaco de escolha (metronidazol) na metodologia *in vitro* empregada.

As atividades biológicas encontradas para EBM e FDM, obtidos de folhas de *Gossypium barbadense* L. contribuem para a confirmação da indicação popular para o tratamento da vaginose bacteriana. Novos estudos *in vivo* se fazem necessários para a confirmação destas atividades quando em sistemas biológicos complexos.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 576 p.
- ABOU-DONIA, M. B. Physiological effects and metabolism of gossypol. **Residue Reviews**, v. 61, p. 125-160, 1976.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; RIVINO, L.; GEGINAT, J.; JARROSAY, D.; GATTORNO, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; NAPOLITANI, G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17 producing T helper memory cells. **Nature Immunology**, v. 8, p. 639-646, 2007.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. **Biological Journal of the Linnean Society**, n. 82, p. 573-581, 2004.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, Illinois: Allured Publishing Corporation, 469 p, 1995.
- ADETUTU, A.; MORGAN, W. A.; CORCORAN, O. Ethnopharmacological survey and *in vitro* evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 50-56, 2011.
- AFOLAYAN, A. J.; ABOYADE, O. M.; ADEAPO, A. A.; SOFIDIYA, M. O. Anti-inflammatory and analgesic activity of the methanol extract of *Malva parviflora* Linn (Malvaceae) in rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1225-1229, 2010.
- AFONSO-NETO, I. S. 2003. **Atividade moluscicida e repelente de três espécies de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* d'Orbygni (Gastropoda: Subulinidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, 54 p.
- AJAIYEGBA, E. O.; ABIODUN, O. O.; FALADE, M. O.; OGBOLE, N. O.; ASHIDI, J. S.; HAPPI, C. T.; AKINBOYE, D. O. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 295-298, 2006.
- AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; SCHRÖDER, G.; LINDEQUIST, U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 657-666, 2007.
- ALI, M. K.; ASHRAF, A.; BISWAS, N. N.; KARMAKAR, U. K.; AFROZ, S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiarrheal activities of ethanolic calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae) in mice. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 6, p. 626-631, 2011.
- ALVIM, E. V.; MACEDO, A. L.; NAZARETH, J. B.; NASCIMENTO, J. M.; MIRANDA, M. A. C. N.; SOUZA, R. O. A.; MOREIRA JUNIOR, W. O.; PIMENTA, D. S. Implantação de fitoterapia no PSF de Tabuleiro, MG. In: X International Congress of

Ethnopharmacology, 2008, São Paulo/SP. X International Congress of Ethnopharmacology. Abstracts. São Paulo/SP, v. 04, p. 25, 2008.

AMAYA, R. A.; AL-DOSSARY, F.; DEMMLER, G. J. *Gardnerella vaginalis* Bacteremia in a Premature Neonate. **Journal of Perinatology**, v. 22, p. 585-587, 2002.

AMSEL, R.; TOTTEN, P. A.; SPEIGEL, C. A.; CHEN, K. C.; ESCHENBACH, D.; HOLMES, K. K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **The American Journal of Medicine**, v. 74, p. 14-22, 1983.

ANNAN, K.; HOUGHTON, P. J. Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of aqueous extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L., wound-healing plants of Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 141-144, 2008.

AROUTCHEVA, A. A.; SIMOES, J. A.; BEHBAKHT, K.; FARO, S. *Gardnerella vaginalis* Isolated from Patients with Bacterial Vaginosis and from Patients with Healthy Vaginal Ecosystems. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p.1022-1027, 2001.

BADRIA, F. A.; HOUSSEIN, W. E.; ZAGHLOUL, M. G.; HALIM, A. F. Antimicrobial activity of gossypol and gossypolone. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 2, p. 120-126, 2001.

BAKSU, B.; BAKSU, A.; ÇINAR, S.; AĞAR, E.; DAVAS, I.; AKVARDAR, T. Microbiological evaluation of vaginal discharge. **Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi**, v. 19, p. 50-52, 2005.

BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C.; AMARAL, J. A. B.; SILVA, M. T. **Zonas de exclusão de algodoeiros transgênicos para preservação de espécies de *Gossypium* nativas ou naturalizadas**. Campina Grande, PB: Embrapa - CNPA, 2005. 7p.

BATES, S. Vaginal discharge. **Current Obstetrics and Gynaecology**, v. 13, p. 218-223, 2003.

BECHER, B.; SEGAL, B. M. TH17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, p. 707-712, 2011.

BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D.; HOWELL, C. R.; FRYXELL, P. A. Antimicrobial terpenoids of *Gossypium*: hemigossypol, 6-methoxyhemigossypol and 6-deoxyhemigossypol. **Phytochemistry**, v. 14, p. 225-231, 1975.

BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D.; 1977. In: Proceedings, Beltwide Cotton Production Research Conferences. National Cotton Council of America, Memphis, TN, USA, p. 244-258.

BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D.; O'BRIEN, D. H.; FRYXELL, P. A. Sesquiterpenoid aldehyde quinones and derivatives in pigment glands of *Gossypium*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1297-1305, 1978.

BENBOW, J. W.; AUBRECHT, J.; BANKER, M. J.; NETTLETON, D.; ALEO, M. D. Predicting safety toleration of pharmaceutical chemicals leads: Citotoxicity correlations to exploratory toxicity studies. **Toxicology Letters**, v. 197, n. 3, p. 175-182, 2010.

BENEDICT, C. R.; LIU, J.; STIPANOVIC, R. D. The peroxidative coupling of hemigossypol to (+)- and (-)-gossypol in cottonseed extracts. **Phytochemistry**, v. 67, p. 356-361, 2006.

BIAVATTI, M. W. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 371-378, 2009.

BIESKI, I. G. C.; SANTOS, F. R.; OLIVEIRA, R. M.; ESPINOSA, M. M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U. P.; MARTINS, D. T. O. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1- 36, Article ID 272749, 2012.

BOHBOT, J. -M. Les secretions vaginales. **Pelvi-Périnéologie**, v. 3, p. 19-24, 2008.

BOURDYA, C.; WALTERB, A. Maternity and medicinal plants in Vanuatu I. The cycle of reproduction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 179-196, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. **Lex**: Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, seção 1, n. 84, 04 de maio de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Resolução - RDC nº 10, de 9 de março de 2010. **Lex**: Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, seção 1, n. 46, 10 de março de 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. **Lex**: Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, seção 1, n. 75, 22 de abril de 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde: Programa Nacional de DST e Aids. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.

BRADSHAW, C. S.; TABRIZI, S. N.; FAIRLEY, C. K.; MORTON, A. N.; RUDLAND, E.; GARLAND, S. M. The Association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with Bacterial Vaginosis and Recurrence after Oral Metronidazole Therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. 828-836, 2006.

BRADSHAW, C. S.; PIROTTA, M.; GUINGAND, D.; HOCKING, J. S.; MORTON, A. N.; GARLAND, S. M.; FEHLER, G.; MORROW, A.; WALKER, S.; VODSTRCIL, L. A.; FAIRLEY, C. K. Efficacy of oral metronidazole with vaginal clindamycin or vaginal probiotic for bacterial vaginosis: Randomised placebo-controlled double-blind trial. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, e34540, 2012.

BRANDT, M.; ABELS, C.; MAY, T.; LOHMANN, K.; SCHMIDTS-WINKLER, I.; HOYME, U. B. Intravaginally applied metronidazole is as effective as orally applied in the treatment of bacterial vaginosis, but exhibits significantly led side effects. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 141, p. 158-162, 2008.

BRUBAKER, C. L.; BOURLAND, F. M.; WENDEL, J. F. The origin and domestication of cotton. In: SMITH, C. W.; COTHEN, J. T. Cotton: Origin, History, Technology and Production. **New York**, p. 23-32, 1999.

BRUGGISSER, R.; DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Influence of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.

BUCHS, B.; FIEBER, W.; DRAHONOVSKY, D.; LEHN, J. M.; HERRMANN, A. Stabilized Hemiacetal Complexes as Precursors for the Controlled Release of Bioactive Volatile Alcohols. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 4, p. 689-701, 2012.

CALIL, Z. O.; SALES, T. A.; MACEDO, A. L.; SANTO, R. P. E.; ALVIM, E. V.; PIMENTA, D. S. Implantação de plantas medicinais na atenção primária à saúde (APS). In: 46º Congresso Brasileiro de Educação Médica, 2008, Salvador/BA. 46º Congresso Brasileiro de Educação Médica. Resumos. Salvador/BA, p. 30, 2008.

CARRIÓ, E.; VALLÈS, J. Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 1021-1040, 2012.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, p. 137-158, 1998.

CASARI, E.; FERRARIO, A.; MORENGHI, E.; MONTANELLI, A. *Gardnerella*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women. **New Microbiologica**, v. 33, p. 69-76, 2010.

CASTELLANO-FILHO, D. S.; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L. Bacterial vaginosis: clinical, epidemiologic and microbiological features. **HU Revista**, v. 36, n. 3, p. 223-230, 2010.

CAVALCANTE, E. G. F.; ARAÚJO, M. A. L.; GALVÃO, M. T. G.; MOURA, H. J.; GONDIM, A. P. S.; SILVA, R. M. Sexually transmitted infections associated syndromes assisted in the primary health care in Northwest, Brazil. **BMC Public Health**, v. 12, p. 595, 2012verh

CDC, Division of sexually Transmitted Disease: Morbidity and Mortality Weekly Report, v.51, p.1-77, 2002

CHATTOPADHYAY, B. The role of *Gardnerella vaginalis* in “non - specific” vaginitis. **Journal of Infection**, v. 9, p. 113-125, 1984.

CHICLANA, C. F.; ENRIQUE, A.; CONSOLINI, A. E. Topical antiinflammatory activity of *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) on carragenin-induced edema in rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 2, p. 275-278, 2009.

CHOI, J. J.; YOON, K. N.; LEE, S. K.; LEE, Y. H.; PARK, J. H.; KIM, W. Y.; KIRN, J. K.; KIM, W. K. Antitumor activity of the aqueous-alcoholic extracts from unripe cotton ball of *Gossypium indicum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, n. 3, p. 266-272, 1998.

CHUG, C. A.; MEHTA, S.; DUA, H. Phytochemical screening and evaluation of biological activities of some medicinal plants of Phagwara, Punjab (Conference Paper). **Asian Journal of Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 5903-5905, 2012.

CLSI. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard**. 8ª edição. Documento M11-A8 do CLSI. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COYLE, T.; LEVANTE, S.; SHETLER, M.; WINFIELD, J. *In vitro* and *in vivo* cytotoxicity against central nervous system tumor cell lines. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 19, p. 25-35, 1994.

CRISWELL, B. S.; LADWIG, C. L.; GARDNER, H. L.; DUKES, C. D. *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from culture. **Obstetrics and Gynecology**, v. 33, p. 195-199, 1969.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CSERMELY, P.; AGOSTON, V.; PONGOR, S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.26, p.178-182, 2005.

DAI, D.; HE, J.; SUN, R.; ZHANG, R.; AISA, H. A.; ABLIZ, Z. Nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry combined with an incompleated separation strategy for identifying the natural products in crude extract. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 221-228, 2009

DAN, M.; POCH, F.; LEVIN, D. High rate of vaginal infections caused by non-C. Albicans species among asymptomatic women. **Medical Mycology**, v. 40, p. 383-386, 2002.

DAS, S.; DATTA, R.; NANDY, S. Phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Abroma augusta* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical disease**, v. 2, n. 1, p. S114-S117, 2012.

DAYAN, L.; WINES, N. Management of common vaginal discharges (Review). **Medicine Today**, v. 2, n. 4, p. 79-86, 2001.

DE VOS, M. M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; MATTHIJS, N.; BAUTERS, T. Vulvovaginal candidiasis in a Flemish patient population. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 12, p. 1005-1011, 2005.

DECHARY, J. M.; PRADEL, P. The occurrence of (+) gossypol in *Gossypium* species. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 563-564, 1971.

DEVILLARD, E.; BURTON, J.P.; HAMMOND, J.A.; LAM, D.; REID, G. Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 117, n. 1, p. 76-81, 2004.

DI, L.; KERNS, E. H. Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 9/10, p. 446-451, 2006.

DILSHAD, S. M. R.; UR-REHMAN, N.; IQBAL Z.; MUHAMMAD, G.; IQBAL, A.; AHMED, N. An inventory of the ethnoveterinary practices for reproductive disorders in cattle and buffaloes, Sargodha district of Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 393-402, 2008.

DING A. H.; NATHAN, C. F.; STUETHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediate and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

DONATI, L.; DI VICO, A.; NUCCI, M.; QUAGLIOZZI, L.; SPAGNUOLO, T.; LABIANCA, A.; BRACAGLIA, M.; IANNIELLO, F.; CARUSO, A.; PARADISI, G. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 281, n. 4, p. 589-600, 2010.

DONDERS, G. G. G.; BELLEN, G.; ROZEBERGA, D. Aerobic vaginitis in pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 118, p. 1163-1170, 2011.

DOWD, M. K. Identification of the unsaturated heptadecyl fatty acids in the seed oils of *Thespesia populnea* and *Gossypium hirsutum*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 9, p. 1599-1609, 2012.

DOWD, M. K.; PELITIRE, S. M. Isolation of 6-methoxy gossypol and 6,6'-dimethoxy gossypol from *Gossypium barbadense* sea Island cotton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3265-3270, 2006.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EBRAHIM, M. K. H. Tolerance responses of two cotton cultivars exposed to ultraviolet-A: photosynthetic performance and some chemical constituents. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 52, n. 5, p. 645-652, 2005.

EDREVA, A.; DARGON, S.; GÜREL, A.; GESHEVA, E.; HAKERLERLER, H. Reddening of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves: Analysis of the polyphenol complex. **Agrochimica**, v. 50, n. 1-2, p. 54-61, 2006.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

ELZEN, G. W.; WILLIAMS, H. J.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D.; VINSON, S. B. Quantification of volatile terpenes of glanded and glandless *Gossypium hirsutum* L. cultivars and lines by gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 1079-1082, 1985.

ESSIEN, E. E.; ABOABA, S. O.; OGUNWANDE, I. A. Constituents and antimicrobial properties of the leaf essential oil of *Gossypium barbadense* (Linn.). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p.702-705, 2011.

FALEGAN, C. R.; DAVID, O. M. The effect of fermentation on nutritional composition of cottonseeds (*Gossypium hirsutum* Linn) for production of 'Owoh'. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 39-44, 2007.

FENG, H.; TIAN, X.; LIU, Y.; ZHANG, X.; JONES, B. J.; SUN, Y.; SUN, J. Analysis of flavonoids and the flavonoid structural genes in brown fiber of upland cotton. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, e58820, 2013.

FERRACIN, I.; OLIVEIRA, R. M. W. Corrimento vaginal: causa, diagnóstico e tratamento farmacológico. **Infarma**, v. 17, p. 82-86, 2005.

FERRAZZA, M. H. S. H.; MALUF, M. L. F.; CONSOLARO, M. E. L.; SHINOBU, C. S.; SVIDZINKI, T. I. E.; BATISTA, M. R. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FERRIS, D. G.; LITAKER, M. S.; WOODWARD, L.; MATHIS, D.; HENDRICH, J. Treatment of bacterial vaginosis: a comparison of oral metronidazole, metronidazole vaginal gel, and clindamycin vaginal cream. **Journal of Family Practice**, v. 41, p. 443-449, 1995.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

FLEURY, F. J. Adult vaginitis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 24, p. 407-438, 1981.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; THOMAS, K. K.; OAKLEY, B. B.; MARRAZZO, J. M. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3270-3276, 2007.

FRYXELL, P. A. Stages in the evolution of *Gossypium*. **Advancing Frontiers of Plant Sciences**, n. 10, p. 31-56, 1965.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S.; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells. **European Journal of pharmacology**, v. 557, p. 221-229, 2007.

GARDNER, H. L.; DUKES, C. D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified 'nonspecific' vaginitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 60, p. 962-976, 1955.

GARDNER JR, H. K.; HRON, R. H.; VIX, H. L. E. Removal of pigment glands (gossypol) from cottonseed. **Cereal Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 549-560, 1976.

GARGANO, J. W.; HOLZMAN, C.; SENAGORE, P.; THORSEN, P.; SKOGSTRAND, K.; HOUGAARD, D. M.; RAHBAR, M. H.; CHUNG, H. Mid-pregnancy circulating cytokine levels, histologic chorioamnionitis and spontaneous preterm birth. **Journal Reproductive Immunology**, v. 79, p. 100-110, 2008.

GATTO, M. T.; FALCOCCHIO, S.; GRIPPA, E.; MAZZANTI, G.; BATTIN, L.; NICOLOSI, G.; LAMBUSTA, D.; SASO, L. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetina and its C2-C16 3-O-acyl-esters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 269-272, 2002.

GEHRKE, I. T. S.; NETO, A. T.; PEDROSO, M.; MOSTARDEIRO, C. P.; CRUZ, IB. M.; SILVA, U. F.; ILHA, V.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. F. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

GELBER, S. E.; AGUILAR, J. L.; LEWIS, K. L.; RATNER, A. J. Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolyisin from *Gardnerella vaginalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 3896-3903, 2008.

GENG, P.; ZHANG, R.; AISA, H. A.; HEL, J.; QU, K.; ZHU, H.; ABLIZ, Z. Fast profiling of the integral metabolism of flavonols in the active fraction of *Gossypium herbaceum* L. using liquid chromatography/multi-stage tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1877-1888, 2007.

GIRALDO, P. C., AMARAL, R. L. G., GONÇALVES, A. K., VICENTINI, R., MARTINS, C. H., GIRALDO, H., FACHINI, A. M. Influence of frequency of vaginal intercourse and the use of douching on vaginal microbiota. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 5, p. 257-62, 2005.

GLASSON, J. H.; WOODS, W. H. Immunoglobulin proteases in bacteria associated with bacterial vaginosis. **Australian Journal of Medical Laboratory Science**, v. 9, p. 63-65, 1988.

GOLDENBERG, R. L.; CULHANE, J. F.; IAMS, J. D.; ROMERO, R. Epidemiology and causes of preterm birth. **Lancet**, v. 371, p. 75-84, 2008.

GÓMEZ-ESTRADA, H. A.; GONZÁLEZ RUIZ, K. N.; MEDINA, J. D. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 3, p. 182-217, 2011.

GRACE, P. A. Ischemia-reperfusion injury. **British Journal of Surgery**, v. 81, p. 637-647, 1994.

GRAHAM, S.; HOWES, C.; DUSMUIR, R.; SANDOE, J. Vertebral osteomyelitis and discitis due to *Gardnerella vaginalis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1382-1384, 2009.

GRIGSBY, P. L.; NOVY, M. J.; WALDORF, K. M.; SADOWSKY, D. W.; GRAVETT, M. G. Choriodecidual inflammation: a harbinger of the preterm labor syndrome. **Reproductive Sciences**, v. 17, p. 85-94, 2010.

GUO, X. D.; ZHANG, D. Y.; GAO, X. J.; PARRY, J.; LIU, K. LIU, B. L.; WANG, M. Quercetin and quercetin-3-O-glucuronide are equally effective in ameliorating endothelial insulin resistance through inhibition of reactive oxygen species-associated inflammation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 6, p. 1037-1045, 2013.

HAINER, B. L.; GIBSON, M. V. Vaginitis: Diagnosis and treatment. **American Family Physician**, v. 83, n. 7, 2011.

HAMAI, A.; MURET, J.; CAVALCANTI, A.; BONVALOT, S.; CHOUAIB, S. Le facteur de necrose tumorale: de la biologie à la thérapie oncologique. **Hématologie**, v. 15, n. 4, p. 291-304, 2009.

HANNY, B. W. Gossypol, flavonoid, and condensed tannin content of cream and yellow anthers of five cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 504-506, 1980.

HASRAT, J. A.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Medicinal plants in Suriname: hypotensive effect of *Gossypium barbadense*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 381-387, 2004.

HEBEDA, C. B. **Inibição in vivo das óxido nítrico sintases: efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão e secreção de mediadores inflamatórios**. 2008. 189 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

HEDIN, P. A.; JENKINS, J. N.; PARROTT, W. L. Evaluation of flavonoids in *Gossypium arboreum* (L.) cottons as potential source of resistance to tobacco budworm. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 2, p. 105-114, 1992.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

JASINSKI, V. C. G. Óleos essenciais e compostos fenólicos de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis uncinella* DC. 2010. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química – Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

JI, C.; SONG, C.; AISA, H. A.; YANG, N.; LIU, Y. Y.; LI, Q.; ZHU, H. B.; ZUO, P. P. *Gossypium herbaceum* L. Extracts ameliorate disequilibrium of IL-1RA/IL-1 β ratio to attenuate inflammatory process induced by amyloid β in rats. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 8, p. 953-961, 2012.

KALAYOU, S.; HAILESELASSIE, M.; GEBRE-EGZIABHER, G.; TIKU'E, T.; SAHLE, S.; TADDELE, H.; GHEZU, M. In-vitro antimicrobial activity screening of some ethnoveterinary medicinal plants traditionally used against mastitis, wound and gastrointestinal tract complication in Tigray Region, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 7, p. 512-522, 2012.

KAPATAIS-ZOUMBO, S. K.; CHANDLER, D. K. F.; BARILE, M. F. Survey of immunoglobulin A protease activity among selected species of *Ureaplasma* and *Mycoplasma* specificity for host immunoglobulin A. **Infection and Immunity**, v. 47, p. 704-709, 1985.

KARIMDZHANOV, A. K.; KUZNETSOVA, N. N.; DZHATAEV, S. A. Phenolic compounds of the plant *Gossypium hirsutum* and of callus tissue from its anthers. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 33, n. 2, p. 187-189, 1997.

KEITH, C. T.; ZIMMERMANN, G. R. Multi-target lead discovery for networked systems. **Current Drug Discovery**, p.19-23, 2004.

KEMP, M. W.; SAITO, M.; NEWNHAM, J. P.; NITSOS, I.; OKAMURA, K.; KALLAPUR, S. G. Preterm birth, infection, and inflammation advances from the study of animal models. **Reproductive Sciences**, v. 17, p. 619-628, 2010.

KHAN, S. A.; AMIR, F.; ALTAF, S.; TANVEER, R. Evaluation of common organisms causing vaginal discharge. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad**, v. 21, p. 90-93, 2009.

KHIDYROVA, N. K.; MAMATKULOVA, N. M.; SAIMURATOVA, O. K.; SHAKHIDOYATOV, K. M. Isoprenoids of *Gossypium* leaves and their effect on the functional activity of cotton-sprout nuclei. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 38, n. 5, p. 434-438, 2002.

KIM, H. K.; NAMGOONG, S. Y.; KIM, H. P. Antiinflammatory activity of flavonoids: Mouse ear edema inhibition. **Archives of Pharmacal Research**, v. 16, n. 1, p. 18-24, 1993.

KLOMP, J. M.; VERBRUGGEN, B. S. M.; KORPORAAL, H.; BOON, M. E.; JONG, P.; KRAMER, G. C. VAN HAAFTEN, M.; HEINTZ, A. P. *Gardnerella vaginalis* and

Lactobacillus sp in Liquid-Based Cervical Samples in Healthy and Disturbed Vaginal Flora Using Cultivation-Independent Methods. **Diagnostic Cytopathology**, v. 36, p. 277-284, 2008.

KNUPP, D. Aspectos diagnósticos, epidemiológicos, microbiológicos e moleculares de *Gardnerella vaginalis* em mulheres atendidas na rede pública e particular de Juiz de Fora, MG. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética, Biotecnologia, Imunologia e DIP) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, 2013.

KORN, T.; BETTELI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KUMAMOTO, J.; WAINES, J. G.; HOLLENBERG, J. L.; SCORA, R. W. Identification of the major monoterpenes in the leaf oil of *Gossypium sturtianum* var. *nandewarensis* (Der.) Fryx. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, p. 203-204, 1979.

LAGACÉ -WIENS, P. R.; NG, B.; REIMER, A.; BURDZ, T.; WIEBE, D.; BERNARD, K. *Gardnerella vaginalis* bacteremia in a previously healthy man: case report and characterization of the isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 804-806, 2008.

LANE, H. C.; SCHUSTER, M. F. Condensed tannins of cotton leaves. **Phytochemistry**, v. 20, p. 425-427, 1981.

LARSSON, P. G. Treatment of bacterial vaginosis. **International Journal of STD and AIDS**, v. 3, p. 239, 1992.

LEE, Y. J.; KIM, N. S.; KIM, H.; YI, J. M.; OH, S. M.; BANG, O. S.; LEE, J. Cytotoxic and anti-inflammatory constituents from the seeds of *Descurainia sophia*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 5, p. 536-541, 2013.

LEBLANC, M. L.; RUSSO, J.; KUDELKA, A. P. SMITH, J. A. An *in vitro* study of inhibitory activity of gossypol, a cottonseed extract, in human carcinoma cell lines. **Pharmacological Research**, v. 46, n. 6, 2002.

LEFEVRE, J. C.; BAURIAUD, R.; BLANC, C.; LARENG, M. B. *Gardnerella vaginalis*. Frequency of its isolation from women complaininf of leucorrhoea. **Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction (Paris)**, v. 12, n. 8, p. 837-841, 1983.

LEITE, S. R. R. F.; AMORIM, M. M. R.; SERENO, P. F. B.; LEITE, T. N. F.; FERREIRA, J. A. C.; XIMENES, R. A. A. Randomized clinical trial comparing the efficacy of the vaginal use of metronidazole with a Brazilian pepper tree (*Schinus*) extract for the treatment of bacterial vaginosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 245-252, 2011.

LEITICH, H.; BODNER-ADLER, B.; BRUNBAUER, M.; KAIDER, A.; EGARTER, C. HUSSLEIN, P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-

analysis. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 189, n. 1, p. 139-147, 2003.

LEITICH, H.; KISS, H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate Xora as risk factors for adverse pregnancy outcome. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 21, n. 3, p. 375-390, 2007.

LEPARGNEUR, J. P. ; ROUSSEAU, V. Le rôle protecteur de la flore de Doderlein. **Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v. 31, n. 5, p. 485-494, 2002.

LI, J.; ZHANG, H.; HUANG, W.; QIAN, H.; LI, Y. TNF- α inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products. **Current topics in Medicinal chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1408-1421, 2012.

LIU, C. J. ; LIN, J. Y. Anti-inflammatory effects of phenolic extracts from strawberry and mulberry fruits on cytokine secretion profiles using mouse primary splenocytes and peritoneal macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 165-170, 2013.

LIVENGOOD, C. H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. **Reviews in Obstetrics and Gynecology**, v. 2, n. 1, p. 28-37, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 2ª ed, 544p, 2008.

LOVETT-RACKE, A. E.; YANG, Y.; RACKE, M. K. TH1 versus TH17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, n. 2, p. 246-251, 2011.

MACEDO, A. L.; SILVA, P. R. G.; CALIL, Z. O.; PEREIRA, A. P. O.; FIRMIANO, R. V.; PIMENTA, D. S. Uso de plantas medicinais no município de São João Nepomuceno. In: VI Reunião da Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica, 2008, Belo Horizonte/MG. VI Reunião da Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica. Livro de Resumos. Belo Horizonte/MG, v. BO-16, p. 60, 2008.

MANS, D. R. A.; TOELSIE, J.R.; JAGERNATH, Z.; RAMJIWAN, K.; VAN BRUSSEL, A.; JHANJAN, N.; ORIE, S.; MURINGEN, M.; ELLIOT, U.; JURGENS, S.; MACNACK, R.; RIGTERS, F.; MOHAN, S.; CHIGHAROE, V.; ILLES, S.; BIPAT, R. Assessment of eight Surinamese plant-derived preparations for their spasmolytic potential using the isolated guinea pig ileum. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 422-429, 2004.

MARUTHAPPAN V. G.; SHREE K. S. Blood cholesterol lowering effect of *Adenantha pavonina* seed extract on atherogenic diet induced hyperlipidemia rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research**, v. 1, n. 7, p. 88-94, 2010.

MARCOLIN, E.; FORGIARINI, L. F.; RODRIGUES, G.; TIEPPO, J.; BORGHETTI, G. S.; BASSANI, V. L.; PICADA, J. N.; MARRONI, N. P. Quercetin decreases liver

damage in mice with non-alcoholic steatohepatitis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 6, p. 385-391, 2013.

MCCATHIE, R. Vaginal discharge: common causes and management. **Current Obstetrics & Gynecology**, v. 16, n. 4, p. 211-217, 2006.

MCCOOL, R. A.; DEDONATO, D. M. Bacteremia of *Gardnerella vaginalis* after endometrial ablation. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 286, n. 5, p. 1337-1338, 2012.

MCGREGOR, J. A.; FRENCH, J. I.; JONES, W.; PARKER, R.; PATTERSON, E.; DRAPER, D. Association of cervico-vaginal infections with increased vaginal fluid phospholipase A2 activity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, p. 1588-1594, 1992.

MCGREGOR, J. A.; FRENCH, J. I.; JONES, W.; MILLIGAN, K.; MCKINNEY, P. J.; PARRERSON, E.; PARKER, R. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: Results of a controlled trial of topical clindamycin cream. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 170, p. 1048-1060, 1994.

MELLO, J. R.B.; MELLO, F. B.; ETGES, R. N.; HOLLENBACH, C.; RODRIGES, J. M.; HIRTZ, L. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Gossypium herbaceum* (algodoeiro) em ratos Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 27, p. 46-55, 2008.

MENARD, J. P.; BRETELLE, F. How can the treatment of bacterial vaginosis be improved to reduce the risk of preterm delivery? **Women's Health**, v. 8, n.5, p. 491-493, 2012.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L.B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E., MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient generalbioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, n. 5,p. 31-34, 1982.

MIKA, D.; GURUVAYOORAPPAN, C. Experimental study on anti-tumor and anti-inflammatory effect of *Thespesia populnea* phytochemical extract in mice models. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, n. 1, p. 157-163, 2013.

MIRANDA, G. S.; SANTANA, G. S.; MACHADO, B. B.; COELHO, F. P.; CARVALHO, C. A. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 104-111, 2013.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde. Aprova a Política Estadual de Práticas Integrativas e Complementares (PEPIC). Resolução nº 1885, de 27 de Maio de 2009. **Lex: Diário Oficial do Estado de Minas Gerias**, 27 de maio de 2009.

MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Inflamação aguda e crônica**. In: Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p.29-54.

- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 3-35, 2004.
- MONCLA, B. J.; PRYKE, K. M. Oleate lipase activity in *Gardnerella vaginalis* and reconsideration of existing biotype schemes. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 78-82, 2009.
- MORRIS, M.; NICOLL, A.; SIMMS, I.; WILSON, J.; CATCHPOLE, M. Bacterial vaginosis: a public health review. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 108, p. 439-450, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSTER, D.; LIE, R. T.; MARKESTAD, T. Long-term medical and social consequences of preterm birth. **New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 262-273, 2008.
- NAGARAJA, P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 155-157, 2008.
- NARASIMHA, D. K.; REDDY, K. R.; JAYAVEERA, K. N.; BHARATHI, T.; SWAMY, V. B. M.; RAJKUMAR. Study on diuretic activity of *Gossypium herbaceum* Linn leaves extract in albino rats. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 78-81, 2008.
- NASCIMENTO, R. J. B. Estudo de espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae): quimiotaxonomia e ensaios biológicos. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica) – Universidade Federal da Paraíba, 2006.
- NELSON A. C.; KURSAR, T. A. Interactions among plant defense compounds: a method for analysis. **Chemoecology**, v.9, p.81-92, 1999.
- NELSON, D. B.; HANLON, A.; HASSAN, S.; BRITTO, J.; GEIFMAN-HOLTZMAN, O.; HAGGERTY, C.; FREDRICKS, D.N. Preterm labor and bacterial vaginosis-associated bacteria among urban women. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 37, n. 2, p. 130-134, 2009.
- NERI, P.; SALVOLINI, S.; GIOVANNINI, A.; MARIOTTI, C. Retinal vasculitis associated with asymptomatic *Gardnerella vaginalis* infection: a new clinical entity. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 17, p. 36-40, 2009.
- NESS, R. B.; HILLIER, S. L.; KIP, K. E.; SOPER, D. E.; STAMM, C. A.; MCGREGOR, J. A.; BASS, D. C.; SWEET, R. L.; RICE, P.; RICHTER, H. E. Bacterial vaginosis and risk of pelvic inflammatory disease. **Obstetrics and Gynecology**, v.104, n. 4, p. 761-769, 2004.
- NGUEGUIM, F. T.; KHAN, M. P.; DONFACK, J. H.; SIDDIQUI, J. A.; TEWARI, D.; NAGAR, G. K.; TIWARI, S. C.; THEOPHILE, D.; MAURYA, R.; CHATTOPADHYAY,

N. Evaluation of Cameroonian plants towards experimental bone regeneration. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 331- 337, 2012.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 637-652, 2008.

OAKLEY, B. B.; FIEDLER, T. L.; MARRAZZO, J. M.; FREDRICKS, D. N. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4898-4909, 2008.

OBIANG-OBOUNOU, B. W.; JANG, Y. P. Enriching Modern Pharmacotherapy through Synergy Assessment for the Combination of Natural Products and Synthetic Drugs. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 10, p. 1579-1581, 2011.

ODONNE, G.; BERGER, F.; STIEN, D.; GRENAND, P.; BOURDY, G. Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): A K.A.P. survey and analysis of the evolution of phytotherapy knowledge amongst Wayãpi Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1228-1239, 2011.

OLIVEIRA, A. P.; SILVA, M. B.; MACHADO, M. R.; OLIVEIRA, R. P.; OLIVEIRA, M. J.; SALGUEIRO, L. Therapeutic potential of plant extracts on genital infections. **Revista de Fitoterapia**, v. 12, n. 2, p. 135-144, 2012.

OLIVEIRA, F. Q.; ANDRADE-NETO, V. F.; KRETTLI, A. U.; BRANDÃO, M. G. L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetilene and flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 39-42, 2004.

OMS. Organización Mundial de La Salud. Situación regulamentaria de los medicamentos: una reseña mundial. Traducción Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, 1998. 62p.

PAKUDINA, Z. P.; SADYKOV, A. S. Hirsutrin - a new glycoside from the flowers of *Gossypium hirsutum*. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii**, v. 3, n. 2, p. 98-100, 1967.

PAKUDINA, Z. P.; SADYKOV, A. S.; DENLIEV, P. K. The flavonols of the flowers of *Gossypium hirsutum* L. (cotton variety 108-F). **Khimiya prirodnykh soedinenii**, v. 1, n. 1, p. 67-70, 1965.

PAKUDINA, Z. P.; SADYKOV, A. S. Isoastragalin - a flavonol glycoside from the flowers of *Gossypium hirsutum*. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii**, v. 6, n. 1, p. 27-29, 1970.

PARKS, C. R. Floral pigmentation studies in the genus *Gossypium*.I. species specific pigmentation patterns. **American Journal of Botany**, v. 52, n. 3, p. 309-316, 1965.

PATIL, K. S.; KUMAR, S.; BAHUGANA, Y. M.; SHINKAR, A. S.; HUGAR, D. S. Anti-ulcer activity of leaves of *Gossypium Arboreum* Linn in Aspirin induced rats and pylorus ligated rats. **Indian Drugs**, v. 45, n. 4, p. 327-331, 2008.

PATERSON, A. H.; WENDEL, J. F.; GUNDLACH, H.; GUO, H.; JENKINS, J.; JIN, D.; LIEWELLYN, D.; SHOWMAKER, K. C.; SHU, S.; UDALL, J.; YOO, M.; BYERS, R.; CHEN, W.; DORON-FAIGENBOIM, A.; DUKE, M. V.; GONG, L.; GRIMWOOD, J.; GROVER, C.; GRUPP, K.; HU, G.; LEE, T.; LI, J.; LIN, L.; LIU, T.; MARLER, B. S.; PAGE, J. T.; ROBERTS, A. W.; ROMANEL, E.; SANDERS, W. S. SZADKOWSKI, E.; TAN, X.; TANG, H.; XU, C.; WANG, J.; WANG, Z.; ZHANG, D.; ZHANG, L.; ASHRAFI, H.; BEDON, F.; BOWERS, J. E.; BRUBAKER, C. L.; CHEE, P. W.; DAS, S.; GINGLE, A. R.; HAIGLER, C. H.; HARKER, D.; HOFFMAN, L. V.; HOVAV, R.; JONES, D. C.; LEMKE, C.; MANSOOR, S.; RAHMAN, M.; RAINVILLE, L. N.; RAMBANI, A.; REDDY, U. K.; RONG, J.; SARANGA, Y.; SCHEFFLER, B. E.; SCHEFFLER, J. A.; STELLY, D. M.; TRIPPLET, B. A.; DEYNZE, A. V.; VASLIN, M. F. S.; WAGHMARE, V. N.; WALFORD, S. A.; WRIGHT, R. J.; ZAKI, E. A.; ZHANG, T.; DENNIS, E. S.; MAYER, K. F. X.; PETERSON, D. G.; ROKHSAR, D. S.; WANG, X.; SCHMUTZ, J. Repeated polyploidization of *Gossypium* genomes and the evolution of spinnable cotton fibres. **Nature**, v. 492, p. 423-427, 2012.

PATTERSON, J. L.; STULL-LANE, A.; GIRERD, P. H.; JEFFERSON, K. K. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial vaginosis-associated anaerobes. **Microbiology**, v. 156, p. 392-399, 2010.

PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PHEROBASE. Kovats Retention Index of Organic Compounds. <<http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>>, Acesso em: 22 maio 2013.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; SEVERINO, L.; LUONGO, D.; RASTRELLI, L. Unusual cytotoxic sulfated cadinene-type sesquiterpene glycosides from cottonseed (*Gossypium hirsutum*). **Tetrahedron**, v. 64, p. 5449-5453, 2008.

PIMENTA, D. S.; CALIL, Z. O.; SILVA, P. R. G.; MACEDO, A. L. Produção de plantas medicinais e fitoterapia - Inserção da UFJF na implantação da fitoterapia no SUS. In: 4º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2009, Dourados, MS. Anais do 4º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. Dourados, MS, v. 01, 2009.

PLATZ-CHRISTENSEN, J. J.; BRANDBERG, A.; WIQVIST, N. Increased prostaglandin concentrations in the cervical mucous of pregnant women with bacterial vaginosis. **Prostaglandin**, v. 43, p. 133-141, 1992.

PLATZ-CHRISTENSEN, J. J.; MATTSBY-BALTZER, I.; THOMSEN, P.; WIGVIST, N. Endotoxin and interleukin-1 in the cervical mucous and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, p. 1161-1166, 1993.

PRIESTLY, C. J., JONES, B. M., DHAR, J., GOODWIN, L. What is normal vagina flora? **Genitourinary Medicine**. v. 73, p. 23-28, 1997.

PUCHNER, K.; IAVAZZO, C.; GOURGIOTIS, D.; BOUTSIKOU, M.; BAKA, S.; HASSIAKOS, D.; KOUSKOUNI, E.; ECONOMOU, E.; MALAMITSI-PUCHNER, A.; CREATSAS, G. Mid-trimester amniotic fluid interleukins (IL-1beta, IL-10 and IL-18) as possible predictors of preterm delivery. **In Vivo**, v. 25, p. 141-148, 2011.

PUCKHABER, L. S.; DOWD, M. K.; STIPANOVIC, R. D.; HOWELL, C. R. Toxicity of (+)- and (-)-gossypol to the plant pathogen, *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7017-7021, 2002.

RADZIAH, W.; NAJWA, M. R. M.; NURFADILAH, M. I. Basic study on antibacterial properties os *Adenantha pavonina (saga)* seed oil. In: IEEE Symposium on Business, Engineering and Industrial Applications (ISBEIA), 2011, Langkawi. IEEE Symposium on Business, Engineering and Industrial Applications (ISBEIA). ISBEIA Annals. Langkawi, Malasya, p. 584-587, 2011.

RAMADAN, M. F.; ASKER, M. M. S. Antimicrobial and antiviral impact of novel quercetin-enriched lecithin. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 557-571, 2009.

REID, G.; BOCKING, A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, n. 4 , p. 1202-1208, 2003.

RIGON, L.; CORRÊA, S.; BELING, R. R.; REETZ, E. R.; VENCATO, A.; SANTOS, C. **Anuário brasileiro do Algodão** 2008. Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, 138p, 2008.

RIVERO, M.; CENTENO, S.; DÍAZ, J. Frecuencia de especies de candida aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 23, n. 2, p. 148-52, 2003.

ROMERO-CERECERO, O.; MECKES-FISCHER, M.; ZAMILPA, A.; JIMÉNEZ-FERRER, J. E.; NICASIO-TORRES, P.; PÉREZ-GARCÍA, D.; TORTORIELLO, J. Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 467-473, 2013.

RODA, J. M.; PARIHAR, R.; LEHMAN, A.; MANI, A.; TRIDANDAPANI, S.; CARSON, W. E. Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 1, p. 120-129, 2006.

SAED, N. M.; EL-DEMERDESH, E.; ABDEL-RAHMAN, H. M.; ALGANDABY, M. M.; AL-ABBASI, F. A.; ABDEL-NAIM, A. B. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, p. 84-93, 2012.

SANTO, R. P. E.; SALES, T. A.; MIRANDA, M. A.; CERQUEIRA, R. L.; GUARNIERI, F.; FERNANDES, A.; CALIL, Z. O.; PIMENTA, D. S. Implantação de fitoterapia no PSF de Bicas, MG. In: X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo/SP. X International Congress of Ethnopharmacology. Abstracts. São Paulo/SP, v. 04, p.3, 2008.

SARR, F. B.; SARR, M.; DIOP, D.; KANE, M. O.; BA, A.; SARR, B.; GUÈYE, L.; DIALLO, A. S.; SAMB. A; ANDRIANTSITOHAINA, R.; CISSÉ, F. *In vitro* modulation of tracheal smooth muscle reactivity by extracts of some Senegalese medicinal plants. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 4, p. 1, p. 13-18, 2010.

SHAMURATOV, B. A.; MAVLYANOV, S. M.; DALIMOV, D. N.; ALLANIYAZOVA, M. K. Polyphenols from certain *Gossypium hirsutum* varieties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 6, p. 597-598, 2003.

SHANG, X.; TAO, C.; MIAO, X.; WANG, D.; TANGMUKE; DAWA; WANG, Y.; YANG, Y.; PAN, H. Ethno-veterinary survey of medicinal plants in Ruergai region, Sichuan province, China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 390-400, 2012.

SILVER, H. M.; SPERLING, R. S.; ST CLAIR, P. J.; GIBBS, R. S. Evidence relating bacterial vaginosis to intraamniotic infection. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 161, p. 808-812, 1989.

SIMHAN, H. N.; BODNAR, L. M.; KIM, K. H. Lower genital tract inflammatory milieu and the risk of subsequent preterm birth: an exploratory factor analysis. **Paediatric Perinatal Epidemiology**, v. 25, p. 277-282, 2011.

SIMÕES, A. A.; AROUTCHEVA, A.; HEIMLER, I.; SHOT, S.; FARO, S. Bacteriocin susceptibility of *Gardnerella vaginalis* and its relationship to biotype, genotype, and metronidazole susceptibility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 185, n. 5, p. 1186-1190, 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre : UFRGS e Florianópolis : UFSC, 2007. 1104 p.

SIVADON-TARDY, V.; ROUX, A.L.; PIRIOU, P.; HERRMANN, J.L.; GAILLARD, J.L.; ROTTMAN, M. *Gardnerella vaginalis* acute hip arthritis in a renal transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 264-265, 2009.

SMITH, F. H. Determination of gossypol in leaves and flower buds of *Gossypium*. **The Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 44, p. 267-269, 1967.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 640p, 2005.

SOBEL, J. D. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 152, p. 924-935, 1985.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1896-1903, 1997.

SOBEL, J. D. Bacterial vaginosis. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 349-356, 2000.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **The Lancet**, v.369, p. 1961-1971, 2007.

SRINIVASAN, S.; FREDRICKS, D. N. The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease**, v. 2008:750479, 22 p., 2008.

SRINIVASAN, S.; HOFFMAN, N. G.; MORGAN, M. T.; MATSEN, F. A.; FIEDLER, T. L.; HALL, R. W.; ROSS, F. J.; MCCOY, C. O.; BUMGARNER, R.; MARRAZZO, J. M.; FREDRICKS, D. N. Bacterial Communities in Women with Bacterial Vaginosis: High Resolution Phylogenetic Analyses Reveal Relationships of Microbiota to Clinical Criteria. **PLOS ONE**, v. 7, e37818, 2012.

STEPHENS, S. G. Evolution under domestication of the new world cottons (*Gossypium spp.*). **Ciência e Cultura**, n. 19, p. 118-134, 1967.

STIPANOVIC, R. D.; LOPEZ, J. D.; DOWD, M. K.; PUCKHABER, L. S.; DUKE, S. E. Effect of racemic and (+)- and (-)-gossypol on the survival and development of *Helicoverpa zea* larvae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 959-968, 2006.

STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S.; BELL, A. A. Ratios of (+)- and (-)-gossypol in leaves, stems, and roots of selected accessions of *Gossypium hirsutum* var. *marie galante* (Watt) Hutchinson. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1633-1637, 2006.

STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L.S.; LIU, J.; BEL, A. A. Total and Percent Atropisomers of Gossypol and Gossypol-6-methyl Ether in Seeds from Pima Cottons and Accessions of *Gossypium barbadense* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 566-571, 2009.

STEERS, E.; FOLTZ, E. L.; GRAVES, B. S. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiotics & Chemotherapy**, v. 9, p. 307-311, 1959.

STRUCK, R. F.; KIRK, M. C. Methylated flavonols in the genus *Gossypium*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 548-549, 1970.

SWIDSINSKI, A.; MENDLING, W.; LOENING-BAUCKE, V.; LADHOFF, A.; SWIDSINSKI, W.; HALE, L. P.; LOCHS, H. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 106, p. 1013-1023, 2005.

SWIDSINSKI, A.; MENDLING, W.; LOENING-BAUCKE, V.; SWIDSINSKI, S.; DÖRFFEL, Y.; SCHOLZE, J.; LOCHS, H.; VERSTRAELEN, H. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, n. 97, p. 97.e1-97.e6, 2008.

TAYLOR, B. D.; HOLZMAN, C. B.; FICHOROVA, R. N.; TIAN, Y.; JONES, N. M.; FU, W.; SENAGORE, P. K. Inflammation biomarkers in vaginal fluid and preterm delivery. **Human Reproduction**, v. 28, n. 4, p. 942-952, 2013.

TEIXEIRA, G. S. Microbiota vaginal de mulheres com e sem vaginose bacteriana, com ênfase em *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus spp.* 2010. 178 f. Tese

(Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 2010.

THOMAS, K. D.; CAXTON-MARTINS, A. E.; ELUJOBA, A. A.; OYELOLA, O. O. Effects of an aqueous extract of cotton seed (*Gossypium barbadense* Linn.) on adult male rats. **Advances in Contraception**, v. 7, n. 4, p. 353-362, 1991.

TRINH, H. T.; LEE, I. A.; HYUN, Y. J.; KIM, D. H. *Artemisia princeps* Pamp. Essential Oil and Its Constituents Eucalyptol and α -terpineol Ameliorate Bacterial Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis in Mice by Inhibiting Bacterial Growth and NF- κ B Activation. **Planta Medica**, v. 77, n. 18, p. 1996-2002, 2011.

UZBEKOV, V. V.; TALIPOV, S. A.; IBRAGIMOV, B. T.; STIPANOVIC, R. D.; LIU, J. Desoxyhemigossypol 6-methyl ether. **Structure Reports Online**, v. 69, E69, o302, 2013.

VASQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; AHRNE, S.; FORSUM, U.; MOLIN, G. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2746-2749, 2002.

VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H.; CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G.; VAN SIMAEY, L.; DE GANCK, C.; DE BACKER, E.; TEMMERMAN, M.; VANEECHOUTTE, M. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. **BMC Microbiology**, v. 5, p. 61-71, 2005.

VUUREN, S. F.; NAIDOO, D. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 552-558, 2010.

WAAGE, S. K.; HEDIN, P. A. Biologically active flavonoids from *Gossypium arboreum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2509-2511, 1984.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer, 2^a ed., 384p., 2001.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006. 424 p.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, p. 34-37, 2011.

WAGNER, T. A.; LIU, J.; STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L.S.; BELL, A. A. Hemigossypol, a constituent in developing glanded cottonseed (*Gossypium hirsutum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2594-2598, 2012.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PLOS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.

WATTS, D. H.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L.; ESCHENBACH, D. A. Bacterial vaginosis as a risk factor for postcesarean endometritis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 75, p.52-58, 1990.

WEISSENBACHER, T.; WALTER, C.; MYLONAS, I.; SCHOLZ, C.; GINGELMAIER, A.; FRIESE, K. Interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 in vaginal fluid from women with bacterial vaginosis. **Archiver of Gynecology and Obstetrics**, v. 281, p. 77-80, 2010.

WIESENFELD, H. C.; HILLIER, S. L.; KROHN, M. A.; AMORTEGUI, A. J.; HEINE, R. P.; LANDERS, D. V.; SWEET, R. L. Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. **Obstetrics and gynecology**, v. 100, n. 3, p. 456–463, 2002.

WITKIN, S. S.; LINHARES, I. M.; BONGIOVANNI, A. M.; HERWAY, C.; SKUPSKI, D. Unique alterations in infection-induced immune activation during pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 118, p. 145-153, 2011.

YOSHIDA, W. B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v. 12, p. 82-95, 1996.

ZAIDI, M. R.; MERLINO, G. The two faces of interferon- γ in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 19, p. 6118-6124, 2011.

ZHANG, Y.; GUO, Y.; WU, K.; WANG, W. HPLC analysis of main flavonoid chemicals and their spatio-temporal dynamics in BT transgenic cotton. **Chinese Journal of Applied Ecology**, v. 14, n. 2, p. 246-248, 2003.

ZHENG, Y.; MORT, A. Isolation and structural characterization of a novel oligosaccharide from the rhamnogalacturonan of *Gossypium hirsutum* L.. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 1041-1049, 2008.

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

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
 PRO-REITORIA DE PESQUISA
 Comissão de Ética na Experimentação Animal

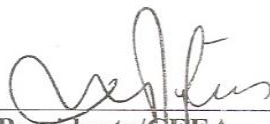
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 068/2012- CEEA sobre “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DOS EXTRATOS DE GOSSYPUM BARBADENSE L. EM ESPLINÓCITOS ISOLADOS DE CAMUNDONGOS”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de JOSÉ OTÁVIO DE AMARAL CORRÊA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/10/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 20 animais da linhagem BALB/c (20 fêmeas), conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 068/2012- CEEA about “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DOS EXTRATOS DE GOSSYPUM BARBADENSE L. EM ESPLINÓCITOS ISOLADOS DE CAMUNDONGOS”, under responsibility of JOSÉ OTÁVIO DE AMARAL CORRÊA - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/10/2012. For the development of this research 20 animals (20 female) lineare BALB/c were released, as requested

Juiz de Fora, 04 de outubro de 2012.


 Presidente/CEEA


 p/ Secretário/CEEA

ANEXO B

TABELA 8 - Perfil de resistência das cepas testadas de *Gardnerella vaginalis* aos antibióticos presentes no mercado brasileiro.

	CIM (µg/mL)						
	AMP	AMP+SUB	MTZ	CLI	CLO	SEC	TINI
02.1	1*	1	128**	0,0625	0,5	>64**	64**
02.2	2**	2	1024**	0,0625	1	>64**	>64**
02.3	2**	1	1024**	0,0625	1	>64**	>64**
02.4	0,5	0,5	128**	0,0625	0,5	4	2
103.1	4**	2	1024**	0,0625	0,5	>64**	>64**
103.2	4**	2	1024**	0,0625	0,5	>64**	>64**
104.4	2**	1	64**	0,0625	1	64**	64**
109.1	2**	1	1024**	0,0625	0,5	>64**	64**
113.1	2**	2	16*	0,0625	0,5	8	4
118.1	2**	1	32**	0,0625	1	>64**	64**
126.1	2**	1	8	0,0625	0,5	8	2
126.2	16**	4	32**	0,0625	1	64**	16*
127.3	0,5	0,5	4	0,0625	0,125	8	2
128.1	2**	0,5	8	0,0625	1	>64**	>64**
134.4	1*	0,5	8	0,125	1	16*	8
135.1	4**	2	8	0,0625	1	32**	8
135.2	2**	2	8	0,0625	0,25	32**	8
135.4	1*	0,5	8	0,0625	0,25	32**	8
135.5	2**	0,5	8	0,0625	0,25	32**	8
138.1	4**	1	256**	0,5	1	32**	32**
139.3	1	0,25	16*	0,0625	0,5	64**	32**
201.1	0,25	0,125	16*	0,25	0,5	16*	2
ATCC 14018	0,5	0,25	16	0,0625	4	4	4
ATCC 14019	0,5	0,25	16	0,0625	4	4	4
CIM 50	2**	1	16*	0,0625	0,5	32**	16*
CIM 90	4**	2	1024**	0,25	1	>64**	>64**
Varição	0,25-4	0,125-4	4-1024	0,0625-64	0,125-4	4->64	2->64

AMP – ampicilina; AMP + SUB – ampicilina associada a sulbactam; MTZ – metronidazol; CLI – clindamicina; CLO – cloranfenicol; SEC – secnidazol; TINI – tinidazol; ** - resistência ao antibiótico; * - resistência intermediária ao antibiótico.

Fonte: Adaptado de Knupp (2013).