

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS**

Ari Sérgio de Oliveira Lemos

Prospecção química e biológica de folhas de *Centrosema coriaceum* Benth (Fabaceae): Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antifúngica

Juiz de Fora

2019

Ari Sérgio de Oliveira Lemos

Prospecção química e biológica de folhas de *Centrosema coriaceum* Benth (Fabaceae): Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antifúngica

Dissertação de mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

De Oliveira Lemos , Ari Sérgio .

Prospecção química e biológica de folhas de *Centrosema coriaceum* Benth (Fabaceae): Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antifúngica / Ari Sérgio De Oliveira Lemos . -- 2019.
90 f.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Coorientador: Rodrigo Luiz Fabri

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. *Centrosema*. 2. antioxidante. 3. anti-inflamatório. 4. citotóxico. 5. antifúngico . I. Ferreira, Ana Paula , orient. II. Luiz Fabri, Rodrigo , coorient. III. Título.

Ari Sérgio de Oliveira Lemos

Dissertação de mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto.
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo.
Universidade Federal de São João Del Rei

Suplentes:

Profa. Dra. Elaine Soares Coimbra
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Hudson Caetano Polonini
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora

DEDICO

Aos meus queridos pais: Nilson Balbino de Lemos e Adilsa Gonçalves de Oliveira Lemos por todo incentivo e amor em toda a minha trajetória de vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS por ter me guiado, iluminado e me dado forças em toda a trajetória da minha vida.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por sempre lutarem para me dar um futuro melhor.

Aos meus irmãos, Ariane e Arivelton por todo o apoio em minha caminhada.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos com paciência e incentivo.

Agradeço ao meu Coorientador Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri, do Departamento de Bioquímica, pelos conhecimentos microbiológicos, amizade e inúmeros conselhos. A todos do Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos que contribuíram, de forma direta e indireta, para a realização dos meus trabalhos. Em especial: Lara, Lívia, Maria Clara, Jhamine, Olívia, Laura e Karol.

A todos do Laboratório de Imunologia que me receberam e que contribuíram para a realização das análises citotóxicas e anti-inflamatórias. Em especial ao Erick, Flávia, Marcilene, Marina e Luan.

Agradeço aos funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica, em especial ao Delfino, que sempre se mostrou eficiente para solucionar qualquer problema no laboratório.

À Plataforma de Metodologia Analítica de Farmanguinhos/FIOCRUZ, pelas análises cromatográficas e espectrométricas realizadas nesse estudo.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação.

E a todos que me apoiaram neste trabalho.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”

(Albert Einstein)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antifúngica *in vitro* do extrato etanólico de folhas de *Centrosema coriaceum* (CCE) e identificar seus fitoconstituintes. A atividade antioxidante para CCE foi realizada utilizando os ensaios de DPPH, de redução do complexo fosfomolibdênio, de inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico e de quantificação de malondialdeído. A atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio da dosagem de óxido nítrico em células J774A.1. O teste de citotoxicidade foi realizado por meio do ensaio de MTT utilizando as linhagens J774A.1, HEK e HL-60, sendo que para J774A.1, as maiores concentrações foram avaliadas por microscopia óptica e citometria de fluxo. A atividade antifúngica de CCE foi avaliada frente a cinco espécies de *Candida* spp (*Candida albicans* ATCC 24433, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida grablata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750) utilizando a técnica da microdiluição seriada, a fim de encontrar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM). Para a espécie mais sensível foram realizados ensaios para elucidar o mecanismo de ação antifúngico e um ensaio sinérgico com o antifúngico nistatina. CCE também teve o conteúdo de fenóis e flavonoides totais analisados e os constituintes químicos caracterizados por "UFLC/MS". Na atividade antioxidante CCE apresentou CI_{50} de $1,25 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ para o ensaio de DPPH, $79,9 \pm 2,7$ de AAR% a quercetina, $128,3 \pm 4,3$ de AAR% a rutina e $27,3 \pm 0,9$ de AAR% ao ácido ascórbico pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio, além de apresentar atividades promissoras para a inibição da peroxidação lipídica pelos ensaios de β caroteno/ ácido linoleico ($39,2 \pm 3,8\%$ de inibição na concentração de $38,46 \mu\text{g/mL}$, tendo $F1=0,42 \pm 0,094$ e $F2= 1,14 \pm 0,036$) e uma redução significativa de malondialdeído em todas concentrações a partir do segundo dia de ensaio em relação a controle de oxidação. Em relação a atividade anti-inflamatória, CCE inibiu significativamente a produção de óxido nítrico em todas as concentrações testadas. CCE não demonstrou citotoxicidade para as linhagens de células normais J774A.1 e HEK, porém apresentou toxicidade para a linhagem leucêmica HL-60 (concentrações de 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$). CCE foi ativa para *Candida grablata* com CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e efeito fungistático, os ensaios de mecanismo de ação antifúngico revelaram que CCE tem um possível efeito em envoltório celular. Pelo ensaio de sinergismo foi observado que CCE apresenta um efeito aditivo quando utilizado em associação com a nistatina (redução para 1/16 da CIM de CCE e para 1/2 da CIM em nistatina). Os ensaios químicos demonstraram que CCE apresentou um teor de fenóis de $138,20 \pm 11,88 \text{ mg/g}$ equivalentes a ácido tânico e de flavonoides igual a $127,26 \pm 0,53 \text{ mg/g}$ equivalentes em rutina, sugerindo que os flavonoides são as principais substâncias fenólicas presentes. Já as análises por "UFLC/MS" sugeriram a presença de dois flavonoides, rutina e kaempferol-3o- rutinosídeo, e um dissacarídeo, a sacarose. Este é primeiro relato de caracterização química de *C. coriaceum*. Este estudo sugere que os flavonoides são os prováveis constituintes químicos responsáveis pelas bioatividades encontradas, sendo a rutina a principal substância envolvida, visto que esse flavonoide corresponde ao sinal majoritário em CCE.

Palavras Chaves: *Centrosema*, antioxidante, anti-inflamatório, citotóxico e antifúngico.

ABSTRACT

The present work aims to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and antifungal *in vitro* activities of the *Centrosema coriaceum* leaves (CCE) ethanolic extract as well to identify its phyto-constituents. The antioxidant activity of CCE was performed using the DPPH, reduction of the phosphomolybdenum complex, inhibition of the β carotene / linoleic acid system and quantification of malondialdehyde assays. Anti-inflammatory activity was assessed by dosing the nitric oxide in J774A.1 cells. The cytotoxicity test was performed by MTT assay using the J774A.1, HEK and HL-60 cell lines, and for J774A.1, the highest concentrations were evaluated by optical microscopy and flow cytometry. The CCE antifungal activity was evaluated against five species of *Candida* spp (*Candida albicans* ATCC 24433, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida grabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750) using the serial microdilution technique to get the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (CFM). For the most sensitive species, assays were performed to explain the mechanism of antifungal action and a synergistic assay was performed to the antifungal nystatin. CCE also had the content of total phenolics and flavonoids analyzed and the chemical constituents characterized by "UFLC / MS". For the antioxidant activity CCE presented IC₅₀ of $1.25 \pm 0.06 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the DPPH assay, $79.9 \pm 2.7\%$ of AAR% of quercetin, 128.3 ± 4.3 of AAR% of the rutin and $27.3 \pm 0.9\%$ of AAR% to ascorbic acid by the phosphomolybdenum complex reduction assay, and presented promising activities for the inhibition of lipid peroxidation by β -carotene / linoleic acid assay ($39.2 \pm 3.8\%$ inhibition at the concentration of $38.46 \mu\text{g} / \text{mL}$, with $F1 = 0.42 \pm 0.094$ and $F2 = 1.14 \pm 0.036$) and a significant reduction of malondialdehyde at all concentrations from the second test day to the oxidation control. Regarding the anti-inflammatory activity, CCE much inhibited the production of nitric oxide at all concentrations tested. CCE did not show cytotoxicity to the normal cell lines J774A.1 and HEK, but showed toxicity to the HL-60 leukemic line (concentrations of 60 and 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$). CCE was active for *Candida grabrata* with CIM of 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and had fungistatic effect, antifungal mechanism of action assays revealed that CCE has a possible effect on cell envelope. By the synergism assay it was observed that CCE has an additive effect when used with nystatin (reduction to 1/16 of MIC for CCE and to 1/2 of MIC for nystatin). The chemical tests showed that CCE had a phenol content of $138.20 \pm 11.88 \text{ mg} / \text{g}$ equivalent to tannic acid and flavonoids equal to $127.26 \pm 0.53 \text{ mg} / \text{g}$ equivalents in rutin, suggesting that flavonoids are the main phenolic substances present. The analyzes of "UFLC / MS" suggested the existence of two flavonoids, rutin and kaempferol-3o-rutinoside, and a disaccharide, sucrose. This is the first study of the chemical characterization of *C. coriaceum*. This study suggests that flavonoids are probably the chemical constituents responsible for the bioactivities found, with rutin being the main substance involved, since this flavonoid corresponds to the greatest signal in CCE.

Key Words: *Centrosema*, antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and antifungal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o desenvolvimento do câncer.....	19
Figura 2 -	Estrutura química do núcleo dos flavonoides mostrando a diversas posições em que podem ser inseridas as hidroxilas e outras substituições.....	20
Figura 3 -	Fases de migração leucocitária destacando a presença das citocinas, quimiocinas, integrinas e moléculas de adesão.....	22
Figura 4 -	Participação dos fatores inflamatórios na angiogênese e crescimento tumoral. Participação de alguns mediadores inflamatórios (VEGF e NO) e da enzima COX-2 no processo de angiogênese (A), vaso sanguíneo recém-formado após o processo de angiogênese no foco do tumor e aumento do tecido tumoral (B).....	26
Figura 5 -	Formas morfológicas das espécies de leveduras do gênero <i>Candida</i> spp. mostrando imagens microscópicas e esquemas das formas de levedura, pseudohifa e hifal. O a seta mostra a transição da forma de levedura até a forma hifal e conseqüentemente o aumento da expressão dos genes de virulência com o decorrer do tempo.....	30
Figura 6 -	Imagens de manifestação clínica de candidíase vulvovaginal. Colonização externa da região vulvovaginal (A), Colonização interna da região vulvovaginal (B).....	31
Figura 7 -	Representação do transportadores da família ABC (<i>ATP-Binding Cassette</i>) e do transportador MSF (<i>Major Superfamily Facilitator</i>). As principais bombas de efluxo descritas para leveduras que apresentam resistência aos azólicos. (A) Transportador <i>ATP-Binding Cassette</i> mostrando os domínios citosólicos dentro do citoplasma (NBDs) e os domínios transmembrana instalados na membrana plasmática da célula fúngica. (B) Transportador <i>Major Superfamily Facilitator</i> instalado na membrana da célula fúngica mostrando o efluxo de uma droga antifúngica por meio da diferença de gradiente de prótons.....	32
Figura 8 -	Imagens de <i>C. coriaceum</i> . (A) Planta inteira. (B) Detalhe dos frutos secos. (C) Planta seca com detalhe das folhas e flor. (D) Esquema do ramo e dos frutos.....	35
Figura 9 -	Porcentagem de inibição da lipoperoxidação das concentrações de 38,5 a 1,2 µg/mL do extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> e do controle positivo rutina.....	54
Figura 10 -	Perfil de decaimento da absorvância do β-caroteno (Curva de oxidação) avaliada em 470 nm, demonstrando a preservação de sua coloração ao longo de 120 minutos de reação quando utilizado o extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> e o controle positivo rutina.....	54
Figura 11 -	Inibição da produção de malonaldeído após tratamento com o controle positivo rutina (A) e do extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> (B).....	55
Figura 12 -	Atividade anti-inflamatória das diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> por meio da redução de óxido de nítrico.....	56

Figura 13 -	Avaliação da citotoxicidade celular em macrófagos da linhagem J774A.1 (A), células embrionárias de rim da linhagem HEK (B) e células de leucemia mieloide da linhagem HL-60 tratadas com o extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> (C).....	57
Figura 14 -	Aspectos morfológicos e densidade celular de macrófagos da linhagem J774A.1 tratadas com extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i>. Aumento de 40X. (A) Células cultivadas apenas com meio de cultura RPMI e sem tratamento. (B) Células cultivadas com meio de cultura RPMI acrescido de 0,06% de DMSO (Veículo das amostras). (C) Células tratadas com a concentração de 60 µg/mL do extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i>. (D) Células tratadas com a concentração de 30 µg/mL do extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i>.....	58
Figura 15 -	Avaliação do perfil de citotoxicidade celular em macrófagos da linhagem J774A.1 tratados com o extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> nas concentrações 60 µg/mL e 30 µg/mL avaliada por iodeto de propídeo como marcador utilizando citometria de fluxo.....	60
Figura 16 -	Perfil de células viáveis e células inviáveis marcadas com iodeto de propídeo após tratamento com as concentrações de 60 e 30 µg/mL do extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i>.....	61
Figura 17 -	Ensaio de extravasamento de nucleotídeos mostrando um aumento da absorbância em 260nm, em sobrenadante de células tratadas com o extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> (CCE) e nistatina (NIS), quando comparados em relação ao controle de crescimento não tratado (CC).....	63
Figura 18-	Perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> analisado por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massas.....	65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Principais classes dos fármacos antifúngicos utilizados no tratamento das micoses, suas indicações e seus efeitos adversos.....	29
Tabela 1 -	A valiação da atividade antioxidante de CCE frente aos métodos de DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	53
Tabela 2 -	Resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica para as leveduras do gênero <i>Candida</i> spp. após exposição ao extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i> e ao controle positivo fluconazol.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ABS	Absorbância
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
CCE	Extrato etanólico de folhas de <i>C. coriaceum</i>
CI₅₀	Concentração inibitória de 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo
COX	Ciclo-oxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EtOH	Etanol
ESI	“Eletrospray”
HEK	Linhagem de Células Embrionárias de Rim
HL-60	Linhagem Tumoral de Leucemia Mieloide
IP	Iodeto de Propídeo
J774A.1	Linhagem de Macrófagos Murinos
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MFS	<i>Major Superfamily Facilitator</i>
NBDs	<i>Nucleotide Binding Domains</i>
NO	Óxido Nitrico
SFB	Soro Fetal Bovino
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
UFLC/MS	Cromatografia Líquida Ultrarrápida Acoplada a Espectrometria de Massas
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Radicais livres e substâncias antioxidantes	18
2.2 Processo inflamatório	21
2.3 Câncer e o processo inflamatório	24
2.4 Doença e resistência fúngica	28
2.5 Gênero <i>Centrosema</i> e espécie <i>Centrosema coriaceum</i> Benth	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Material Vegetal	37
4.2 Preparação do extrato	37
4.3 Avaliação da atividade antioxidante	37
4.3.1 Determinação da atividade antioxidante por meio do método de sequestro de radicais livres (DPPH•).....	37
4.3.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio.....	38
4.3.3 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	39
4.3.4 Determinação da atividade antioxidante pela quantificação de malondialdeído.....	40
4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	41
4.4.1 Linhagem celular e cultura.....	41
4.4.2 Dosagem de NO em sobrenadante de células J774A.1.....	41
4.5 Avaliação da citotoxicidade	42
4.5.1 Linhagem celular e cultura.....	42
4.5.2 Avaliação de viabilidade pelo ensaio de MTT.....	42
4.5.3 Avaliação da morfologia e densidade celular por microscopia óptica e citotoxicidade em células J774A.1 tratadas com CCE por iodeto de propídio utilizando citometria de fluxo.....	43
4.6 Avaliação da atividade antifúngica	44
4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para diferentes estirpes de <i>Candida</i> spp.....	44
4.6.2 Concentração fungicida mínima.....	45
4.6.3 Determinação dos mecanismos de ação antifúngica.....	45
4.6.3.1 Ação sobre membrana por extravasamento de nucleotídeos.....	45
4.6.3.2 Ensaio de proteção do sorbitol.....	46
4.6.3.3 Ensaio de ligação ao ergosterol exógeno.....	46
4.6.4 Ensaio Sinérgico “ <i>Checkerboard</i> ”.....	46
4.7 Identificação das classe e/ou substâncias químicas presentes em CCE	48

4.7.1	Determinação do conteúdo de compostos fenólicos.....	48
4.7.2	Determinação do conteúdo de flavonoides.....	48
4.7.3	Determinação do perfil cromatográfico por <i>UFLC/MS</i> de CCE.....	49
4.8	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Atividade antioxidante.....	51
5.1.1	Inibição do radical DPPH•.....	51
5.1.2	Redução do complexo fosfomolibdênio.....	51
5.1.3	Inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	51
5.1.4	Avaliação da atividade antioxidante pela quantificação de malondialdeído.....	55
5.2	Atividade anti-inflamatória.....	56
5.2.1	Redução de NO em sobrenadante de células J774A.1	56
5.3	Citotoxicidade em linhagens celulares normais e tumorais.....	56
5.3.1	Avaliação da atividade citotóxica em células normais e tumorais pelo ensaio do MTT.....	57
5.3.2	Avaliação morfológica e da densidade celular por microscopia óptica e atividade citotóxica por marcação com iodeto de propídeo utilizando citometria de fluxo em células J774A.1	58
5.4	Avaliação da atividade antifúngica.....	62
5.4.1	Concentração inibitória mínima (CIM) para diferentes estirpes de <i>Candida</i> spp.....	62
5.4.2	Determinação dos mecanismo de ação antifúngico.....	62
5.4.2.1	Ação sobre membrana por extravasamento de nucleotídeos.....	62
5.4.2.2	Avaliação de danos à parede celular fúngica e da capacidade de ligação a esteroides de membrana.....	63
5.4.3	Ensaio Sinérgico “ <i>Checkerboard</i> ”	64
5.5	Identificação das classe e/ou substâncias químicas presentes em CCE..	64
5.5.1	Teor de fenóis e flavonoides.....	64
5.5.2	Análise química de CCE por <i>UFLC/MS</i>	64
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÃO.....	74
	ANEXOS.....	75
	REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência (PHANIENDRA, JESTADI e PERIYASAMY, 2015). Diversos processos medeiam a produção dessas moléculas, fazendo com que a produção de radicais livres seja oriunda de diferentes fontes biológicas e ambientais (ARULSELVAN et al., 2016). Estes radicais são derivados de processos metabólicos de organelas (mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático) presentes nas células do corpo humano, sendo as células fagocíticas do sistema imune um dos principais perfis celulares a produzi-los (LOBO et al., 2010; PHANIENDRA, JESTADI e PERIYASAMY, 2015).

Desta forma, a produção de radicais livres está estreitamente relacionada ao processo inflamatório, visto que são produzidas por células do sistema imune que possuem participação ativa no surgimento da inflamação. Essas espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células do sistema imunológico são mediadores cruciais da inflamação, visto que podem causar lesões celulares e agravarem ainda mais o processo que se iniciou (CONNER e GRISHAM, 1996).

Uma vez que o processo inflamatório se instala, este ainda pode dar origem a outras patologias, como a formação de tumores, uma vez que a secreção de mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROS), podem estar envolvidas no surgimento e proliferação das células tumorais (LANDSKRON et al., 2014). Isto é devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas pelo microambiente inflamatório, que causam danos ao DNA de células normais e levam a formação de tumores (GRIVENNIKOV, GRETEN e KARIN, 2010) e pela abundância de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem com a promoção dos cânceres já estabelecido devido ao aumento da angiogênese.

As doenças fúngicas, por sua vez, são responsáveis por grande parte da morbidade e da mortalidade nos sistemas de saúde pública (PARENTE-ROCHA et al., 2017). Geralmente essas micoses possuem caráter superficial, afetando cerca de 25% da população no mundo inteiro, porém existem casos em que as infecções fúngicas podem tornar-se invasivas e apresentarem um risco em potencial a vida dos pacientes. Isto acontece, devido à dificuldade em seu diagnóstico e tais doenças contam com um número limitado de opções terapêuticas para o seu tratamento (SOUZA e AMARAL, 2017). Estima-se que as infecções por fungos patogênicos

causem pelo menos 1,4 milhões de mortes em humanos, por ano, em todo o mundo (SANGLARD, 2016).

Como desfecho da infecção, a presença de fungos patogênicos no organismo leva a quadros patológicos que são acompanhados de processos inflamatórios como, por exemplo, a candidíase vulvovaginal, que é resultante da infecção por micro-organismos do gênero *Candida* spp, um dos principais responsáveis por causar infecções em humanos (ROSELLETTI et al., 2017). Neste caso, a inflamação é um mecanismo de defesa imunológico que o organismo utiliza para combater o agente infeccioso. Esse processo libera mediadores químicos no tecido acometido, incluindo aminoácidos excitatórios, EROS, peptídeos, lipídios e citocinas (CHEN et al., 2016).

Diante disso, torna-se necessário a busca de novas formas alternativas de tratamento para as patologias já citadas acima. Neste âmbito, temos a biodiversidade brasileira, uma fonte para descoberta de substâncias biologicamente ativas que podem ser usadas no tratamento de diversas doenças humanas. Entretanto, algumas espécies apresentam poucos estudos relacionados ao seu potencial terapêutico (NEWMAN, 2017). Neste cenário, encontram-se algumas plantas do gênero *Centrosema*, espécies cujas principais classes químicas são os flavonoides e taninos e que são usadas popularmente para o tratamento de doenças que acometem as vias aéreas, diabetes e afecções hepáticas (VILA VERDE, 2003; PINTO et al., 2013; MACÊDO et al., 2015; CARVALHO, 2016). Contudo, algumas espécies ainda carecem de mais estudos, como é o caso de *Centrosema coriaceum* que apresenta atividade anti-helmíntica relatada, mas que ainda possui uma escassez de informações em relação a sua composição química e propriedades biológicas (CARVALHO, 2016). Desta forma, diante da possibilidade de descobrir novas propriedades terapêuticas para essa espécie, o presente estudo objetivou avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica e antifúngica de *Centrosema coriaceum* Benth e identificar seus principais constituintes químicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radicais livres e substâncias antioxidantes

Os radicais livres são átomos ou moléculas muito instáveis contendo um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência (PHANIENDRA, JESTADI e PERIYASAMY, 2015). Eles reagem rapidamente com outros compostos tentando capturar o elétron necessário para ganhar estabilidade, de forma a atacar as moléculas estáveis mais próximas, "roubando", assim, seus elétrons. Isto faz com que as moléculas anteriormente estáveis tornem-se radicais livres, o que inicia uma reação em cascata, que pode culminar na lise celular (ELKHATEEB; ALSHAMMARY, 2017).

Tais radicais são derivados de processos metabólicos de organelas (mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático) presentes em células do corpo humano, sendo as células fagocíticas do sistema imune um dos principais perfis celulares a produzi-las. Contudo, a produção desses radicais não está atrelada apenas ao organismo, eles também podem ser derivados de fontes externas como exposição a raios-X, consumo de álcool e cigarro, exposição a metais pesados, metais de transição, solventes industriais, pesticidas, drogas como o halotano e paracetamol, poluentes atmosféricos e produtos químicos industriais (LOBO et al., 2010; PHANIENDRA, JESTADI e PERIYASAMY, 2015).

Em concentrações baixas a moderadas, os radicais livres funcionam em processos celulares fisiológicos, mas em altas concentrações causam danos a componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA (BIRBEN et al., 2012). Desta forma, a grande quantidade desses radicais leva ao chamado estresse oxidativo, favorecendo o surgimento de diversas doenças humanas (MOO-HUCHIN et al., 2015). O corpo humano possui substâncias antioxidantes endógenas como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase ou compostos não enzimáticos, como ácido úrico, bilirrubina, albumina e metalotioneínas (PISOSCHI e NEGULESCU, 2011). Entretanto, quando as defesas do organismo falham podem ocorrer efeitos deletérios ao corpo humano, uma vez que sua capacidade antioxidante está intimamente ligada à saúde e que o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos antioxidantes endógenos está relacionado ao surgimento de diversas patologias, tais como câncer, distúrbios neurológicos, aterosclerose,

hipertensão, isquemia, perfusão, diabetes, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma (BIRBEN et al., 2012; ZHANG, LIU e LIU, 2014).

Em relação ao câncer, sabe-se que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERN), como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e o óxido nítrico induzem modificações no material genético celular e aumentam a carcinogênese (LOBO et al., 2010). Isto acontece pois, os radicais livres podem levar a oxidação de proteínas, alterações em vias de sinalização, danos ao DNA, causando assim alterações epigenéticas e mudanças na expressão gênica, fatores que podem contribuir com o desenvolvimento do câncer (Figura 1) (SILVA e JASIULIONIS, 2014).

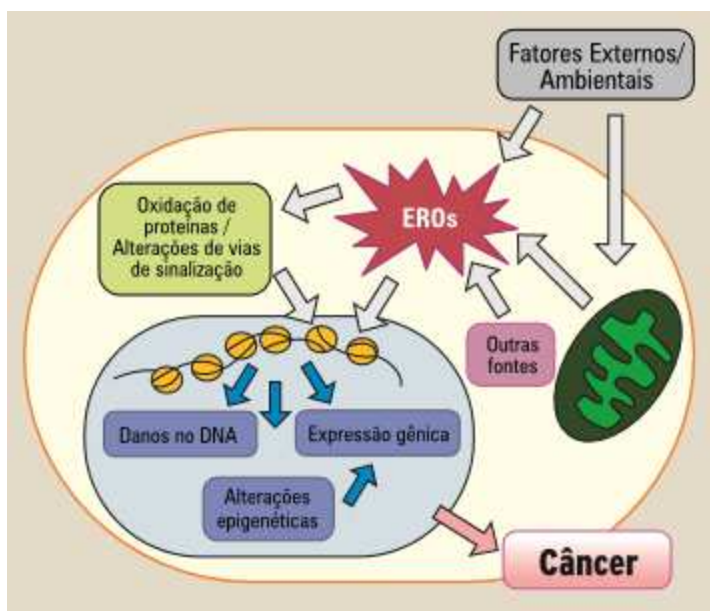


Figura 1- Relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o desenvolvimento do câncer. Fonte: SILVA; JASIULIONIS, 2014.

Quando as defesas endógenas não podem assegurar uma proteção completa do organismo contra os radicais livres, surge a necessidade de antioxidantes exógenos, como suplementos nutricionais ou produtos farmacêuticos, que contenham como princípio ativo um ou mais compostos antioxidantes (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011). Neste contexto, o uso de substâncias de origem naturais como vitamina C, vitamina E, polifenóis e carotenoides tem ganhado destaque, uma vez que alguns antioxidantes sintéticos amplamente utilizados como o Butil hidroxianisol (BHA), Butil hidroxitolueno (BHT) e tert-butil-hidroquinona (TBHQ) já foram associados ao desenvolvimento de processos carcinogênicos e lesões hepáticas em estudos *in vivo* (HATAMIA et al., 2014; NIMSE e PAL, 2015).

Dentre os antioxidantes exógenos de origem natural, podemos destacar os flavonoides, uma importante classe de substâncias polifenólicas com mais de 10.000 estruturas diferentes, cujo estrutura básica está apresentada na Figura 2) (BRUNETTI et al., 2013). Estes metabólitos estão presentes comumente nos vegetais e apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas (PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2014), tais como anti-inflamatória (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016), antitumoral (AL-RIMAWI et al., 2016) e antifúngicas (ALVES et al., 2014) e acredita-se que essas atividades biológicas sejam devido às suas propriedades antioxidantes (LIMA e BEZERRA, 2012).

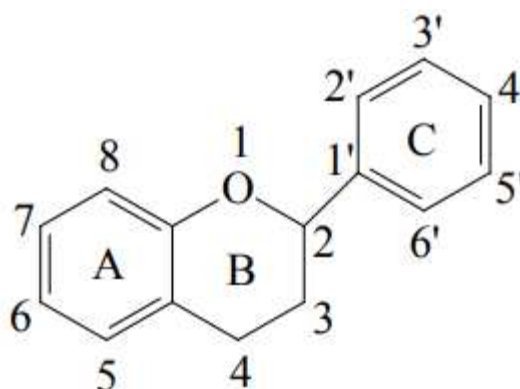


Figura 2- Estrutura química do núcleo dos flavonoides mostrando a diversas posições em que podem ser inseridas as hidroxilas e outras substituições.

Os flavonoides possuem modos abrangentes de combater os radicais livres, podendo eliminar essas moléculas através da doação de elétrons, supressão de enzimas associadas a sua geração e estimulação de enzimas antioxidantes internas que irão combater a produção desses radicais (BANJARNAHOR e ARTANTI, 2014). A capacidade de doação de elétrons pelos flavonoides está relacionada com a presença e o aumento de hidroxilas em sua estrutura (LIN et al., 2014). As hidroxilas livres podem doar seus átomos de hidrogênios para um radical livre e estabilizá-lo, gerando, assim, o radical fenoxil flavonoide, que é relativamente estável. Posteriormente, esta molécula estável pode reagir com um segundo radical, doando mais um hidrogênio e adotando, ainda, uma estrutura estável de quinona (BANJARNAHOR e ARTANTI, 2014).

Em relação a estrutura atividade antioxidante, a presença das hidroxilas nas posições de C-3' e C- 4' no anel B dos flavonoides conduz ao aumento da atividade antioxidante, enquanto que a presença de açúcares leva a uma perda dessa

atividade. Isto faz com que os flavonoides glicosilados tenham uma pior atividade em relação as agliconas, refletindo que, a capacidade antioxidante depende principalmente do número de hidroxilas fenólicas e depende pouco das hidroxilas presentes nos açúcares (LIN et al., 2014).

2.2 Processo inflamatório

A inflamação é um processo complexo em que várias células e moléculas desempenham papéis diferentes de uma maneira coordenada e controlada. Ela geralmente é um processo benéfico ao organismo, sendo um mecanismo de defesa vital para saúde, uma vez que representa uma das primeiras barreiras contra agente agressores externos e distúrbios internos (CHEN et al., 2018). No entanto, quando o processo inflamatório persiste no organismo, ele pode se tornar crônico e levar ao surgimento de várias doenças degenerativas como câncer, diabetes, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares (BAIZABAL-AGUIRRE et al., 2014).

O processo inflamatório ocorre através de uma série de eventos: as aminas vasoativas, como a histamina, levam a dilatação de vênulas e arteríolas conduzindo um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos, o que ocasiona um aumento do fluxo sanguíneo e na passagem de leucócitos para os tecidos atingidos (ARULSELVAN et al., 2016; ABDULKHALEQ et al., 2018). Poucos minutos após uma lesão ou trauma ocorre a migração celular, na qual os neutrófilos ou polimorfonucleares (PMN), que são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, são recrutados para o local da inflamação, sendo este o perfil celular mais frequente em processos inflamatórios agudos (SUNDD et al., 2011). A principal função dos neutrófilos é destruir antígenos, bactérias, células injuriadas e componentes danificados da matriz que possam estar presentes na ferida. Outro perfil celular a sair dos vasos sanguíneos e direcionar-se ao local da inflamação são os monócitos, que ao entrarem no tecido acometido diferenciam-se em macrófagos (GETHIN, 2012).

Um importante fator que contribui para a migração celular é a produção de citocinas, elas são pequenas proteínas não estruturais de baixo peso molecular que tem uma influência na regulação da inflamação e imunidade (GULATI et al., 2016). Os macrófagos residuais presentes no tecido atingido produzem citocinas, como TNF- α e IL-1, que estimulam a produção de E-selectinas e P-selectinas (moléculas de adesão) nas paredes dos capilares. Em seguida, os leucócitos se ligam a essas

moléculas de adesão e migram pelos capilares seguindo o gradiente de quimiocinas. A migração é cessada quando um ligante presente na parede dos capilares se liga a um outro grupo de moléculas de adesão presente na superfície dos leucócitos, as integrinas (a presença de quimiocinas torna ainda mais forte essa ligação). Desta forma, os leucócitos param de migrar pelas paredes do vaso e realizam o processo de diapedese, que é a passagem das células presentes no vaso sanguíneo para o tecido alvo (Figura 3) (HUANG, GHAI e HO, 2004).

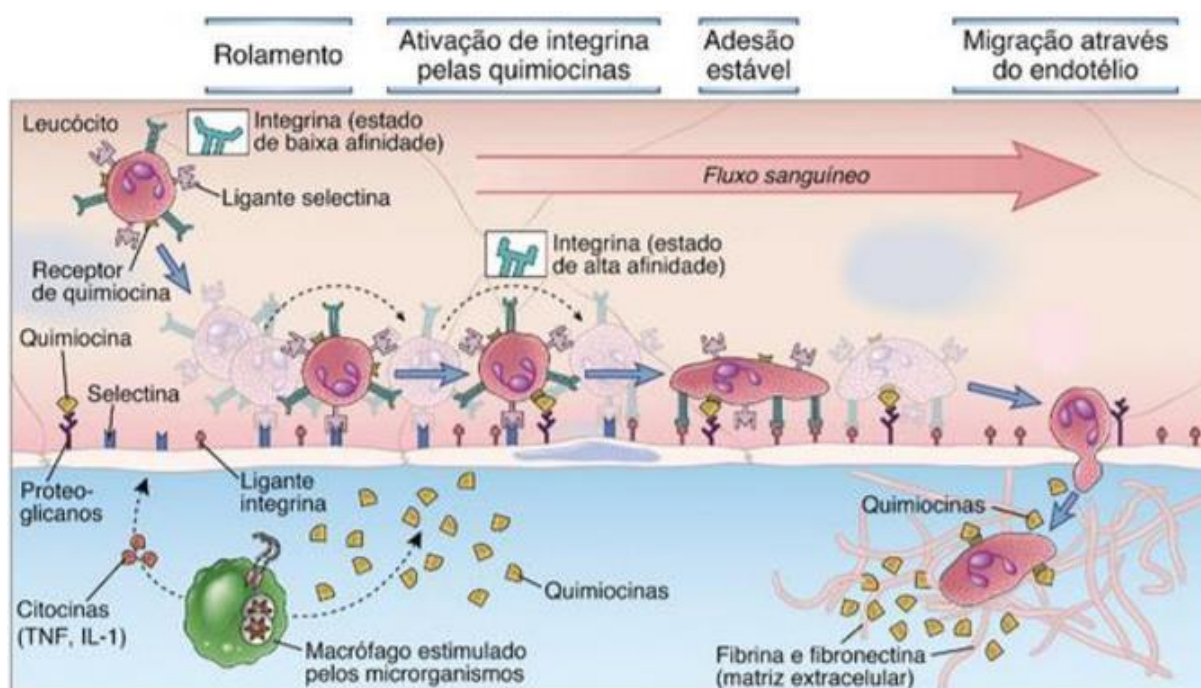


Figura 3- Fases de migração leucocitária destacando a presença das citocinas, quimiocinas, integrinas e moléculas de adesão. Fonte: Adaptado de ABBAS e LICHTMAN, 2009.

As citocinas apresentam outras funções. Essas proteínas são consideradas mensageiros intercelulares no sistema imunológico e integram a função de vários tipos de células em vários compartimentos do corpo, para que assim haja uma resposta imune coerente (GULATI et al., 2016). Estas moléculas possuem tanto atividade pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α , IL-6), quanto anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-13). Entre as principais citocinas inflamatórias estão a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), que podem ser estimuladas por eventos que levam a lesão tecidual, onde há a liberação de alguns mediadores químicos como histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e EROs (ZHANG e AN, 2007). A produção excessiva dessas citocinas inflamatórias, medeia a secreção de proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa e fatores de coagulação pelas células do fígado. Estas proteínas,

por sua vez, induzem o endotélio cerebral a produzir prostaglandinas, mediadores que ao serem liberados são responsáveis pelo aparecimento da dor e da febre no processo inflamatório (AHMED, 2011).

Outra molécula importante do processo inflamatório é o óxido nítrico (NO). Este radical é capaz de ativar as enzimas ciclo-oxigenase 1 e ciclo-oxigenase 2 (COX-1 e COX-2), que aumentam os níveis de prostaglandinas, agravando ainda mais o processo inflamatório (FANG et al., 2015). Além disso, a vasodilatação que é um dos sinais cardinais da resposta inflamatória é desencadeada em grande parte por meio de um processo dependente de NO. Vários mediadores inflamatórios, como a bradicinina e a histamina, produzem vasodilatação por meio da estimulação da liberação endotelial de NO. O NO pode difundir para o músculo liso e ativar a enzima guanilato ciclase, aumentando por sua vez os níveis intracelulares de GMPc, que levam ao relaxamento do músculo liso de veias e artérias (WALLACE, 2005).

Ambas citocinas TNF- α , IL-1 e o radical NO, são produzidos mediante a ativação de um importante fator de transcrição, o fator nuclear de transcrição Kapa B (NFkB). Esta molécula exerce uma função essencial na regulação de genes associados à inflamação e está envolvido na sua progressão. A ativação do NFkB é mediada por ligantes que estimulam os receptores *Toll Like Receptor* (TLR) presentes nas células do sistema imune. A ligação nos receptores TLR ativa o fator NFkB, deslocando-o do citoplasma para o núcleo e acelere a transcrição de genes associados à inflamação, como os genes responsáveis pela produção das citocinas TNF- α , IL-1 e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (AHMED, 2011).

Em relação as opções terapêuticas para tratamento de inflamações, existem os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), uma das classes de fármacos mais comumente prescritas para dor e inflamação. Essa classe está entre os medicamentos mais vendidos, alcançando cerca de 5 a 10% de todos os medicamentos prescritos por ano no mundo (WONGRAKPANICH et al., 2018). Além do seu efeito anti-inflamatório, os AINEs têm propriedades antipiréticas e analgésicas. Esses medicamentos inibem as enzimas ciclo-oxigenases (COXs), que como dito anteriormente, são enzimas determinantes para a síntese de prostaglandinas e cujo bloqueio na sua produção leva a efeitos analgésico, antipirético e anti-inflamatório (MEEK, LAAR e VONKEMAN, 2010; WONGRAKPANICH et al., 2018).

Entretanto, devido aos efeitos adversos ocasionados ao uso crônico dos AINEs (ulceras péptica, insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral e infarto

do miocárdio), há um interesse maior em substâncias naturais usadas como suplementos alimentares e de medicações a base de plantas medicinais para reduzir a dor e a inflamação (MAROON, BOST e MAROON, 2010; MARCUM e HANLON, 2010). Muitos desses fitocompostos funcionam inibindo as vias inflamatórias de maneira similar aos AINEs (inibição da COX), mas podem atuar também, inibindo vias inflamatórias relacionadas a ativação do fator NFkB (MAROON, BOST e MAROON, 2010).

2.3 Câncer e o processo inflamatório

O câncer é a segunda principal causa de mortalidade em todo o mundo. A prevalência desta doença tem aumentado consideravelmente. Apenas nos Estados Unidos, aproximadamente 1.665.540 pessoas sofreram de câncer e estima-se que 585.720 delas morreram devido a essa doença até 2014 (HASSANPOUR e DEHGhani, 2017). Enquanto no Brasil, estima-se que no biênio de 2018-2019 surgirão 600 mil novos casos de câncer para cada um dos dois anos (INCA, 2018). Existem vários fatores de risco que contribuem para o surgimento dos tumores, dentre eles, os mais citados são: avanço da idade, consumo de álcool, uso de substâncias cancerígenas, inflamação crônica, dieta, hormônios, imunossupressão, agentes infecciosos, obesidade, radiação e tabaco (INCA, 2018).

O processo inflamatório está estreitamente relacionado com a carcinogênese, visto que modula múltiplos processos que contribuem para o surgimento do câncer (ZINGER, CHO e BEN-YEHUDA, 2017). Os mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, radicais livres, prostaglandinas e hormônios de crescimento que são produzidos pelas células do microambiente inflamatório causam alterações genéticas e epigenéticas, incluindo mutações de genes supressores de tumor, metilação do DNA e modificações pós-traducionais, que resultam na instabilidade genômica e levam a carcinogênese (TODORIC, ANTONUCCI e MICHAEL KARIN, 2016; HUANG, CAO e TANG, 2017).

Além disso, o microambiente inflamatório pode aumentar as taxas de mutação celular e da proliferação de células mutadas. As células inflamatórias ativadas servem como fontes de EROS e de ERN que são capazes de induzir danos ao DNA e causar instabilidade genômica às células normais (GRIVENNIKOV, GRETEN e KARIN, 2010). O dano tecidual repetido e a regeneração do tecido na

presença de EROs e ERNs liberadas pelas células inflamatórias interagem com o DNA no epitélio em proliferação resultando em alterações genômicas permanentes como mutações pontuais, deleções ou rearranjos, que favorecem o surgimento dos tumores (COUSSENS e WERB, 2002).

As citocinas e quimiocinas também regulam o processo neoplásico. A produção abundante de citocinas pró-inflamatórias pode levar a um aumento da angiogênese, favorecendo, assim, o crescimento neoplásico (COUSSENS e WERB, 2002). Somado a isso, ainda existe a participação das citocinas IL-1 e TNF α , que induzem a produção de quimiocinas levando um aumento da quimiotaxia dos neutrófilos até o local da inflamação. Os neutrófilos por sua vez irão produzir mais EROs e aumentar assim o processo carcinogênico (DINARELLO, 2006).

Outro perfil celular que está amplamente relacionado com a formação e consolidação dos tumores são os macrófagos. Essas células estão entre as mais versáteis do corpo humano, com capacidade de migrar, mudar de forma e secretar fatores de crescimento e citocinas (ABBAS e LICHTMAN, 2009). Os macrófagos manifestam dois fenótipos distintos de polarização: o classicamente ativado (fenótipo M1) e o alternativamente ativado (fenótipo M2), estando ambos fenótipos relacionados com o surgimento de cânceres. Os macrófagos M1 adquirem esse perfil em resposta as moléculas pró-inflamatórias presentes no ambiente e, após polarização, tornam-se células com grande capacidade de produção e liberação de citocinas inflamatórias, EROs e NO. Essas características fazem com que os macrófagos M1, seja um dos principais perfis celulares oriundos da inflamação que pode levar ao surgimento dos tumores (SEYFRIED e HUYSENTRUYT, 2013). Uma vez que o tumor se instale, o perfil de macrófagos M2 conduz ao crescimento do tumor devido a secreção de fatores de crescimento e de citocinas pro-angiogênicas, um fator crucial para a formação de novos vasos sanguíneos e para metástase das células tumorais (MANTOVANI et al., 2002; JETTEN et al., 2013).

Além disso, outras moléculas presentes no processo inflamatório podem estar envolvidas no processo de angiogênese e, conseqüentemente, na propagação e desenvolvimento do câncer, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), secretada também pelos macrófagos M2, a enzima COX-2 e o NO (Figura 4) (TODORIC, ANTONUCCI e MICHAEL KARIN, 2016).

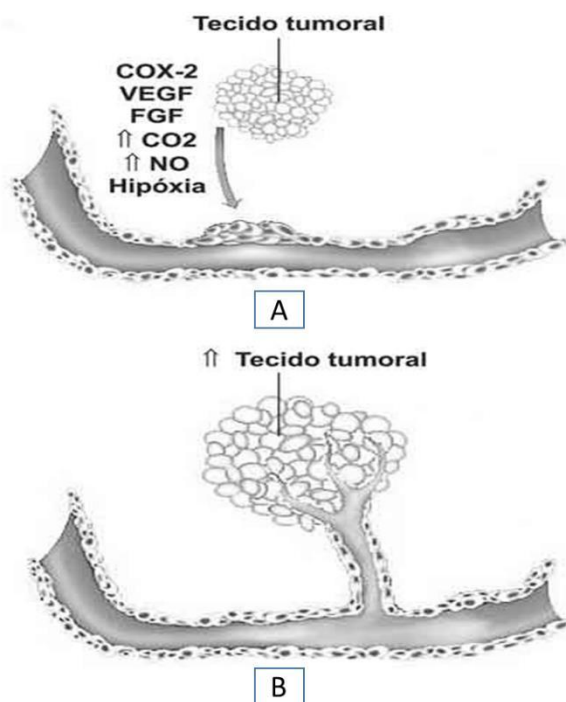


Figura 4- Participação dos fatores inflamatórios na angiogênese e crescimento tumoral. Participação de alguns mediadores inflamatórios (VEGF e NO) e da enzima COX-2 no processo de angiogênese (A), vaso sanguíneo recém-formado após o processo de angiogênese no foco do tumor e aumento do tecido tumoral (B). Fonte: Adaptado de PINHO, 2005.

A produção de VEGF resulta na "mudança angiogênica", onde uma nova vasculatura é formada dentro e ao redor do tumor, permitindo que o mesmo cresça exponencialmente. A vasculatura tumoral formada sob a influência do VEGF é estrutural e funcionalmente anormal, os vasos sanguíneos são irregulares, tortuosos e têm extremidades mortas. Estas características resultam em um fluxo sanguíneo inadequado ao tumor, porém aumenta a hipóxia nesta região e uma maior produção de VEGF devido a falta de oxigênio (CARMELIET, 2005). O NO, além de ser considerado genotóxico e estar envolvido na etiologia de muitos tipos de cânceres, pode apresentar outros mecanismos que levam a estimulação dos tumores (VAHORA et al., 2016). Este radical livre, contribui significativamente com o aumento da

angiogênese do endotélio dos capilares por meio da estimulação do crescimento e diferenciação celular via ativação da óxido nítrico sintase endotelial constitutiva (eNOS) e pela transcrição gênica de GMP cíclico (GMPc) dependente de NO (MORBIDELLI, DONNINI e ZICHE, 2003; HICKOK e THOMAS, 2010; VAHORA et al., 2016). Já a COX-2 é uma enzima que, como mencionado anteriormente, tem grande participação na resposta inflamatória e estudos demonstram que sua expressão está associada a fatores angiogênicos e formação de novos vasos, o que favorece o processo de carcinogênese devido um maior aporte de oxigênio e nutrientes às células tumorais (PINHO, 2005).

Uma opção para o tratamento do câncer é a pesquisa desenvolvida a partir de plantas medicinais. As plantas têm sido usadas por milhares de anos e muitas espécies são consumidas devido aos seus benefícios à saúde em países desenvolvidos. Este fato é devido as propriedades das substâncias de origem natural para diversos fins terapêuticos, por exemplo os polifenóis, brassinosteróides e taxóis que foram identificados e extraídos de plantas e que possuem propriedades anticancerígenas (GREENWELL; RAHMAN, 2015). Além do mais, os compostos bioativos derivados de plantas são altamente multifuncionais e interferem na iniciação, promoção e progressão do câncer, afetando as cascatas de sinalização intracelular envolvidas no processo inflamatório. Este potencial é devido à capacidade das substâncias fitoquímicas inibirem as enzimas COX-2 e iNOS, além do fator de transcrição NFκB que desempenham papéis importantes tanto na promoção da inflamação quanto dos tumores (MADKA e RAO, 2013).

2.4 Doença e resistência fúngica

As doenças fúngicas afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo, entretanto, apesar deste grande índice de morbidade, as micoses ainda são negligenciadas pelas autoridades de saúde pública. Geralmente essas micoses possuem caráter superficial, afetando cerca de 25% da população no mundo inteiro, contudo podem tornar-se invasivas e apresentarem um risco em potencial à vida dos pacientes, isto acontece, pois tais infecções podem apresentar um maior grau de dificuldade em seu diagnóstico (SOUZA e AMARAL, 2017). Entre os patógenos mais frequentemente relacionados a infecções invasivas encontram-se os microorganismos dos gêneros *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Cryptococcus* spp. Estima-se que estes patógenos causem pelo menos 1,4 milhões de mortes por ano em todo o mundo (SANGLARD, 2016; BONGOMIN et al., 2017).

Além disso, alguns desafios limitam o tratamento das infecções fúngicas, um deles é o arsenal de agentes antifúngicos que é reduzido e apresenta um elevado número de efeitos adversos (Quadro 1) e o outro está relacionado com o aumento das estirpes fúngicas que vêm apresentando resistência aos antifúngicos comercialmente utilizados. Desta forma a criação de novas terapias para superar a resistência aos antifúngicos convencionais e melhorar as estratégias terapêuticas contra as micoses é de grande importância (KATHIRAVAN et al., 2012; SRINIVASAN, LOPEZ-RIBOT e RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Quadro 1- Principais classes de fármacos antifúngicos utilizados no tratamento das micoses, suas indicações e seus efeitos adversos. Adaptado de KATHIRAVAN et al., 2012.

Classes	Agente	Indicação	Toxicidade
Azólicos	Fluconazol	Ativo contra a maioria das <i>Candida</i> spp	Intolerância gastrointestinal
	Itraconazol	Atividade anti- <i>Aspergillus</i> spp	Retenção de líquidos, disfunção ventricular esquerda, intolerância gastrointestinal.
	Cetoconazol	Candidíase, coccidioomicose, blastomicose, histoplasmose, paracoccidioomicose e infecções cutâneas por dermatófitos	Efeitos adversos gastrointestinais e hepatite
	Variconazol	Aspergilose invasiva	Elevação de transaminases e distúrbios visuais, erupções cutâneas e sintomas gastrointestinais.
	Posoconazol	Profilaxia de aspergilose invasiva e infecções por <i>Candida</i> spp	Náusea, vômito, dor de cabeça, dor abdominal e diarreia gastrointestinal
	Ravuconazol	Ativo contra uma ampla variedade de fungos, incluindo <i>Candida</i> spp., <i>C.neoformans</i> e outras espécies de leveduras.	
Equinocandinas	Caspofungina	Potente atividade contra <i>Aspergillus</i> spp e candidíase esofágica.	Dor de cabeça, febre, náusea, erupção cutânea, flebite
	Micafungina	Tratamento da candidíase esofágica.	Náuseas, vômitos, dor de cabeça, diarreia, flebite e leucopenia
	Anidulafungina	Ativo contra <i>Candida</i> spp e utilizado contra a candidíase esofágica.	Hipotensão, vômito, constipação, náusea, febre, diarreia, hipocalcemia e elevação enzimas hepáticas
Antibióticos	Nistatina	Infecções causadas por <i>Candida</i> spp da orofaringe, esôfago e trato gastrointestinal.	Nefrotoxicidade
	Anfotericina B	Ampla espectro de atividade antifúngica.	Nefrotoxicidade, toxicidade por Infusão, redução dos níveis de potássio sanguíneo.
Análogos de nucleosídeos	Griseofulvina	Para o tratamento de micoses cutâneas	Toxicidade hepática
	Flucitosina	Ativo contra <i>Candida</i> spp e <i>Aspergillus</i> spp.	Toxicidade da medula óssea
Alilaminas	Terbinafina	Usado para infecções fúngicas em unhas	Erupções de pele leve, náuseas, perda do paladar

Dentre os micro-organismos que causam doenças fúngicas invasivas e que tem apresentado resistência, tem-se as espécies de levedura do gênero *Candida* spp. Estes fungos são micro-organismos polimórficos e apresentam três formas morfológicas distintas: levedura, pseudohifa e hifa como apresentado na Figura 5 (THOMPSON; CARLISLE e KADOSH, 2011).

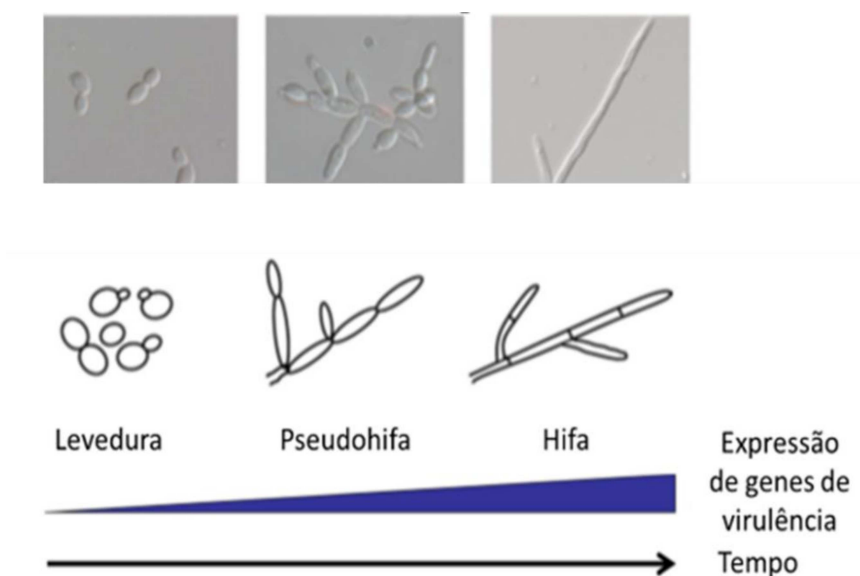


Figura 5- Formas morfológicas das espécies de leveduras do gênero *Candida* spp. mostrando imagens microscópicas e esquemas das formas de levedura, pseudohifa e hifa. A seta mostra a transição da forma de levedura até a forma hifal e, conseqüentemente, o aumento da expressão dos genes de virulência com o decorrer do tempo. Adaptado de THOMPSON; CARLISLE e KADOSH, 2011.

A forma de levedura é a forma colonizadora que se encontra presente na superfície das cavidades oral, trato gastrointestinal e vaginal, entretanto essa forma pode evoluir para forma de pseudohifa a fim de aumentar a captação de nutrientes presentes no meio em que se encontra, e posteriormente para forma de hifa, que está comumente associada as formas de candidíase oral, gastrointestinal e vulvovaginal devido a uma maior expressão de genes de virulência. Isto acontece devido a capacidade da forma hifal em atravessar as barreiras epiteliais e evadir o sistema imune (THOMPSON; CARLISLE e KADOSH, 2011). Entretanto estas leveduras são comensais em humanos saudáveis, causando, em maior parte, infecções apenas em pacientes imunocomprometidos. O gênero *Candida* spp é composto por um grupo heterogêneo de organismos e mais de dezessete espécies diferentes são conhecidas

por serem agentes etiológicos de infecções humanas. No entanto, mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SARDI et al., 2013).

A doença mais comumente relatada por micro-organismos do gênero *Candida* spp. é a candidíase vulvovaginal (Figura 6), uma doença inflamatória aguda que é motivo frequente de consultas ginecológicas, visto que pode afetar até 75% das mulheres em idade fértil (CASSONE, 2015). Este processo inflamatório ocasionado pelas espécies de *Candida* spp., está associada à falha dos polimorfonucleares (PMNs) em remover o patógeno da mucosa vaginal devido a um estado de anergia. Incapazes de efetuar suas funções antimicrobianas e protetoras, os PMNs conseqüentemente morrem e liberam seus grânulos com mediadores inflamatórios, que irão levar ao quadro inflamatório observado na candidíase. Assim, a presença de PMNs é amplamente relacionada a condição inflamatória observada na candidíase vulvovaginal (YANO et al., 2018).

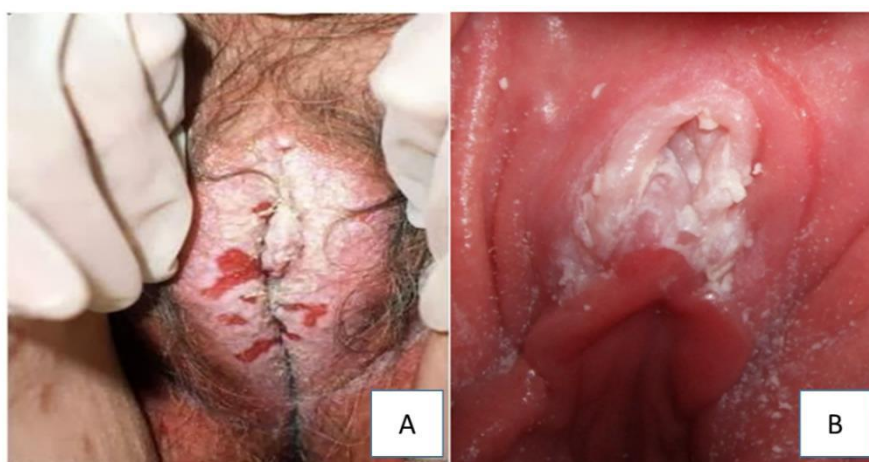


Figura 6- Imagens de manifestação clínica de candidíase vulvovaginal. Colonização externa da região vulvovaginal (A), Colonização interna da região vulvovaginal (B). Fonte: Adaptado de Melo (2017).

Como descrito anteriormente, várias espécies de *Candida* spp. vêm apresentando resistência (PFALLER et al., 2010). Tal acontecimento tem trazido grande preocupação, visto que o tratamento de doenças fúngicas causadas por espécies resistentes é considerado um desafio em potencial e que os mecanismos moleculares que levam à resistência antifúngica são complexos. Isto acontece porque as células fúngicas podem se adaptar a presença dos antifúngicos por meio de mutações dos alvos moleculares dos fármacos, por meio da expressão de proteínas

alvo e de bombas de efluxo (PARENTE-ROCHA et al., 2017). As bombas de efluxo tem sido o mecanismo de resistência mais comumente mencionado, principalmente para os antifúngicos pertencentes a classe dos azólicos. Elas são proteínas que possuem mecanismo de transporte ativo que retiram o fármaco de dentro da célula garantindo, assim, sua sobrevivência (PRASAD e RAWAL, 2014).

Existem dois tipos de proteínas envolvidas no efluxo de fármacos por atuarem nas leveduras do gênero *Candida spp.*, que são os transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*, codificadas pelo gene CDR) e os transportadores MSF (*Major Superfamily Facilitator*, codificadas pelo gene MDR), sendo estas, as principais proteínas discutidas como causadoras de um aumento de espécies de leveduras resistentes (Figura 7). Os transportadores da família ABC possuem dois domínios citosólicos denominados de NBDs (*Nucleotide Binding Domains*), que são responsáveis pela hidrólise de ATP, o que facilita a retirada do fármaco do meio intracelular. Por outro lado, os transportadores MFS não utilizam a hidrólise de ATP, mas um gradiente de prótons para expelir os fármacos (PANWAR, PASRIJA e PRASAD, 2008; PFALLER, 2012).

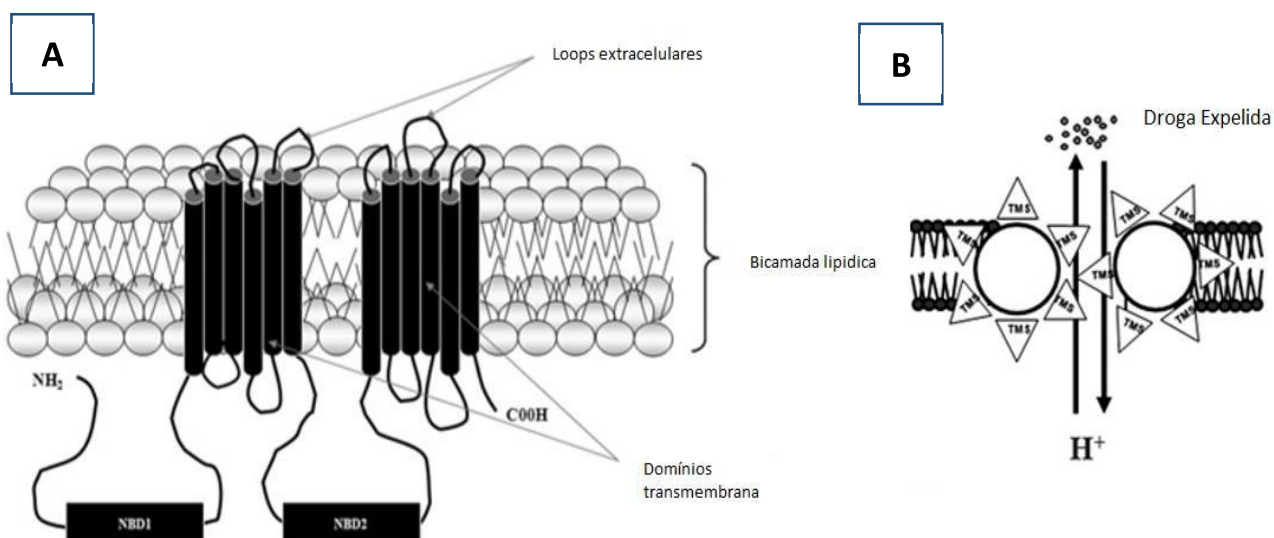


Figura 7- Representação dos transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) e do transportador MSF (*Major Superfamily Facilitator*). As principais bombas de efluxo descritas para as leveduras que apresentam resistência aos azólicos. (A) Transportador *ATP-Binding Cassette* mostrando os domínios citosólicos dentro do citoplasma (NBDs) e os domínios transmembrana instalados na membrana plasmática da célula fúngica. (B) Transportador *Major Superfamily Facilitator* instalado na membrana da célula fúngica mostrando o efluxo de uma droga antifúngica por meio da diferença de gradiente de prótons. Fonte: Adaptado de PANWAR, PASRIJA e PRASAD, 2008.

Os genes de resistência que codificam transportadores do tipo ABC vêm sendo identificados em várias espécies de *Candida não-albicans* e têm demonstrado ligação entre a resistência destas espécies ao fluconazol, um dos medicamentos antifúngicos mais comumente prescrito para infecções por estas leveduras. (PFALLER et al., 2010). Dentre eles, já foram relatados os genes CgCdr1p, CgCdr2p, e CgSnq2p em *C. glabrata*, CpCdr1p em *C. parapsilosis* e CkAbc1p em *C. krusei*. Uma expressão aumentada de CtCDR1 também tem sido detectada em isolados resistentes ao fluconazol para *C. tropicalis* (BERKOW e LOCKHART, 2017). Somado a isso, novas espécies de *Candida* spp. resistentes a múltiplas classes de agentes disponíveis também vêm surgindo, como é o caso de *Candida auris*, uma espécie multirresistente que emergiu em 2009 e que aparenta ter uma excepcional resistência a múltiplos fármacos devido a expressão de transportadores tanto do tipo ABC quanto da família dos transportadores MFS (CHOWDHARY, SHARMA e MEIS, 2017; WIEDERHOLD, 2017).

Devido ao desenvolvimento da resistência fúngica e persistência dos patógenos no processo infeccioso, existe, atualmente, a necessidade de novos agentes antifúngicos para o controle das doenças fúngicas. Desta forma, o enfoque na pesquisa científica para encontrar novas drogas antifúngicas vem ganhando destaque. Isto tem trazido grande relevância para os estudos de mecanismos de ação e efeitos sinérgicos de drogas antifúngicas oriundas das substâncias naturais (ZIDA et al., 2017).

2. 5 Gênero *Centrosema* e espécie *Centrosema coriaceum* Benth.

A família Fabaceae é uma família com grande importância tanto medicinal quanto econômica e tem como principais representantes as leguminosas, espécies que se apresentam como árvores, arbustos e plantas herbáceas perenes ou anuais e que são reconhecidas pelos seus frutos em forma de vagem (RAHMAN e PARVIN, 2014). Dentre os principais metabólitos secundários presentes nas leguminosas destacam-se as substâncias nitrogenadas como os alcaloides e aminas, aminoácidos não proteicos, glicosídeos cianogênicos e peptídeos (lectinas, inibidores de tripsina e peptídeos antimicrobianos). Outros metabólitos secundários que não apresentam nitrogênio em seu núcleo também estão presentes, como no caso dos fenilpropanóides, flavonoides (isoflavonas, catequinas e antocianinas), taninos,

lignanais, cumarinas e furanocumarinas, policetídeos (antraquinonas) e terpenóides (especialmente triterpenóides, tetraterpenóides, esteróides e saponinas) (WINK, 2013).

O gênero *Centrosema* encontra-se dentro da família Fabaceae, sendo nativo da América do Sul, onde é considerado uma importante fonte de forragem e alimento para bovinos, como é o caso de *Centrosema brasilianum* e *Centrosema virginianum* (CORADIN; KARDEC e RAMOS, 2019). A maioria das espécies deste gênero está distribuída por savanas e florestas de regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e Central. No Brasil ocorre a maior riqueza de espécies do gênero *Centrosema*, sendo encontradas 31 espécies, das quais 10 apresentam ocorrência exclusiva neste país (AZEVEDO et al., 2011). Os principais metabólitos secundários produzidos por plantas deste gênero são as substâncias fenólicas das classes flavonoide e taninos condensados (CARVALHO, 2016).

Uma pesquisa realizada na comunidade rural de Catolé, situada no município de Moreilândia, Pernambuco, estabelecida numa área de cerrado na Chapada do Araripe demonstrou que as plantas do gênero *Centrosema* são popularmente utilizadas no tratamento de tosse, gripe, bronquite, asma e como expectorante (MACÊDO et al., 2015). Outras espécies deste gênero ainda podem ter outros usos terapêuticos, como *Centrosema bracteosum* Benth, conhecida popularmente como rabo de tatu, cujo chá ou vinho do caule é utilizado para o tratamento de diabetes e a decocção ou infusão das raízes é utilizada para afecções hepáticas (VILA VERDE, 2003; PINTO et al., 2013).

Uma das espécies mais estudadas do gênero é a *Centrosema pubescens* Benth, uma planta forrageira cujo estudos químicos revelaram a presença de aminoácidos, flavonoides, isoflavonoides glicosilados, ciclo-hexitóis, galactosil-pinitol e polissacarídeos em sua composição (SILVA, TOSTES e PARENTE, 2000). Um estudo realizado por Ekpo et al. (2011) demonstrou que o extrato etanólico das folhas de *Centrosema pubescens* apresenta potencial antimicrobiano para os seguintes micro-organismos: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* e *Tinea capitis*, quando testado por meio do teste de concentração inibitória mínima (CIM) em disco-difusão, teste que o valor da CIM foi de 2,5 µg/disco para todos os micro-organismos avaliados. Outro estudo realizado por Mani e Lakshmi (2010), demonstrou que o extrato diclorometânico das folhas de *C. pubescens* possui atividade citotóxica sobre a linhagem leucêmica HL-60 com IC₅₀ de 5 µg/mL.

Centrosema coriaceum Benth, a espécie do presente estudo (Figura 8), apresenta-se como um subarbusto de ocorrência em Cerrado, mata e campo rupestre no Bioma Cerrado, no Sudeste do Brasil (MENDONÇA et al., 1998). Conhecida popularmente como Jequiritirana e reconhecida pelos folíolos coriáceos, fruto falcado e corola rósea, esta espécie geralmente floresce em janeiro e frutifica de fevereiro a maio (BARBOSA-FEVEREIRO, 1977). Um estudo realizado por Carvalho (2016) demonstrou que o extrato etanólico das folhas dessa espécie apresenta atividade anti-helmíntica promissora contra os nematoides adultos *Parapharyngodon binae* e *Physaloptera* sp. Entretanto, essa espécie possui poucos relatos de atividade biológica e de estudo químico de seus fitoconstituintes. Logo, a busca de mais informações sobre as propriedades terapêuticas dessa espécie faz-se necessária, visando uma correlação das atividades biológicas com os seus constituintes químicos.

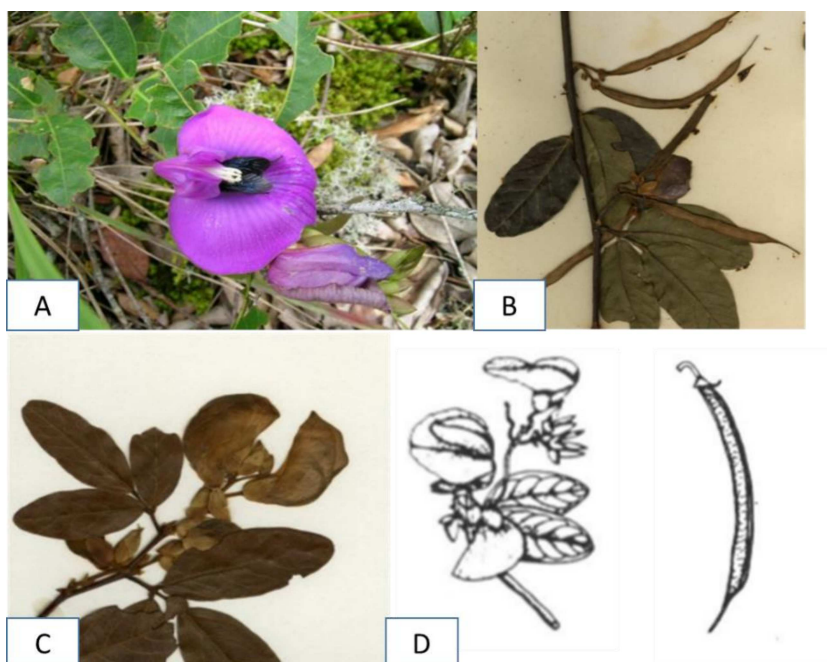


Figura 8- Imagens de *C. coriaceum*.(A). Planta inteira. (B) Detalhe dos frutos secos. (C) Planta seca com detalhe das folhas e de flor. (D) Esquema do ramo e dos frutos. Fonte: BARBOSA-FEVEREIRO, 1977; TRÓPICOS, 2018; GOOGLE IMAGENS, 2018.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterização do potencial químico-biológico do extrato etanólico de folhas de *Centrosema coriaceum* Benth (CCE).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro*.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro*.
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro*.
- Avaliar a atividade antifúngica em diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* spp.
- Avaliar o mecanismo de ação antifúngico das espécies de *Candida* spp. sensíveis.
- Avaliar a atividade sinérgica com outro agente antifúngico.
- Identificar as classes e/ou substâncias químicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As folhas de *Centrosema coriaceum* Benth foram coletadas no distrito de Toledos, município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em 04 de dezembro de 2014, às 13:00 horas. A exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger, da Universidade Federal de Juiz de Fora com o número CESJ 49986.

4.2 Preparação do extrato

As folhas de *C. coriaceum* foram secas a sombra sobre bancada e a temperatura ambiente por 15 dias e pulverizadas a fim de obter o material vegetal seco e homogêneo (29,23 g). O material seco foi extraído com o solvente etanol (5 x 500 mL), sendo concentrado à pressão reduzida utilizando o evaporador rotatório (Heidolph – Laborota 4000). O extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* (CCE) obtido teve rendimento final de 28,7% (8,39 g) em relação ao material vegetal seco. CCE foi mantido sobre refrigeração até o momento da realização dos testes químicos e biológicos.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante

4.3.1 Determinação da atividade antioxidante por meio do método de sequestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade sequestrante de radicais DPPH• foi determinada pelo método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Foram transferidos para um poço de uma placa de 96 poços, 100 µL de uma solução a 1mg/mL da amostra. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas 1:2 em metanol e adicionados 150 µL de solução de DPPH a 20 µg/mL em metanol, obtendo-se as concentrações de 250 a 0,49 µg/mL. A placa foi incubada ao abrigo da luz e após 30 min a absorbância foi mensurada a 517nm. O branco foi preparado da mesma maneira que as amostras, utilizando-se metanol no lugar da solução de DPPH. Procedeu-se também à medida da absorbância do DPPH sem as amostras (controle negativo). Os testes foram

realizados em triplicata e a porcentagem (%) de inibição de oxidação de CCE foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ Inibição} = [(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}) \div \text{Abs}_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Sendo: Abs_{DPPH} : absorvância mensurada para o radical DPPH em metanol; $\text{Abs}_{\text{amostra}}$: absorvância mensurada para as amostras.

Foi determinada a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) em $\mu\text{g/mL}$, que é a quantidade necessária da amostra para reduzir em 50% a ação oxidante do DPPH. O controle positivo utilizado foi a rutina (um flavonoide já conhecido pelo seu poder antioxidante) cuja concentração variou de 250 a 0,0005 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder de redução do complexo fosfomolibdênio

O ensaio foi baseado no método proposto por Prietro et al. (1999). CCE e os controles positivos, quercetina, rutina e ácido ascórbico foram diluídos em etanol 70% (EtOH), obtendo-se a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Tubos de ensaio contendo 300 μL da amostra em solução etanólica e 2 mL da solução reagente (1,12 mL da solução de fosfato, 0,48 mL de molibdato, 0,40 mL de H_2SO_4) foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 90 min. A leitura das soluções das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV a 695 nm e utilizando como branco para cada amostra, 300 μL de solução estoque das mesmas e 2 mL do solvente (EtOH 70 %). Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante relativa (AAR %), sendo a capacidade antioxidante de CCE expressa em relação ao ácido ascórbico, quercetina e rutina. A equação para o cálculo da AAR% encontra-se abaixo (NEGRI et al., 2009; ZOCOLER et al., 2009).

$$\text{AAR}\% = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco amostra)}}{\text{Abs (controle positivo)} - \text{Abs(branco controle positivo)}} \times 100$$

Sendo: Abs (amostra): absorvância mensurada para as amostras; Abs (controle positivo): absorvância mensurada para os controles positivos; Abs (branco amostra): absorvância mensurada para o branco da amostra; Abs (branco controle positivo): absorvância mensurada para o branco do controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.3 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade de inibição de peroxidação lipídica foi avaliada pelo método β -caroteno/ácido linoleico descrito por Melo e Mancini Filho (1989) com algumas modificações. No preparo de CCE e do controle positivo (rutina), o mesmo procedimento foi realizado. Foram preparadas soluções estoque de 1 mg/mL em metanol e diluídas para obter as concentrações de 1000 a 31,25 μ g/mL. A emulsão contendo o β -caroteno e o ácido linoleico foi preparada adicionando a um erlenmeyer, 30 μ L de ácido linoleico, 265 μ L de Tween 40, 500 μ L de diclorometano e 100 μ L da solução β -caroteno a 10 mg/mL em diclorometano. Em seguida, a mistura passou pelo processo de evaporação completa do diclorometano em nitrogênio gasoso. No erlenmeyer, foi adicionado 30 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio durante 1h, agitou-se vigorosamente e adicionou-se água até ajustar a leitura da emulsão entre 0,6 e 0,7 de absorvância em 470 nm. Preparada a emulsão, foram adicionados 250 μ L da emulsão e 10 μ L das soluções da amostra e do controle a serem testados nos poços da microplaca (obtendo-se as concentrações finais nos poços da microplaca de 38,46 a 1,20 μ g/mL). O controle negativo foi realizado com 250 μ L desta emulsão e 10 μ L de metanol para determinar o 100% de oxidação. Todo experimento foi realizado em triplicata.

A placa foi incubada a 45 °C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β -caroteno. A absorvância foi realizada em leitor de Elisa a um comprimento de onda de 470 nm. As leituras foram obtidas em tempo zero e intervalos de 15 min até completar 120 min de reação. Os resultados foram mensurados por meio do cálculo de porcentagem de inibição, calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle negativo (A_{cn}), devendo ser menor que 0,2 para que se considere 100% de oxidação do ácido linoleico após 120 min de reação. A queda da absorvância da amostra (A_{am}) foi relacionada à queda da absorvância do controle

negativo (A_{cn}), obtendo-se a porcentagem de inibição da lipoperoxidação (%I), representada na formula abaixo. Foi avaliada a curva de oxidação entre o controle, a amostra e o controle positivo rutina, utilizando o cálculo de tangente para encontrar os valores de F1 (capacidade de bloqueio da formação de peróxidos) entre 15 e 45 min após o início da reação e F2 (capacidade de inibir outras reações durante o processo oxidativo, que produzem espécies radicalares que aceleram a oxidação) entre 75 e 90 min após início da reação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

$$A_{cn} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final} \qquad F1 = \frac{\text{tg solução } A_{am}}{\text{tg } A_{cn}}$$

$$A_{am} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

$$\%I = \frac{A_{cn} - A_{am}}{A_{cn}} \times 100 \qquad F2 = \frac{\text{tg solução } A_{am}}{\text{tg } A_{cn}}$$

Sendo: A_{cn} : absorvância mensurada para o controle negativo; A_{am} : absorvância mensurada para a amostra; Abs inicial: absorvância inicial; Abs final: absorvância final; %I: porcentagem de inibição da lipoperoxidação; Tg: tangente. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.4 Determinação da atividade antioxidante pela quantificação de malondialdeído

O Teste de determinação da peroxidação lipídica pela quantificação de malondialdeído (MDA) foi baseado no método descrito OSAWA et al. (2005) com algumas modificações. A primeira etapa baseou-se na construção da curva padrão de MDA e, a partir desta curva, foi determinada a quantidade de MDA formada após tratamento com CCE e o controle positivo rutina. A etapa seguinte baseou-se no preparo dos homogenatos contendo CCE e rutina em suas diferentes concentrações. Em um béquer, foi pesado 25 g de carne moída e adicionado 17 mL de água destilada e o extrato vegetal ou controle positivo diluídos em e 200 μ L de metanol. O homogenato foi levado a aquecimento até o aparecimento de coloração "amarronzada". O volume foi completado para 100 mL com água destilada e homogeneizado. Foram preparados 3 homogenatos nas concentrações 10, 20 e 40

µg/mL de CCE e rutina, estes foram transferidos para frascos âmbar e mantidos sob refrigeração durante os 5 dias do ensaio.

Para quantificação de MDA, foram realizadas leituras em triplicata dos dias 0, 2 e 4. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 0,5 g de homogenato, 50 µL de BHT, 2,5 mL de ácido fosfórico 1 % e 1,25 mL de TBA. As soluções foram aquecidas por 15 minutos em banho maria e em seguida submetidas a banho de gelo por 10 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 3 mL de butanol em cada tubo. Estes foram levados a centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos. Foi então retirada uma alíquota de 200 µL do sobrenadante e a absorbância lida em leitor de microplaca a 535 nm. Como controle negativo (100% de oxidação), foi utilizado o homogenato apenas com adição de metanol e no branco do experimento foi utilizada água destilada.

4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*

4.4.1 Linhagem celular e cultura

A linhagem celular em que CCE foi testada foi a linhagens J774A.1 (Macrófagos murinos). As células J774A.1 foram cultivadas em garrafas de cultura com meio RPMI-1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100 µg/mL de antibiótico (estreptomicina e penicilina), 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa à atmosfera de 5% CO₂ e à temperatura de 37 °C até o dia do ensaio.

4.4.2 Dosagem de NO em sobrenadante de células J774A.1

As células de macrófagos da linhagem J774A.1 foram transferidas para microplacas de 96 poços (2x10⁴ cel/poço) e tratadas pelas concentrações de 60, 30, 15, 7,5, 3,75 µg/mL de CCE. Em seguida foi adicionado o estímulo contendo LPS (lipopolissacaride) a 1µg/mL mais IFN-γ a 0,9 ng/mL e completado o volume para 200 µL. Como controles negativos foram utilizadas células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN-γ e células não estimuladas e tratadas apenas com DMSO 0,06% (veículo). As análises foram realizadas em triplicata. Ao final do procedimento as células foram novamente incubadas durante 48 h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

A quantidade de NO foi avaliada por meio do método de Griess, por meio da dosagem da concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) no sobrenadante de 48 h de cultura como na metodologia descrita por SUN et al. (2003). Para realização do teste, 50 µL de sobrenadante de cada poço das culturas das células estimuladas foram transferidos para placas de 96 poços, posteriormente foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de N-(1-naftil) -etileno diamina hidrocloreto, 2,5% H₃PO₄). A quantidade de NO (µM) foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. O comprimento de onda utilizado para realização da leitura foi 540 nm. O experimento foi realizado em duplicata.

4.5 Avaliação da citotoxicidade

4.5.1 Linhagem celular e cultura

As linhagens celulares em que CCE foi testada foram as células normais J774A.1 (Macrófagos murinos) e HEK (Células embrionárias de rim) e a célula tumoral HL-60 (leucemia mieloide). A linhagem celular J774A.1 foi cultivada como no item 4.7.1, enquanto que as células HEK e HL-60 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico (penicilina 100 unidades/mL e estreptomicina 100 µg/mL) e 1% de L-glutamina (2 mM). Todas as células foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ e a temperatura de 37 °C até o dia do ensaio.

4.5.2 Avaliação de viabilidade pelo ensaio de MTT

Após cultivo em garrafa, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços, foi adicionado em cada poço 100 µL de uma suspensão de células a 2x10⁵ cel/mL, totalizando assim 2x10⁴ cel/poço. Em seguida foram acrescentadas as concentrações de 60; 30; 15; 7,5 e 3,75 µg/mL de CCE e o volume final foi completado para 200 µL. Como controle negativo foi utilizado células tratadas com DMSO a 0,06% (veículo). Ao final do procedimento as células foram novamente incubadas durante 48h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C.

A citotoxicidade foi avaliada por meio da viabilidade celular por meio do ensaio de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). O ensaio para avaliação de viabilidade é baseado na redução metabólica do MTT a formazan (coloração violeta). Após o tempo de cultura de 48h, os sobrenadantes foram descartados e 100 µL de RPMI foram adicionados em todos os poços contendo as células cultivadas por 48h, em seguida 10 µL de MTT (5 mg/mL) também foram acrescentados a cada poço. A placa foi incubada a 37 °C em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de 4h a reação foi finalizada com a retirada do meio de cultura e adição de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância (Abs) foi lida a 570 nm e a viabilidade celular (%) dos macrófagos após tratamento obtido pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Abs (Amostra)}}{\text{Abs (DMSO 0,06\%)}} \times 100$$

Sendo: Abs (Amostra): Absorbância mesurada após tratamento das células com a amostra; Abs (DMSO 0,06%): Absorbância mesurada após tratamento das células com DMSO a 0,06% (veículo da amostra). O experimento foi realizado em duplicata.

4.5.3 Avaliação da morfologia e densidade celular por microscopia óptica e citotoxicidade em células J774A.1 tratadas com CCE por iodeto de propídio utilizando citometria de fluxo

A avaliação morfológica e a densidade celular de células J774A.1 foram realizadas após tratamento e incubação por 48 h com as concentrações de 60 e 30 µg/mL de CCE utilizando microscópio óptico invertido acoplado a uma câmera. Foram registradas fotografias em campos homogêneos utilizando-se a objetiva de 40X. Depois de capturada as imagens, a avaliação da influência de CCE sobre viabilidade de macrófagos murinos J774A.1 foi realizada por citometria de fluxo seguindo a metodologia de CROWLEY et al. (2016) com algumas modificações. As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células por poço em placas de 96 poços e incubadas por 48h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, foi realizada a exposição a CCE nas concentrações de 60 e 30 µg/mL por 48h, como no ensaio com o MTT (item 4.11.2). Ao final do tempo de incubação, os sobrenadantes foram descartados e

adicionou-se 200 µL de solução tampão FACS (PBS com 1% de SFB). As células aderidas em microplaca foram colocadas sobre gelo e tratadas com tripsina. As células recolhidas nas etapas anteriores foram transferidas para os tubos específicos para FACS (CORNING). A marcação foi realizada por meio da adição de 3 µL por tubo de iodeto de propídeo (10 µg/mL) 15 min antes da leitura. As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 3000 eventos foram adquiridos. As análises foram realizadas utilizando-se o software FlowJo® onde o percentual de células viáveis (sem marcação com iodeto de propídeo) foi determinado. Células tratadas apenas com RPMI e tratadas com DMSO a 0,06% foram utilizadas como controle negativo. O experimento foi realizado em duplicata.

4.6 Avaliação da atividade antifúngica

4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para diferentes estirpes de *Candida* spp.

O ensaio de susceptibilidade em microdiluição em caldo foi realizado usando o método descrito pela CLSI para determinação da CIM (CLSI, 2014). Todos os testes foram realizados utilizando caldo (CSD) e ágar Sabouraud dextrose (SDA). Estirpes de cinco espécies de *Candida* spp. foram cultivadas a 35 °C por 24 ou 48h em ágar Sabouraud Dextrose, sendo utilizadas as espécies *Candida albicans* ATCC® 24433, *Candida albicans* ATCC® 10231, *Candida glabrata* ATCC® 2001, *Candida krusei* ATCC® 6258, *Candida tropicalis* ATCC® 750.

Diluições sucessivas de 1000 a 8 µg/mL de CCE foram preparadas em microplacas de 96 poços. Para isso foram utilizadas soluções estoque de 2,5 mg/mL em DMSO 1%. Foram transferidos 80 µL dessa solução para as microplacas, que já continham 100µL de CSD. Para completar o volume final de 200µL, foram adicionados 20 µL de inóculo (10^4 unidades formadoras de colônias (UFC/mL), de acordo com a escala turbidimétrica padrão de Mc Farland, alcançando 2×10^3 UFC/mL por poço). As placas foram incubadas a 35 °C por 24h para a visualização do crescimento fúngico, com exceção da espécie *Candida tropicalis* que foi avaliada após 48h. O controle positivo utilizado foi o antifúngico fluconazol nas concentrações de 1000 a 8 µg/mL. A CIM foi calculada como a menor diluição que apresenta completa inibição da estirpe testada. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.6.2 Concentração fungicida mínima

As concentrações das amostras com caráter fungicida/ fungistático foram determinadas por uma modificação do método de Spencer e Spencer (2004). Foram retirados das microplacas, das quais se realizou a CIM, um volume de 20 µL da concentração das amostras que visualmente não apresentaram crescimento no ensaio da CIM. Estes volumes foram inoculados em placas de SDA recém-preparadas, que foram posteriormente incubadas em estufa a 35 °C durante 24h e 48 h para *C. tropicalis*. As Concentrações fungicidas mínimas (CFMs) foram tomadas como as concentrações que não apresentaram nenhum crescimento de colônias fúngicas nas placas de ágar. O ensaio foi realizado em duplicata

4.6.3 Determinação dos mecanismos de ação antifúngica

Após verificação da atividade antifúngica de CCE frente as estirpes sensíveis, foi avaliado os possíveis mecanismos de ação. Os ensaios de mecanismo de ação consistiram em avaliar a capacidade de CCE em romper a integridade do envoltório celular (extravasamento de nucleotídeos), causar danos à parede celular fúngica (ensaio de proteção do sorbitol) e capacidade de ligação a esteróides de membrana (ensaio de ligação ao ergosterol exógeno).

4.6.3.1 Ação sobre membrana por extravasamento de nucleotídeos

O experimento foi realizado de acordo com Tang et al. (2008) com algumas modificações. Para esse ensaio foi utilizado o antifúngico nistatina, que teve a sua CIM previamente mensurada para as estirpes de *Candida* spp que foram sensíveis a CCE. As estirpes foram incubadas em CSB a 35 °C durante 24h. A cultura foi então centrifugada a 1000 rpm por 5 min, lavada e ressuspensa em PBS 10 mM (pH 7,4), atingindo a densidade final de cerca de 10⁶ células/mL. As estirpes foram incubadas com CCE e nistatina (valor de CIM) em diferentes tempos (0, 1, 2, 3, 4 e 5 h); e incubadas também apenas com PBS 10 mM (pH 7,4) (controle negativo). Após a incubação, as suspensões celulares foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min e realizou-se a leitura dos sobrenadantes em uma densidade óptica de 260 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6.3.2 Ensaio de proteção do sorbitol

Após a determinação do valor de CIM para CCE, realizou-se o teste para avaliar a osmoproteção do sorbitol, de acordo com a metodologia de FROST et al. (1995). Uma microdiluição seriada foi realizada, em microplaca estéril de 96 poços, utilizando-se caldo SB enriquecido com Sorbitol 0,8 M. A solução estoque de CCE foi diluída em concentrações que variaram entre 4000 a 31,25 µg/mL. Para este ensaio foi utilizado o antifúngico fluconazol como controle, as concentrações avaliadas para esse fármaco foram de 125 a 0,97 µg/mL. Os valores de CIM foram determinados depois de incubados a 35 °C por 24h. O experimento foi realizado em duplicata.

4.6.3.3 Ensaio de ligação ao ergosterol exógeno

Para o ensaio de ligação ao ergosterol, a CIM de CCE foi determinada segundo a metodologia de LEITE et al. (2014). Foi realizada uma microdiluição seriada em uma microplaca de 96 poços, utilizando caldo SB enriquecido com ergosterol (400 µg/mL). A solução estoque de CCE foi diluída em concentrações variando entre 4000 a 31, 25 µg/mL. Para esse ensaio utilizou-se o antifúngico nistatina como controle, as concentrações deste fármaco variaram de 25 a 0,19 µg/mL. Os valores de CIM foram determinados após 24h de incubação a 35 °C. O experimento foi realizado em duplicata.

4.6.4 Ensaio sinérgico “Checkerboard”

O ensaio sinérgico entre CCE e nistatina foi realizado por meio da técnica bidimensional de concentrações em série de acordo com a metodologia descrita por Pillai et al. (2005). O teste foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços contendo CCE e nistatina em concentrações em série. As suspensões fúngicas foram preparadas para produzir inóculos finais de 2×10^3 UFC/mL. Os poços das microplacas foram preenchidos com 80 µL de CSD. Na última coluna (nº 12) adicionaram-se 100 µL de nistatina para realização da diluição seriada (25 a 0,19 µg/mL), transferindo-se sequencialmente 100 µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2. Da mesma maneira, na primeira linha (A) adicionou-se 100 µL da solução de CCE para posterior realização da diluição seriada (2000 a 15,6 µg/mL) até a linha

G. Portanto, a coluna 1 contém apenas CCE e a linha H apenas a nistatina. Adicionalmente, foram distribuídos 20 µL da suspensão fúngica em cada poço. A leitura da microplaca foi realizada após 24h de incubação a 35 °C. O “*checkerboard*” foi utilizado como base para calcular o índice de concentração inibitória fracionada (Σ CIF), que é a soma dos CIFs de ambos os agentes. Os resultados foram interpretados da seguinte forma: <0,5, sinergia; 0,5 a 1, efeito aditivo; 1-2, indiferente ou nenhum efeito; e > 2, antagonismo. As diluições testadas no índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foram baseadas no CIM das duas substâncias. O experimento foi realizado em duplicata.

$$\Sigma \text{CIFs} = \text{CIF}_{\text{CCE}} + \text{CIF}_{\text{Nistatina}}$$

$$\text{CIF}_{\text{CCE}} = \frac{\text{CIM de CCE combinada com Nistatina}}{\text{CIM CCE}}$$

$$\text{CIF}_{\text{Nistatina}} = \frac{\text{CIM da Nistatina combinada com CCE}}{\text{CIM Nistatina}}$$

Sendo: CIF_{CCE}: Concentração inibitória fracionada do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*; CIF_{Nistatina}: Concentração inibitória fracionada da nistatina; CIM: Concentração inibitória mínima; Σ CIF: Somatório das concentrações inibitórias fracionadas de ambos agentes;

Os resultados foram interpretados da seguinte forma: <0,5, sinergia; 0,5 a 1, efeito aditivo; 1-2, indiferente ou nenhum efeito; e > 2, antagonismo. As diluições testadas no índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foram baseadas no CIM das duas substâncias.

4.7 Identificação das classe e/ou substâncias químicas presentes em CCE

4.7.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

A determinação do teor de fenóis foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com pequenas modificações (DOWD,1959; FOLIN,1927). O ácido tânico foi utilizado como padrão. A curva de calibração foi preparada, com concentrações que variaram de 7,5 a 350 µg/mL de uma solução metanólica de ácido tânico (500 µg /mL). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 µL do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 µL da amostra e 100 µL de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 770 nm.

Para o doseamento de CCE foi preparada uma solução estoque a 500 µg/mL em metanol. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 µL do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 µL da amostra e 100 µL de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 770 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a média ± desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de fenóis. O conteúdo total de fenóis foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT). O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.2 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas e colaboradores (2004), com pequenas modificações. A rutina foi utilizada como padrão. A curva de calibração foi preparada, utilizando-se alíquotas de 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2 mL de uma solução etanólica de rutina (0,5 mg/mL). Adicionou-se quantidade de etanol necessária para obter 4,8 mL em cada tubo, e uma gota de ácido acético glacial. Posteriormente, adicionou-se 0,2 mL de uma solução etanólica de cloreto de alumínio 2%, totalizando 5 mL em cada tubo. O branco foi preparado da mesma forma que a amostra, porém substituindo a solução etanólica de cloreto de alumínio a 2% por etanol. Após 40 min de incubação, a 20°C e ao abrigo da luz, as absorbâncias foram medidas a 415 nm em espectrofotômetro.

Para o doseamento de CCE foi preparada uma solução estoque a 500 µg/mL em etanol. Dessa solução pipetou-se 0,2 mL para uma série de tubos de ensaio devidamente identificados e foi adicionado 4,6 mL de etanol, 1 gota de ácido acético glacial e 0,2 mL da solução etanólica de cloreto de alumínio a 2%, obtendo-se uma solução de 5 mL em cada tubo. O branco foi preparado com 0,2 mL da amostra, 1 gota de ácido acético e diluído para 5 mL com etanol. Após 40 min de incubação, a 20°C e ao abrigo da luz, as absorvâncias das soluções foram registradas em espectrofotômetro a 415 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a média ± desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de flavonoides. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de rutina (ER). O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.3 Determinação do perfil cromatográfico por “UFLC/MS” de CCE

Afim de identificar os constituintes químicos presentes em *C. coriaceum*, foram analisados 5mg de CCE por meio de cromatografia líquida de ultrarrápida acoplada a espectrometria de massas (UFLC-MS) em modo positivo $[M+H]^+$ e negativo $[M-H]^-$ utilizando um UFLC (modelo Nexera) da marca Shimadzu e espectrômetro de massas (modelo TOF Compact) e marca Bruker com fonte de ionização por “eletrospray”. A fase móvel utilizada foi o ácido fórmico, com pH =3 (fase A) e metanol (fase B), o fluxo de injeção foi de 0,4 mL/min e o tempo de corrida foi de 12 min. A coluna utilizada foi a Kinetex 2,6 µm - C18 - 100A, comprimento 100 mm X 3,0 mm, aonde foi injetado um volume de 2 µL da amostra. A corrida cromatográfica começou com 40% da fase B no tempo 0,01min, chegando até 70% de B no tempo 8,20 min e 95% de B do tempo 8,20 a 9,70 min, posteriormente a fase móvel retornou a 40% de B no tempo 10,20 min, seguindo até 11,50 min, a corrida foi encerrada em 12 min. As análises foram realizadas em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz, por meio da Plataforma de Metodologia Analítica de Farmanguinhos/FIOCRUZ..

4.8 Análise estatística

A análise estatística dos testes *in vitro* foi realizada pelo teste de ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni, por meio do programa GraphPrism 5.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antioxidante

5.1.1 Inibição do radical DPPH•

No ensaio do DPPH• os resultados foram expressos em CI_{50} (Tabela 1). Neste teste CCE apresentou CI_{50} de $1,25 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$, não apresentando diferença estatística do valor de CI_{50} encontrado para o controle positivo rutina.

5.1.2 Redução do complexo fosfomolibdênio

Em relação ao ensaio da redução complexo fosfomolibdênio (Tabela 1), a atividade antioxidante de CCE foi avaliada em relação à semelhança de atividade antioxidante (atividade antioxidante relativa, dada pela sigla AAR%) de três substâncias padrão: ácido ascórbico, quercetina e rutina. O resultado foi dado em porcentagem relativa de cada substância, sendo os valores mais próximos de 100%, considerados os mais promissores devido à alta semelhança em relação ao controle positivo. Dessa forma CCE apresentou atividade antioxidante relevante ($79,9 \pm 2,7$ de AAR% a quercetina, $128,3 \pm 4,3$ de AAR% a rutina e $27,3 \pm 0,9$ de AAR% ao ácido ascórbico), visto que alcançou altos níveis de semelhança aos padrões rutina e quercetina. A atividade antioxidante apresentada por CCE revelou ser estatisticamente mais eficiente que o controle rutina em relação ao ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio.

5.1.3 Inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico

No ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico estão representados os resultados da porcentagem de inibição de CCE e de rutina na maior concentração utilizada, $38,5 \mu\text{g/mL}$, junto também da sua eficiência antioxidante (F1 e F2) (Tabela 1 e Figura 9). Os resultados demonstram que CCE apresentou uma porcentagem de inibição da oxidação do ácido linoleico promissora, ao inibir cerca de $39,2 \pm 3,8\%$ da peroxidação deste ácido graxo, este dado indicou uma maior inibição da peroxidação lipídica por CCE quando comparado ao controle positivo rutina ($p < 0,05$). Já os valores

de F1 e F2 foram considerados estatisticamente semelhantes, quando comparados o extrato CCE e rutina. A Figura 10 também demonstra a uma maior eficiência antioxidante de CCE em relação a rutina, ao preservar a coloração do β -caroteno no comprimento de onda de 470nm ao longo do tempo de 120 min ($p < 0,05$).

Tabela 1- Avaliação da atividade antioxidante de CCE frente aos métodos de DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico. CCE, Extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. CI_{50} , concentração inibitória de 50%. a, indica que não houve diferença estatística entre os valores de CI_{50} para CCE e o controle positivo rutina. b, indica um menor efeito antioxidante em relação aos controles positivos rutina e ácido ascórbico. c, indica um maior efeito antioxidante em relação ao controle positivo rutina. d, indica diferença estatística entre CCE e controle positivo rutina (Maior concentração), demonstrando uma maior eficiência de CCE em relação à inibição da peroxidação do ácido linoleico pelo teste do β -caroteno/ácido linoleico. e, indica que não houve diferença estatística entre CCE e rutina em relação ao bloqueio de radicais livres formados na primeira fase da lipoperoxidação (valor de F1). f, indica que não houve diferença estatística entre CCE e rutina em relação ao bloqueio de radicais livres formados na segunda fase da lipoperoxidação (valor de F2). g, indica diferença estatística entre F1 e F2 em ambos CCE e rutina, indicando preferência entre as amostras em agirem na primeira fase da lipoperoxidação. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

Amostras	DPPH - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Complexo fosfomolibdênio			β -caroteno/ácido linoleico (38,46 $\mu\text{g/mL}$)		
		% relativa quercetina	% relativa rutina	% relativa ác. ascórbico	Inibição (%)	F1	F2
CCE	1,25 \pm 0,06 ^a	79,9 \pm 2,7 ^b	128,3 \pm 4,3 ^c	27,29 \pm 0,9 ^b	39,2 \pm 3,8 ^d	0,42 \pm 0,094 ^{e,g}	1,14 \pm 0,036 ^{f,g}
Rutina	0,037 \pm 0,0092 ^a	-----	-----	-----	25,2 \pm 0,9 ^d	0,59 \pm 0,009 ^{e,g}	1,63 \pm 0,32 ^{f,g}

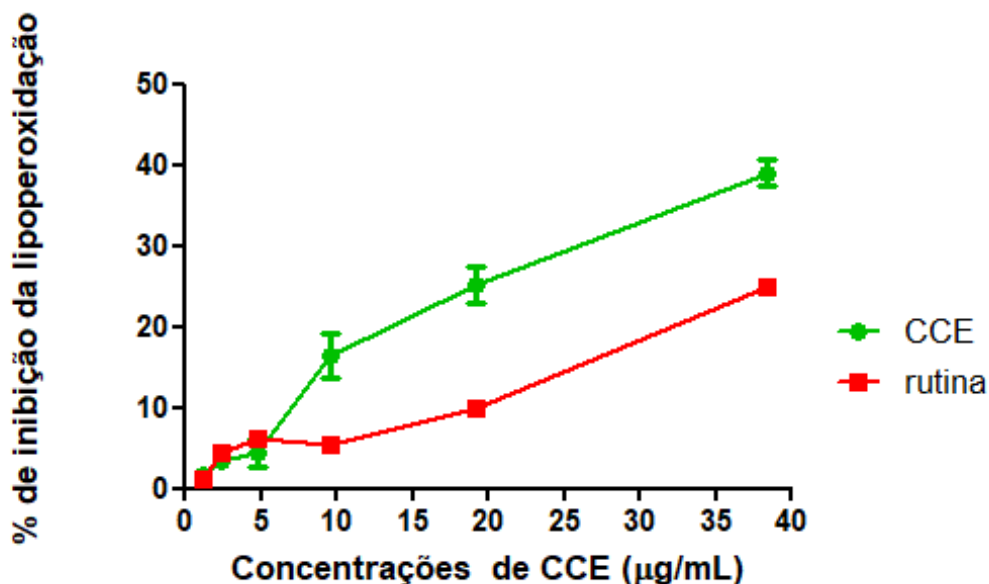


Figura 9- Porcentagem de inibição da lipoperoxidação das concentrações de 38,5 a 1,2 µg/mL do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* e do controle positivo rutina. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. CCE, Extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*.

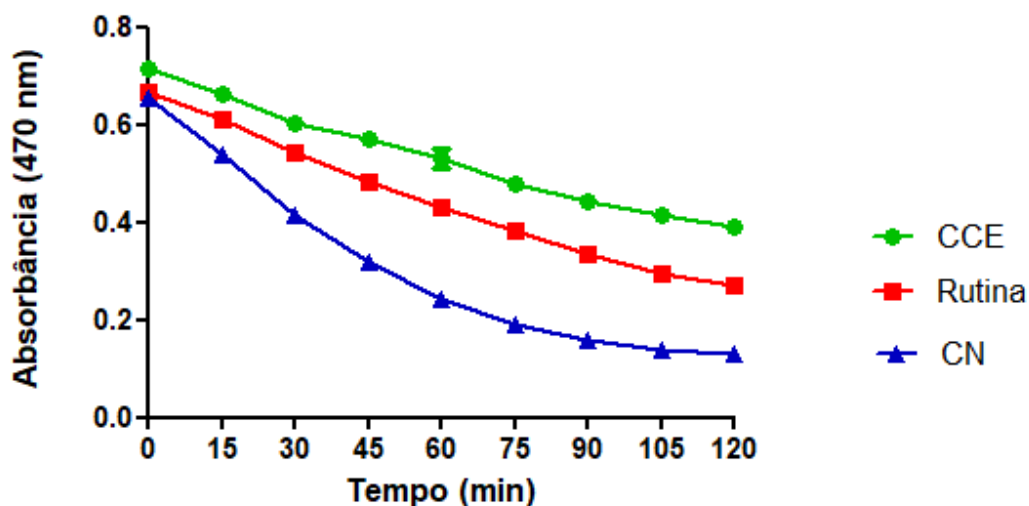


Figura 10- Perfil de decaimento da absorbância do β -caroteno (Curva de oxidação) avaliada em 470 nm, demonstrando a preservação de sua coloração ao longo de 120 minutos de reação quando utilizado o extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* e o controle positivo rutina. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. CCE, Extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. CN, Controle negativo

5.1.4 Avaliação da atividade antioxidante pela quantificação de malondialdeído

A fim de corroborar com o modelo de inibição do β -caroteno foi realizado o ensaio de quantificação de malonaldeído (MDA), um dos principais produtos do estresse oxidativo em lipídeos. Nesse ensaio a formação de MDA foi acompanhada durante os dias 0, 2 e 4 utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), uma molécula que se complexa com o malondialdeído e dá origem a uma coloração avermelhada. Os resultados encontrados demonstram que CCE conseguiu reduzir de forma significativa ($p < 0,05$) a formação de malondialdeído a partir do segundo dia de tratamento (Figura 11), não havendo diferença estatística entre as concentrações de 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ nos dias de tratamento específico. O controle rotina mostrou resultados similares a CCE (diferença estatística apenas na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ no último dia de ensaio) em relação à inibição da formação de malondialdeído.

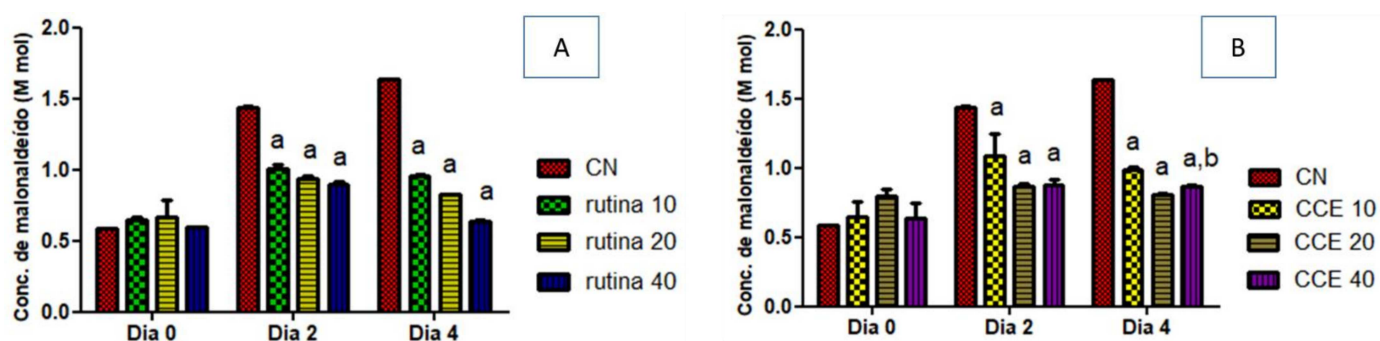


Figura 11- Inibição da produção de malondialdeído após tratamento com o controle positivo rutina (A) e do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* (B). CN, Controle negativo que sofreu 100% da oxidação durante os cinco dias de tratamento. CCE, Extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. a, Diferença estatística em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). b, Diferença estatística apenas na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ no último dia de ensaio. Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

5.2 Atividade anti-inflamatória

5.2.1 Redução de NO em sobrenadante de células J774A.1

Foi avaliada a atividade anti-inflamatória *in vitro* pela dosagem de NO (μM) no sobrenadante de macrófagos J774A.1, que foram previamente tratados com as amostras em suas diferentes concentrações e estimulados com LPS e com INF- γ . Os resultados encontrados demonstraram que CCE conseguiu reduzir significativamente ($p < 0,05$) a concentração de NO em todas as concentrações avaliadas (Figura 12), sendo as concentrações de 30; 15; 7,5 e 3,75 $\mu\text{g/mL}$ consideradas estatisticamente iguais ($p > 0,05$). CCE inibiu 81,54 e 62,41% da produção de NO nas concentrações de 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

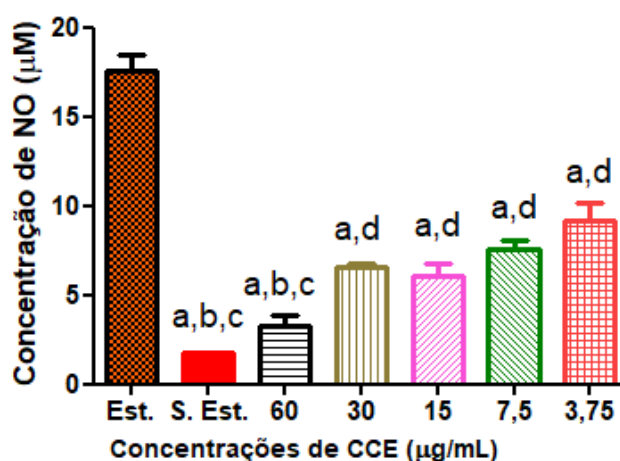


Figura 12 - Atividade anti-inflamatória das diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* por meio da redução de óxido de nítrico. Produção de óxido nítrico por células estimuladas com INF- γ e com LPS e cultivadas com RPMI + DMSO 0,06% (Est.). Produção de óxido nítrico por células sem estímulo e cultivadas apenas com meio RPMI + DMSO 0,06% (S. Est.). Células tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* (60; 30; 15; 7,5 e 3,75 $\mu\text{g/mL}$) a, Diferença estatística em relação às células estimuladas com INF- γ e com LPS e cultivadas com RPMI + DMSO 0,06% ($p < 0,05$). b, Diferença estatística em relação às células tratadas com as concentrações de 30; 15; 7,5 e 3,75 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. c, indica que não houve diferença estatística entre as células sem estímulo (S. Est.) e as células tratadas com a concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. d, indica que não houve diferença estatística entre as concentrações de 30; 15; 7,5 e 3,75 $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* ($p > 0,05$). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes. ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

5.3 Avaliação da citotoxicidade

5.3.1 Avaliação da atividade citotóxica em células normais e tumorais pelo ensaio do MTT

A citotoxicidade celular foi avaliada nas linhagens normais J774A.1 (macrófagos murinos) e HEK (células embrionárias de rim) e na linhagem tumoral HL-60 (células de leucemia mieloide). A avaliação da atividade citotóxica na linhagem de macrófagos J774A.1 demonstrou que nenhuma das concentrações avaliadas para CCE reduziu significativamente a viabilidade das células J774A.1 e nem das células HEK. Já para a linhagem HL-60 as concentrações de 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$ de CCE mostraram uma baixa toxicidade, porém significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle tratado apenas com DMSO 0,06% (Figura 13). A viabilidade celular para a linhagem HL-60 foi 61,53 e 66,32 % quando tratada com as concentrações de 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$ de CCE respectivamente.

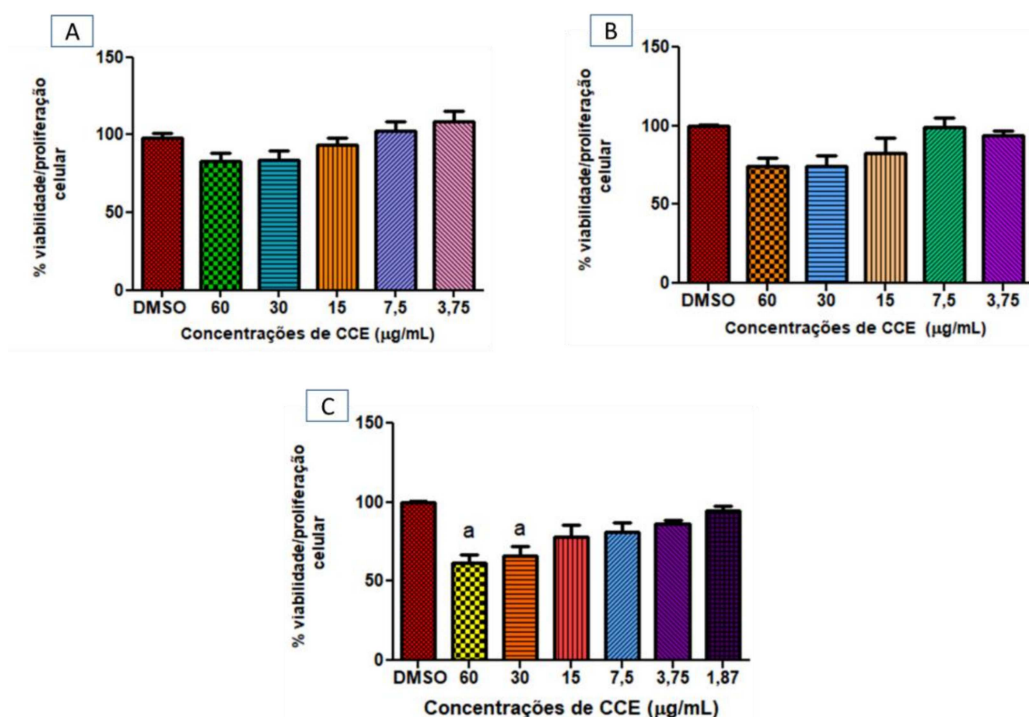


Figura 13- Avaliação da citotoxicidade celular em macrófagos da linhagem J774A.1 (A), células embrionárias de rim da linhagem HEK (B) e células de leucemia mieloide da linhagem HL-60 (C) tratadas com o extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. a, Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo tratado apenas com o veículo das amostras (DMSO 0,06%). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes. ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

5.3.2 Avaliação morfológica e da densidade celular por microscopia óptica e atividade citotóxica por marcação com iodeto de propídeo utilizando citometria de fluxo em células J774A.1

A análise qualitativa por microscopia óptica não demonstrou alterações significativas na morfologia e densidade celular das células J774A.1 tratadas com as concentrações de 60 e 30 µg/mL de CCE, sendo o perfil celular semelhante entre os grupos tratados com o extrato e não tratados (RPMI e com DMSO a 0,06%) (Figura 14). Para comprovar a citotoxicidade de CCE para a linhagem celular de macrófagos, foi realizada a citometria de fluxo das concentrações de 60 e 30 µg/mL utilizadas no tratamento (Figura 15) por meio de marcação com iodeto de propídeo (IP). Embora tenha sido observada uma diferença estatística em relação aos controles negativos tratados apenas com meio RPMI e DMSO 0,06%, os resultados encontrados apresentaram correlação positiva com os observados pelo método do MTT. A baixa toxicidade de CCE nas concentrações de 60 e 30 µg/mL (72,91 e 84,08 % de células viáveis) também pode ser visualizada na Figura 16 (quadrante direito), aonde é observado uma pequena população de células marcadas positivamente para IP.

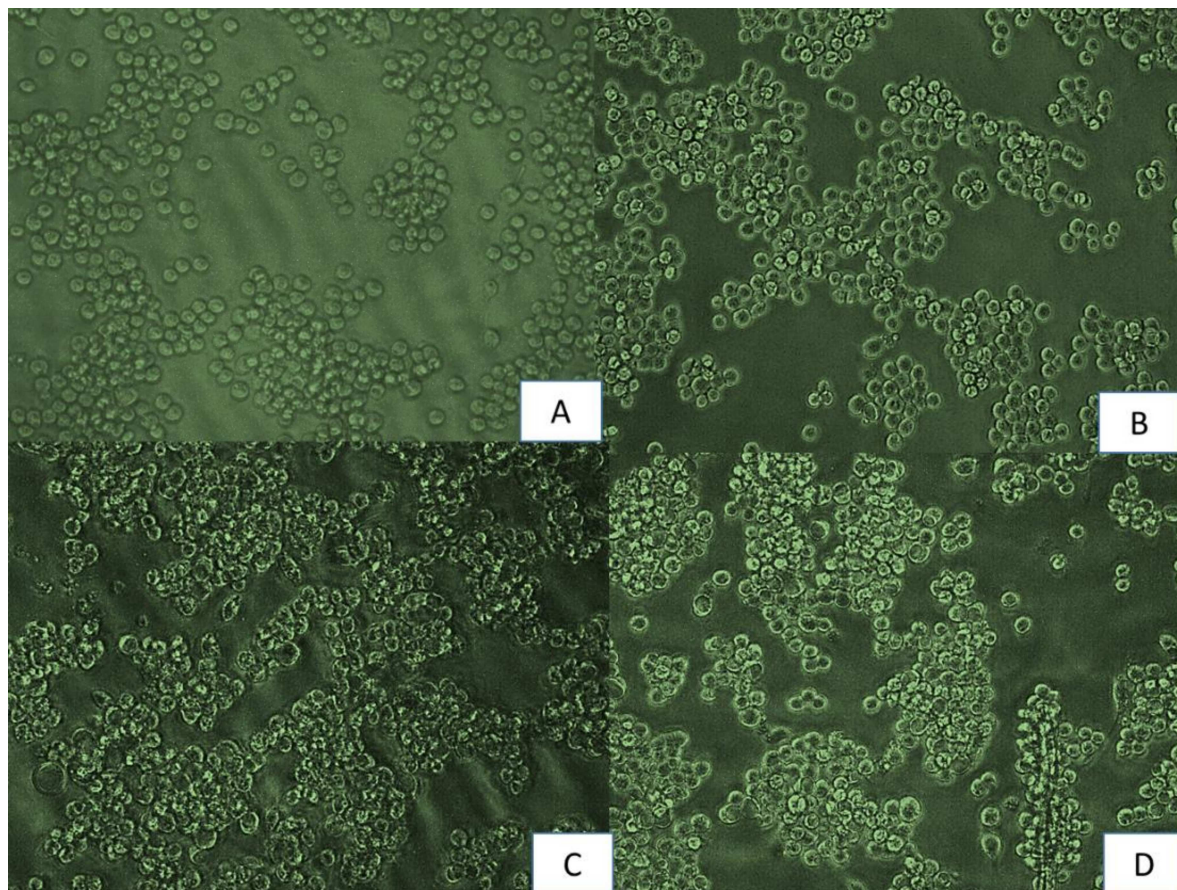


Figura 14 – Aspectos morfológicos e densidade celular de macrófagos da linhagem J774A.1 tratadas com extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. Aumento de 40X. (A) Células cultivadas apenas com meio de cultura RPMI e sem tratamento. (B) Células cultivadas com meio de cultura RPMI acrescido de 0,06% de DMSO (Veículo das amostras). (C) Células tratadas com a concentração de 60 µg/mL do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. (D) Células tratadas com a concentração de 30 µg/mL do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*.

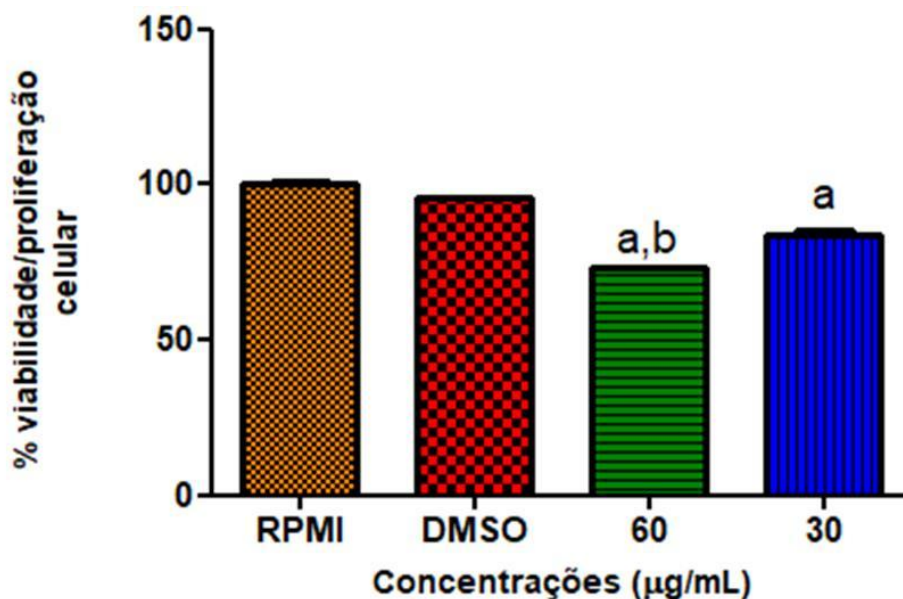


Figura 15- Avaliação do perfil de citotoxicidade celular em macrófagos da linhagem J774A.1 tratados com o extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* nas concentrações 60 µg/mL e 30 µg/mL avaliada por iodeto de propídeo como marcador utilizando citometria de fluxo. Células cultivadas apenas com meio de cultura RPMI e sem tratamento. Células cultivadas com meio de cultura RPMI acrescido de 0,06% de DMSO (Veículo das amostras). Células tratadas com a concentração de 60 µg/mL do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* e células tratadas com a concentração de 30 µg/mL do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. a, Diferença estatística em relação aos controles tratados com RPMI e RPMI com DMSO a 0,06% ($p < 0,05$). b, Diferença estatística em relação à concentração de 30 µg/mL do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* ($p < 0,05$). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes. ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

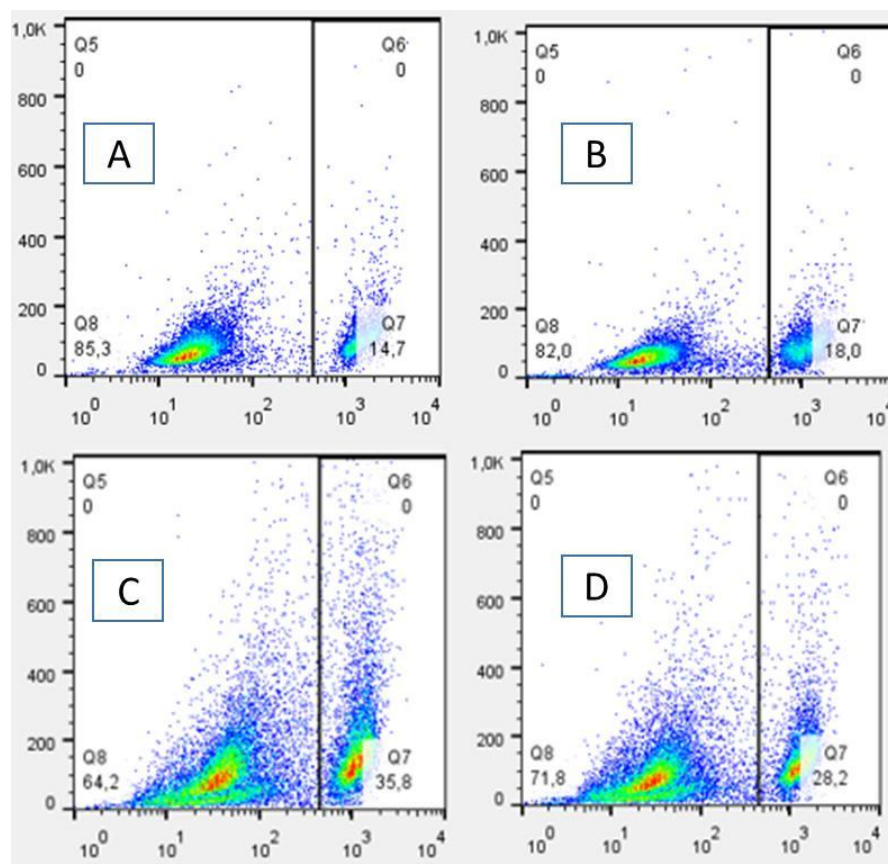


Figura 16 – Perfil de células viáveis e células inviáveis marcadas com iodeto de propídeo após tratamento com as concentrações de 60 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. (A) Células cultivadas apenas com meio de cultura RPMI e sem tratamento. (B) Células cultivadas com meio de cultura RPMI acrescido de 0,06% de DMSO (Veículo das amostras). (C) Células tratadas com a concentração de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*. (D) Células tratadas com a concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum*.

5.4 Avaliação da atividade antifúngica

5.4.1 Concentração inibitória mínima (CIM) para diferentes estirpes de *Candida* spp.

A triagem realizada para 5 estirpes de leveduras do gênero *Candida* spp. demonstrou que CCE apresentou atividade antifúngica para a espécie *Candida grablata* (Tabela 2) com valor de CIM igual a 1000 µg/mL. Esta avaliação revelou que a inibição de CCE no valor de CIM, não possui efeito fungicida, mas sim, um caráter fungistático (CIM ≠ CFM). Neste estudo não foi possível encontrar a concentração fungicida mínima, uma vez que concentrações maiores que 1000 µg/mL não foram pesquisadas.

Tabela 2 – Resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica para as leveduras do gênero *Candida* spp. após exposição ao extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* e ao controle positivo fluconazol.

Micro-organismo.	CCE	Fluconazol
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	>1000 µg/mL	31,25 µg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>1000 µg/mL	>1000 µg/mL
<i>Candida grablata</i> ATCC 2001	1000 µg/mL	31,25 µg/mL
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	>1000 µg/mL	250 µg/mL
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	>1000 µg/mL	15,62 µg/mL

5.4.2. Determinação dos mecanismos de ação antifúngico

5.4.2.1 Ação sobre membrana por extravasamento de nucleotídeos

Diante da possibilidade de elucidar o mecanismo de ação antifúngico de CCE para *C. grablata*, foi realizado o ensaio de ação sobre membrana por extravasamento de nucleotídeos, que mede o aumento da absorbância em 260 nm devido ao aumento de nucleotídeos no meio extracelular. Os resultados

demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) da absorvância em 260 nm das células tratadas com CCE (3h em diante) e nistatina (1h em diante) no valor da CIM (1000 e 0,78 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) quando comparado ao controle de crescimento (CC) (Figura 17).

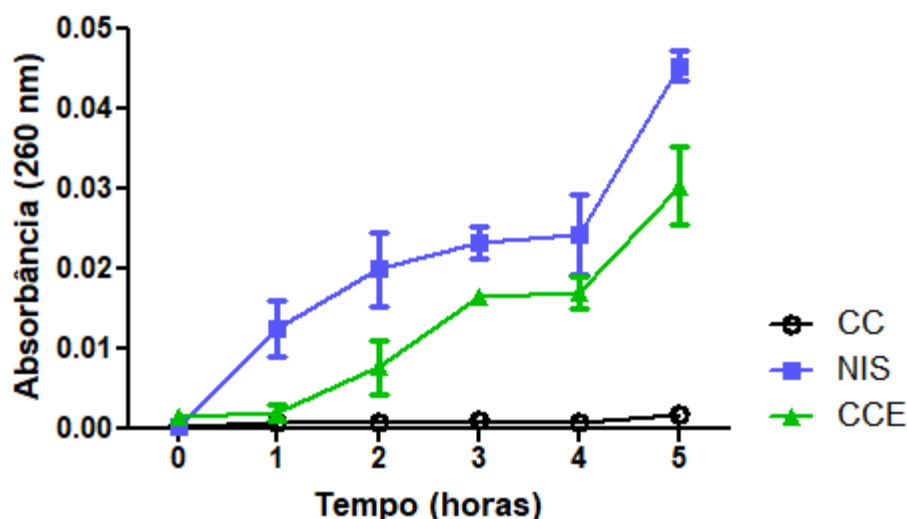


Figura 17 – Ensaio de extravasamento de nucleotídeos mostrando um aumento da absorvância em 260nm, em sobrenadante de células tratadas com o extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* (CCE) e nistatina (NIS), quando comparados em relação ao controle de crescimento não tratado (CC). Resultados expressos na forma de média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni.

5.4.2.2 Avaliação de danos à parede celular fúngica e da capacidade de ligação a esteroides de membrana

Após a confirmação da atividade antifúngica de CCE para a *Candida glabrata*, foi realizado o mecanismo de ação para essa espécie. Foram investigados os possíveis mecanismos de ação antifúngico em envoltório celular através da avaliação em danos na parede celular por meio do uso de sorbitol a 0,8M suplementado em meio de cultura e da capacidade de ligação em esteroides de membrana fúngica utilizando ergosterol exógeno suplementado a 400 $\mu\text{g/mL}$ em meio de cultura. Foram encontrados resultados promissores em relação à atividade antifúngica devido a um aumento da CIM para *Candida glabrata* frente a CCE tanto para o ensaio de sorbitol quanto para ergosterol, indicando dessa forma um resultado positivo quanto a ação em envoltório celular fúngico. Ambos os valores da CIM para os dois ensaios apresentaram valores maiores que 4000 $\mu\text{g/mL}$. O valor da CIM para nistatina no

ensaio de ligação ao ergosterol aumentou de 0,78 para 3,12 µg/mL, enquanto o fluconazol utilizado no ensaio do sorbitol manteve o mesmo valor de CIM (31,25 µg/mL).

5.4.3 Ensaio sinérgico “Checkerboard”

A fim de identificar um efeito sinérgico entre CCE e nistatina, o ensaio de *checkboxboard* foi realizado. Os resultados encontrados mostraram grande relevância. Através da combinação entre o extrato etanólico e o antifúngico padrão, o valor da CIM da nistatina foi reduzido para 0,39 µg/mL (Valor da CIM quando testado sozinho = 0,78 µg/mL), enquanto que o valor da CIM para CCE foi reduzido para 62,5 µg/mL (Valor da CIM quando testado sozinho = 1000 µg/mL). Estes achados demonstraram que CCE e nistatina apresentam um efeito aditivo quando combinados ($\Sigma\text{CIF} = 0,5625$).

5.5 Identificação das classe e/ou substâncias químicas presentes em CCE

5.5.1 Teor de fenóis e flavonoides totais

A análise de teor de fenóis em CCE equivalentes em ácido tânico revelou a presença dessas substâncias na composição deste extrato. Os resultados demonstraram que mais de 10% da composição total de CCE é representado por substâncias fenólicas (138, 20 ± 11,88 mg/g). A análise fitoquímica do teor de flavonoides, revelou por sua vez, uma correlação positiva com o teor de fenóis, visto que demonstrou a presença destes fitoconstituintes (127, 26 ± 0,53 mg/g). A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o teor de fenóis e flavonoides totais.

5.5.2 Análise química de CCE por *UFLC-MS*

O perfil cromatográfico de CCE demonstrou 6 sinais, dos quais os espectros de UV observados nos sinais 4 e 5 sugerem a presença de flavonoides em sua composição, reforçando os resultados encontrados anteriormente para o teor de flavonoides (Figura 18). A análise por *UFLC/MS* ainda revelou a presença de uma

terceira substância (Sinal 2) que pelo espectro UV não aparenta ser uma estrutura aromática.

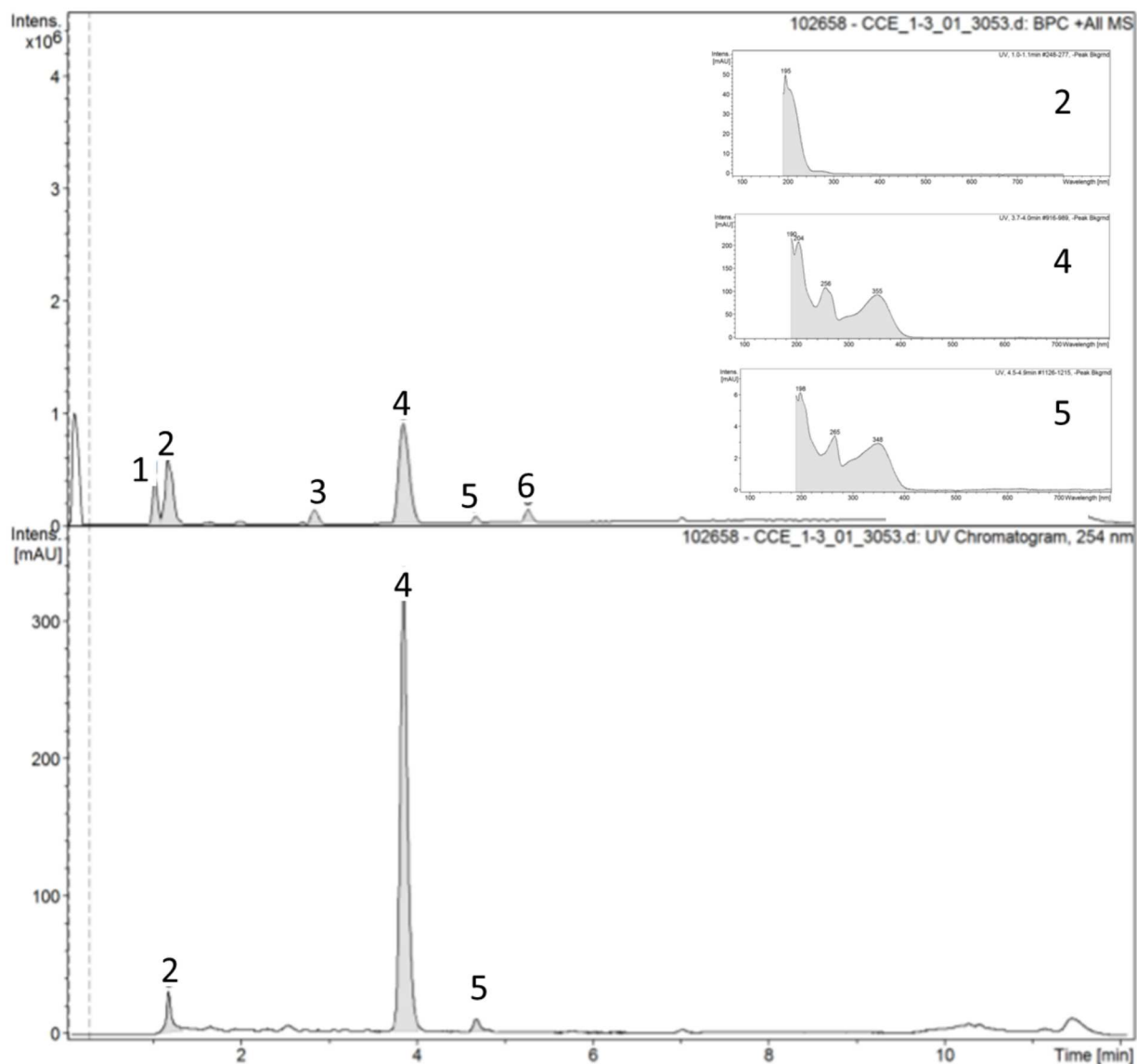


Figura 18 - Perfil cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* analisado por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massas.

A substância **4** (sinal majoritário) demonstrou tempo de retenção de 3,8 min e UV com λ_{\max} em 256 e 355 nm, além de fragmentos de massa em m/z 611,1592 $[M+H]^+$, m/z 465,1013 $[M+H-146]^+$ e m/z 303,0491 $[M+H-308]^+$ por ESI+ e 609,1445 $[M-H]^-$ e m/z 463,0864 $[M-H-146]^-$ em ESI- (Anexo I). Já a substância **5** apresentou tempo de retenção em 4,7 min e UV com λ_{\max} em 265 e 348nm, além de fragmentos de massa em m/z 595,1643 $[M+H]^+$, m/z 449,1060 $[M+H-146]^+$ e m/z 287,0584 $[M+H-308]^+$ por ESI+ e m/z 593,1483 $[M-H]^-$ e m/z 447,0912 $[M-H-146]^-$ por ESI- (Anexo II).

A substância **2** (segundo sinal majoritário) apresentou tempo de retenção em 1,2 min, UV com λ_{max} em 195 nm e fragmentos de massa em m/z 365,1051 $[M+Na]^+$, m/z 203,0525 $[M+Na-162]^+$ e m/z 138,0551 $[m/z$ 203- 65] $^+$ por ESI+ e m/z 377,0844 $[M+Cl_{35}]^-$, m/z 341,1074 $[M-H]^-$, m/z 215,0339 $[M + Cl_{35}-162]^-$ e m/z 179,0579 $[M-H-162]^-$ por ESI- (Anexo III).

6 DISCUSSÃO

Diante da necessidade de novas terapias para as patologias mencionadas neste estudo, foram exploradas as propriedades terapêuticas e a constituição química de *C. coriaceum*, uma espécie que possui escassez de estudos. Em relação à atividade antioxidante, CCE apresentou atividades promissoras em todos os métodos avaliados. O DPPH é um radical orgânico estável e que apresenta um átomo de nitrogênio em sua estrutura, apresenta coloração violeta e absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de uma substância doadora de hidrogênio, esse radical é reduzido (coloração amarela) e a intensidade de sua absorção diminui (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; KEDARE e SINGH, 2011). Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior é a sua atividade antioxidante, a análise realizada demonstrou que CCE apresentou resultado promissor para inibir 50% deste radical, uma vez que não foi observada diferença estatística em relação ao controle positivo rotina.

No ensaio do complexo fosfomolibdênio, a presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante faz com que haja a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio, caracterizado pela redução do complexo fosfomolibdênio (ORHAN et. al., 2006; MALAFRONTTE et al., 2009). Os resultados encontrados nesse ensaio confirmam os do ensaio DPPH, mostrando que CCE regula essa atividade antioxidante, conseguindo, assim, reduzir o complexo fosfomolibdênio.

A oxidação do ácido linoleico, por sua vez, produz radicais livres devido à remoção de átomos de hidrogênio de seu grupo metileno. Esses radicais livres irão oxidar o β -caroteno, um composto que é altamente insaturado, promovendo a degradação de sua coloração. No entanto, a presença de substâncias antioxidantes pode impedir o descolorimento do β -caroteno devido a sua capacidade de neutralizar tais radicais livres, conservando assim a sua coloração alaranjada (HATAMI et al., 2014). Este dado foi observado pela curva de decaimento, na qual é mostrada a conservação da absorbância do β -caroteno quando tratado com CCE e o controle rotina. Estes resultados corroboram com a inibição da peroxidação do ácido linoleico observada neste trabalho, onde CCE demonstrou ser significativamente melhor que o controle positivo rotina em bloquear os radicais livres formados.

No processo de peroxidação lipídica, a presença de radicais livres leva a formação de radicais lipídicos, que na presença de oxigênio molecular irão formar o radical lipídico peroxil ($\text{LOO}\cdot$). Este radical pode interagir com um átomo de hidrogênio

de outro ácido graxo vizinho e formar um segundo radical lipídico, que são os peróxidos (LOOH). Os peróxidos são passíveis de decomposição e dão origem aos aldeídos, substâncias reativas que também são responsáveis por causar danos celulares (YADAV e RAMANA, 2013). O teste do β -caroteno/ácido linoleico nos permite coletar dados adicionais em relação ao bloqueio da peroxidação lipídica. Por meio desse ensaio é possível calcular os valores de F1 e F2 que conseguem avaliar a capacidade antioxidante dos fitoconstituintes em agirem no bloqueio dos radicais peróxidos formados na etapa de propagação ou de agirem em outras espécies radicalares na etapa terminal da peroxidação lipídica (produtos da decomposição dos peróxidos) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). O valor de F1 demonstra que CCE possui maior capacidade em bloquear a formação de radicais peróxidos do que as outras espécies radicalares formadas na fase terminal da peroxidação lipídica (valor de F2 muito próximo de 1), um dado que também foi observado para o controle rotina.

Como descrito anteriormente, o processo de lipoperoxidação gera como produtos os aldeídos, dentre eles o malondialdeído, uma molécula que tem sido usada durante muitos anos como biomarcador da peroxidação lipídica (AYALA, MUÑOZ e ARGÜELLES, 2014). O bloqueio da formação de malondialdeído foi verificado por meio da complexação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico. Como pode ser observado, CCE apresentou uma atividade promissora ao bloquear a formação de malondialdeído durante o processo de oxidação a partir do segundo dia de ensaio. As substâncias químicas presentes em CCE podem ser as responsáveis por essa bioatividade, visto que substâncias químicas de origem vegetal são conhecidas pela capacidade de eliminar a produção de radicais livres, interrompendo assim o dano oxidativo progressivo e a produção dos aldeídos, que são responsáveis por causar danos a lipídeos de membrana (BREWER, 2011; AYALA, MUÑOZ e ARGÜELLES, 2014).

Por outro lado, também temos a atividade anti-inflamatória, em que foi encontrada uma significativa redução de NO por CCE para todas as concentrações. Neste ensaio, não foi observada diferença estatística entre a concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ e as células sem estímulo, o que sugere a redução de NO a valores quase basais quando utilizada esta concentração. Foi constatado também, que as demais concentrações exibiram resultados promissores indicando que não há diferença na produção de NO entre as células tratadas com a concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ ou com a concentração de 3,75 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados são encorajadores, uma vez que o NO

é uma molécula de sinalização que desempenha um papel fundamental na patogênese da inflamação, sendo considerado um mediador pró-inflamatório (SHARMA, AL-OMRAN e PARVATHY, 2007). Desta forma, a descoberta de novas plantas medicinais que possam ser usadas em terapias anti-inflamatórias pode ser considerada de grande relevância, uma vez que alguns dos fármacos anti-inflamatórios disponíveis no mercado, como os AINEs, podem aumentar o risco de complicações gastrointestinais e cardiovasculares (SOSTRES et al., 2010).

As terapias medicamentosas ideais são aquelas que são efetivas e não apresentam ou tenham baixa toxicidade às células do organismo humano (PICCOLO, MENALE e CRISPI, 2015). Com o intuito de investigar tal propriedade, o ensaio de citotoxicidade celular em células normais e tumorais foi realizado. O percentual de viabilidade aceitável foi determinado de acordo com a ISO10993-5 (2009), a qual estabelece que na investigação de citotoxicidade de substâncias *in vitro*, a viabilidade celular não deve ser reduzida para valores inferiores a 70%. Assim foi possível observar que CCE não reduz a viabilidade de células normais, um fato que foi comprovado pela viabilidade acima de 70% para todas as concentrações por meio da técnica de MTT e pelo uso da citometria de fluxo e microscopia (concentrações de 60 e 30 µg/mL), enquanto apresenta uma baixa toxicidade, porém significativa, para a linhagem de células leucêmicas HL-60.

O câncer é uma patologia que possui altas taxas de mortalidade e incidência, levando a 17,5 milhões de casos em todo o mundo e 8,7 milhões de mortes apenas no ano de 2015 (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2017). Dentre os tipos de cânceres, temos a leucemia mieloide, uma malignidade hematológica caracterizada por uma alta diversidade de anomalias genéticas e epigenéticas. Estima-se que, no Brasil, essa patologia possua alta prevalência, chegando a cerca de 8000-9000 novos casos por ano (YU e ZHENG, 2017; DATOGUIA et al., 2018). Isto torna relevante, a pesquisa de novos fármacos que possam atuar contra células tumorais com alta potência e baixa toxicidade as células normais adjacentes, já que os agentes quimioterápicos convencionais causam graves efeitos adversos nas células e tecidos normais, além de gerar resistência pelas células cancerígenas (CHEN et al., 2014). Além disso, a pesquisa de compostos fitoquímicos que possuam atividade antitumoral e anti-inflamatória tem ganhado destaque, uma vez que essas substâncias também conseguem inibir enzimas e

mediadores pró-inflamatórios que estão amplamente associados ao processo inflamatório crônico e formação de tumores (MADKA e RAO, 2013).

Em relação à atividade antifúngica, também foram encontrados resultados promissores. A triagem antifúngica revelou que CCE apresenta atividade inibitória para *C. glabrata*, uma estirpe que embora seja considerada de baixa virulência, possui uma taxa maior de mortalidade que *C. albicans*, representando aproximadamente 15-20% de todas as infecções em países como os Estados Unidos, além disso, essa espécie tem sido considerada a espécie mais comum de *Candida* não-*albicans* isolada em pacientes (SAVASTANO et al., 2016). Outro fato importante, é o aumento da resistência em isolados de *C. glabrata* que surgiram nos últimos anos (WHALEY e ROGERS, 2016). Um fator, que somado as altas taxas de morbidade e mortalidade causadas por doenças fúngicas e ao atual arsenal antifúngico reduzido e a drogas de alta toxicidade, torna importante a descoberta de novas terapias que possam vir a ter menos efeitos adversos (SCORZONI et al., 2017).

Além disso, o uso crescente de agentes antifúngicos como os azólicos e equinocandinas, tem aumentado o surgimento de cepas multirresistentes de *Candida* spp. Isto exige a busca de novas terapias medicamentosas e inclui os fitocompostos como fontes promissoras de novos fármacos (PERLIN, SHOR e ZHAO, 2015). Outra solução para o controle das doenças fúngicas causadas por espécies de *Candida* spp. resistentes é o uso de terapias combinadas, uma estratégia em potencial para o tratamento das micoses (MUÑOZ et al., 2014). A terapia combinada tem muitas vantagens em comparação com o uso de agentes individuais, uma vez que tal estratégia pode ser usada para prevenir o surgimento de organismos resistentes e ainda minimizar a toxicidade dos fármacos utilizados devido à necessidade de menores concentrações para obter o efeito inibitório (LEMOS et al., 2018). Desta forma, a potencialização encontrada para CCE e nistatina no ensaio de “checkerboard” pode ser promissor, sendo a associação entre o extrato etanólico de folhas de *C. coriaceum* e nistatina, uma possível estratégia futura para o tratamento de micoses ocasionadas por *Candida glabrata*.

Na tentativa de elucidar o possível mecanismo de ação de CCE, foram realizados os ensaios de ação sobre membrana por extravasamento de nucleotídeos para avaliar lise de membrana, bioensaio de proteção com sorbitol para avaliar danos em parede celular e bioensaio com ergosterol exógeno para avaliar a capacidade de se ligar a esteroides de membrana. A estrutura celular fúngica é composta por uma

membrana plasmática cercada por uma parede celular complexa, que são estruturas vitais para proteger organismos fúngicos do ambiente e regular a entrada/saída de moléculas essenciais para o crescimento da célula (FEOFILOVA, 2010).

Os nucleotídeos são moléculas que absorvem no comprimento de onda de 260 nm, sugerindo que, um aumento de absorbância em 260nm no meio extracelular ao decorrer do tempo pode ser devido a presença destas substâncias (KHAN, AHMAD e CAMEOTRA, 2013). Além disso, os nucleotídeos estão localizados em compartimentos intracelulares e, desta forma, o seu extravasamento é um indício de lesão celular devido a ruptura de membrana (CAMPOS et al., 2018). O resultado encontrado para CCE mostra um aumento de nucleotídeos no meio extracelular, o que sugere que CCE pode levar a liberação destas moléculas devido a ruptura da membrana fúngica.

Já o sorbitol tem uma função osmoprotetora e é essencial para o crescimento de fungos (FROST et al., 1995). Células fúngicas com comprometimento da parede celular não podem crescer na ausência de sorbitol devido à perda de sua regulação osmótica, entretanto, o seu crescimento ainda é possível se o sorbitol for suplementado ao meio de cultura. Desta forma, inibidores da parede celular fúngica podem ser identificados quando os valores da CIM obtidos com sorbitol são maiores do que aqueles em sua ausência, uma vez que a osmolaridade das células é conservada pelo sorbitol e isto permite o seu crescimento mesmo na presença do fármaco antifúngico, o que leva a necessidade de maiores concentrações dos agentes antifúngicos para desencadear seus efeitos (FROST et al., 1995). De fato, os valores da CIM de CCE para *C. glabrata* aumentaram quando testada novamente na presença de meio contendo sorbitol a 0,8M, indicando assim uma possível ação do extrato na parede celular fúngica.

Abaixo da parede celular é encontrada a membrana fúngica, uma estrutura onde estão ancorados esteroides, dentre eles o ergosterol. O ergosterol é um lipídeo de membrana fúngica responsável por características físicas importantes da membrana plasmática e a sua ausência/lesão causa alterações na sua permeabilidade (IWAKI et al., 2008). Se o agente antifúngico possuir a atividade de ligar-se ao ergosterol, a presença de ergosterol exógeno irá evitar a ligação ao ergosterol da membrana, resultando em um aumento na CIM da substância (LEITE et al., 2014). Ao realizar novamente a determinação da CIM na presença de ergosterol

foi encontrado um aumento no seu valor, sugerindo a capacidade dos constituintes presentes no extrato etanólico de *C. coriacea* de se ligarem ao ergosterol fúngico.

De forma a correlacionar os fitoconstituintes presentes em CCE com suas bioatividades foram realizados alguns ensaios químicos. O primeiro ensaio realizado demonstrou que CCE possui fenóis e de flavonoides em sua composição. Além disso, o teor de fenóis encontrados está estreitamente relacionado com o teor de flavonoides, sendo os flavonoides provavelmente a principal classe de substâncias fenólicas presentes em CCE e os responsáveis pelas bioatividades encontradas. Estes achados estão em concordância com estudos já realizados que sugerem que as substâncias fenólicas, dentre elas os flavonoides, apresentam várias atividades biológicas, desde anti-inflamatória (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016), antioxidante (PEREIRA et al., 2009), antitumoral (AL-RIMAWI et al., 2016) à antifúngicas (ALVES et al., 2014).

O extrato etanólico de *C. coriacea* apresentou espectros UV compatíveis com flavonoides depois de avaliados por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massas, corroborando, assim, com os resultados fitoquímicos encontrados anteriormente. Após a comparação dos fragmentos de massas com dados da literatura (FARIAS e MENDEZ, 2014), pode-se sugerir a presença dos flavonoides rutina (Anexo I) e kaempferol-3-*o*-rutinosídeo (Anexo II). As ligações glicosídicas da rutina quebram-se e liberam os resíduos de monossacarídeos, essa quebra forma os fragmentos de massa m/z 465 e m/z 303. A quebra da ligação *o*-glicosídica entre a glicose e a raminose gera um heterosídeo com fragmento de massas 465, enquanto que a quebra da ligação *o*-glicosídica entre a glicose e o carbono 3 do esqueleto flavonoidico forma o m/z 303, que corresponde a forma aglicona da rutina. Em modo positivo o íon molecular da rutina é acrescido de um próton e apresenta-se como m/z 611 (STOBIECKI, 2000).

O flavonoide kaempferol-3-*o*-rutinosídeo $[M+H = 595]^+$ segue a mesma sequência de fragmentação, gerando fragmentos de massa com m/z 449 (quebra da ligação entre a glicose e raminose) e m/z 287 (quebra da ligação entre a glicose e o carbono 3 do esqueleto flavonoidico) (STOBIECKI, 2000). Os espectros UV encontrados também estão em concordância com a literatura, uma vez que, o espectro UV com λ_{max} em 255 e 356 nm da substância 4 e os espectros UV com λ_{max} em 265 e 347 nm para a substância 5 também sugeriram a presença dos flavonoides rutina e do kaempferol-3-*o*-rutinosídeo (WAN et al., 2011).

Em relação à terceira substância apresentada no *UFLC/MS*, o íon molecular desprotonado de 341[M-H]⁻ e o *m/z* 179 após perda de uma hexose [M- H-162]⁻, sugerem a presença de um dissacarídeo quando analisados em ESI⁻ (SALMAN et al., 2014; WAN et al., 2013). Já em ESI⁺, o íon molecular 365 [M+Na]⁺ e fragmento de massa em *m/z* 203 [M+Na-162]⁺ foram encontrados. Esses dados foram confrontados com os da literatura e também sugeriram a presença de um dissacarídeo (PEUKERT et al., 2014).

Dentre os dissacarídeos de origem natural tem-se a sacarose (DWIVEDI et al., 2007) (Anexo III). Estudos realizados por SALMAN et al. (2014) já demonstraram um perfil de fragmentação de massas por ESI⁻ semelhante [M-H = 341 e fragmento de massa em *m/z* = 179]⁻ aos encontrados neste trabalho. Outros autores, como Zhu e Cole (2001) também já descreveram a presença do íon molecular com *m/z* 377 e dos fragmentos de massa em *m/z* 341, *m/z* 215 e *m/z* 179 para a sacarose, o que realmente sugere a presença deste dissacarídeo em CCE. A presença de sacarose em folhas é comum, uma vez que este carboidrato é um produto comum da fisiologia vegetal após a fotossíntese foliar, sendo produzido em folhas e depois transportado pelo floema, um tecido de condução, para outros compartimentos vegetais (HUBER, 1989).

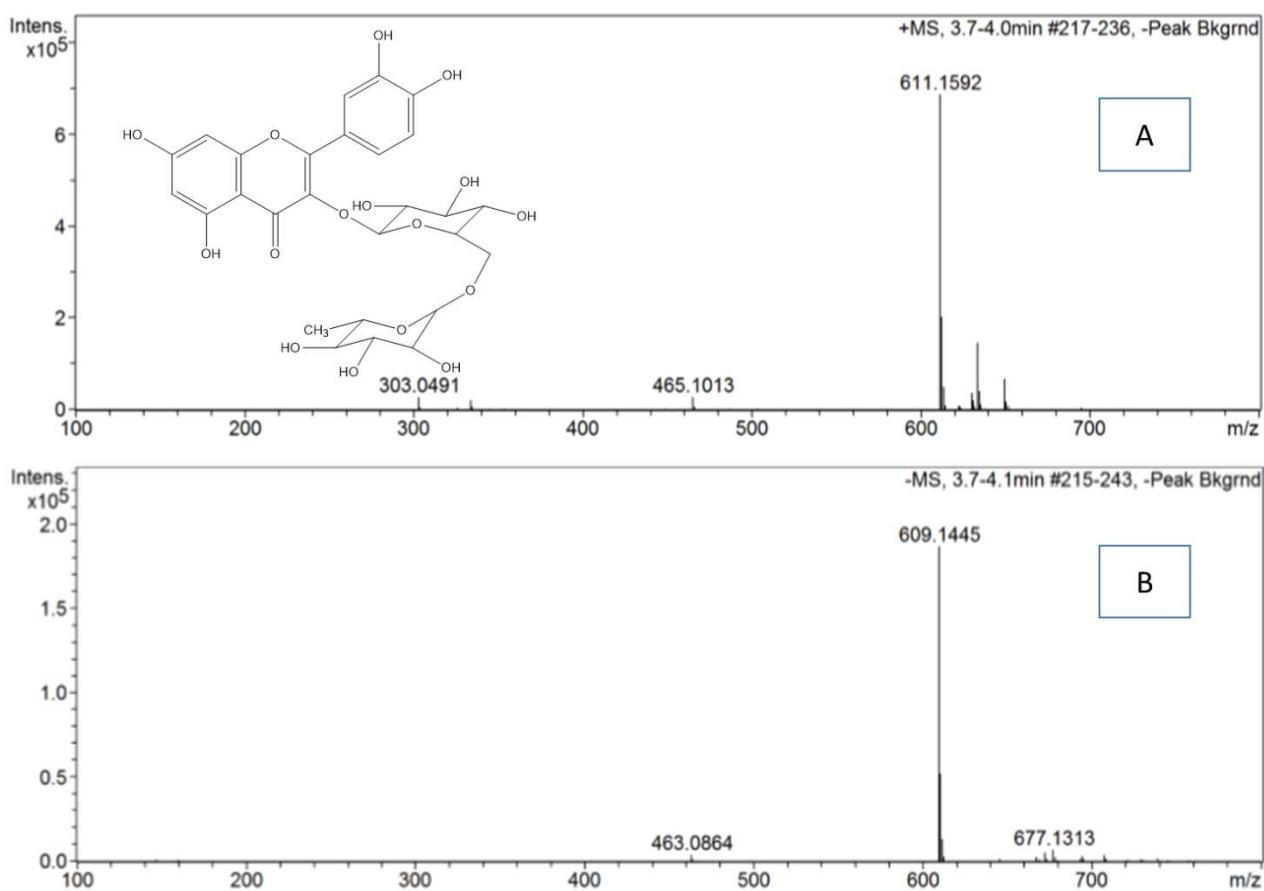
Desta forma os flavonoides rutina e kaempferol-3o-rutinosídeo podem ser os prováveis responsáveis pelos resultados obtidos nesse trabalho. A rutina, cujo sinal é majoritário em CCE, é um flavonoide conhecido na literatura pela sua capacidade de neutralizar os radicais livres e pela atividade anti-inflamatória devido a inibição das enzimas óxido nítrico sintase, fosfolipase e pela supressão de genes inflamatórios (KOVAL'SKII et al., 2014). A rutina também tem sido extensamente estudada quanto aos seus efeitos antitumorais (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). Em um estudo realizado por LIN et al. (2012), células de leucemia humana HL-60 foram implantadas em modelo murino e a rutina foi utilizada como tratamento na dose de 120 mg / kg, este estudo demonstrou o potencial antileucêmico deste flavonoide com uma redução significativa no tamanho do tumor dos animais tratados. A atividade antifúngica da rutina também vem sendo relatada, um estudo realizado por Han (2009) descreve a atividade antifúngica desse flavonoide para o tratamento de artrite séptica induzida por *C. albicans*.

7 CONCLUSÃO

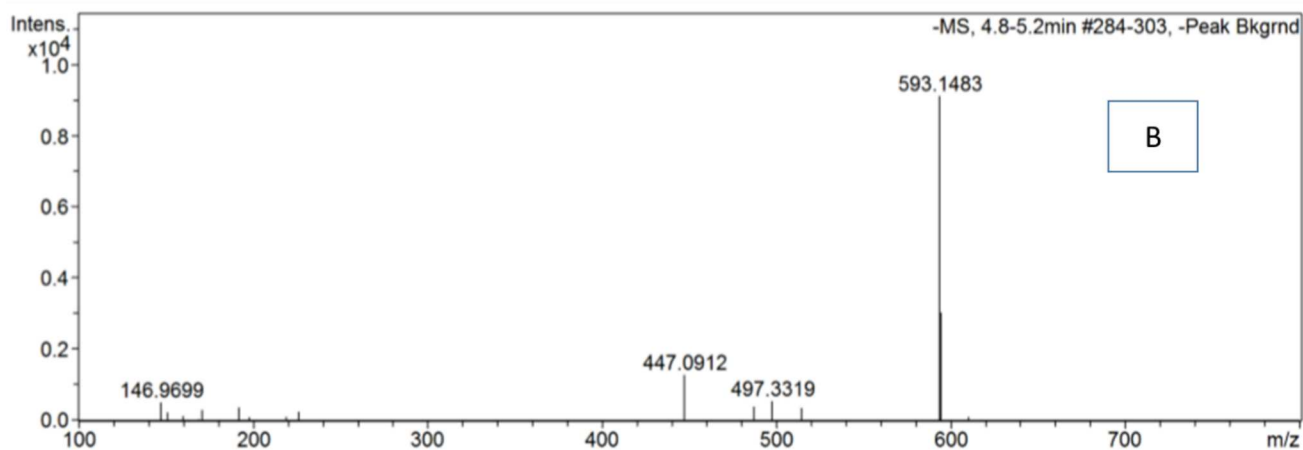
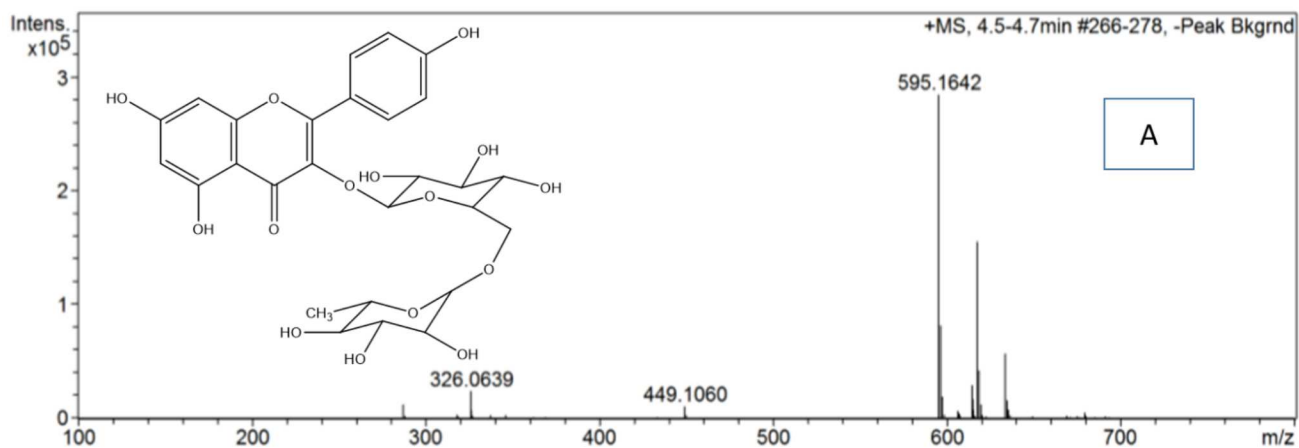
- Nas condições realizadas neste estudo *C. coriaceum* apresentou:
 - Atividade antioxidante por meio do bloqueio de radicais livres.
 - Atividade anti-inflamatória por meio da redução de óxido nítrico em células J774A.1.
 - Ausência de citotoxicidade para as linhagens J774A.1 e HEK e citotoxicidade para a linhagem HL-60.
 - Atividade antifúngica para *C. grubata* devido à capacidade de causar danos em parede celular e lise em membrana pela ligação em ergosterol.
 - Capacidade de atuar em menores concentrações com o antifúngico nistatina, efetuando um efeito aditivo.
 - Substâncias fenólicas em sua composição, dentre eles os flavonoides rutina e kaempferol-3o-rutinosídeo e estes podem ser os prováveis responsáveis pelas atividades encontradas, sendo a rutina a principal responsável, uma vez que, este flavonoide é sinal majoritário em CCE.
 - Substâncias de caráter exclusivamente glucídico, sugerindo a presença da sacarose dentre esses possíveis metabólitos.
- Este é o primeiro relato de caracterização química de *C. coriaceum* e das atividades biológicas testadas, de forma que, mais estudos devem ser realizados a fim de investigar o potencial químico e biológico desta espécie.

ANEXOS

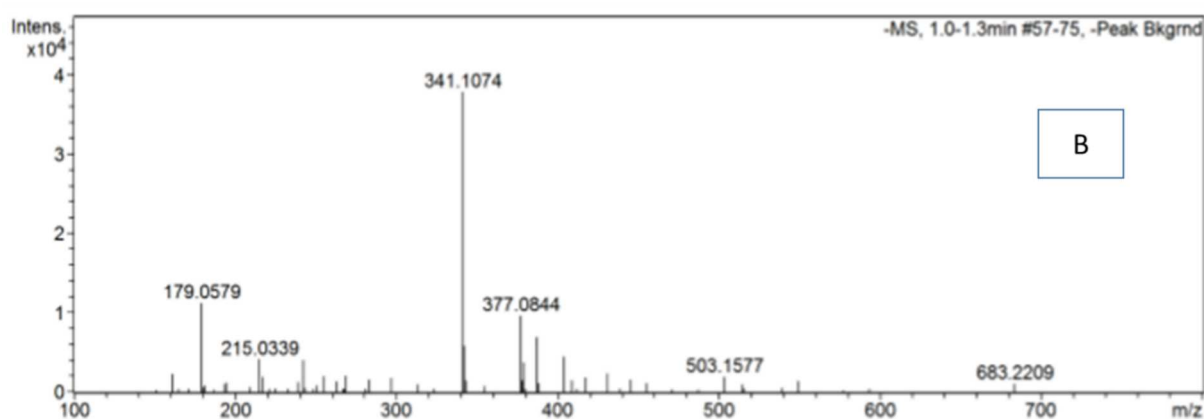
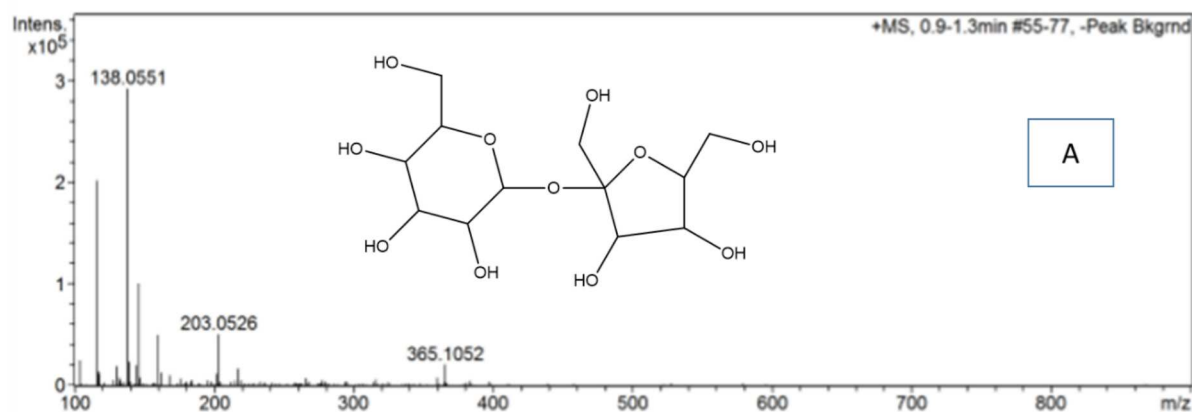
ANEXO I - (A) Perfil de fragmentação de massas por *UFLC/MS* do sinal 4 presente em CCE analisado por “eletrospray” em modo positivo (ESI+) com a estrutura da rutina. (B) Perfil de fragmentação de massas por *UFLC/MS* do sinal 4 presente em CCE analisado por “eletrospray” em modo negativo (ESI-).



ANEXO II - (A) Perfil de fragmentação de massas por *UFLC/MS* do sinal 5 presente em CCE analisado por “eletrospray” em modo positivo (ESI+) com a estrutura do kaempferol- 3*o*-rutinosídeo. **(B)** Perfil de fragmentação de massas por *UFLC/MS* do sinal 5 presente em CCE analisado por “eletrospray” em modo negativo (ESI-).



ANEXO III - (A) Perfil de fragmentação de massas por *UFLC/MS* do sinal 2 presente em CCE analisado por “eletrospray” em modo positivo (ESI+) com a estrutura da sacarose. (B) Perfil de fragmentação de massas por *UFLC/MS* do sinal 2 presente em CCE analisado por “eletrospray” em modo negativo (ESI-).



REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico*. 3° edição. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2009, 293p.
- ABDULKHALEQ, L.A.; ASSI, M.A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y.H.; HEZMEE, M.N.M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v.11, n.5, p.627-635, 2018.
- AHMED, A.U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontier in Biology**, v.6, n.4, p. 274 –281, 2011.
- AL-RIMAWI, F.; RISHMAWI, S.; ARIQAT, S.H.; KHALID, M.F.; WARAD, I.; SALAH, Z. Anticancer Activity, Antioxidant Activity, and Phenolic and Flavonoids Content of Wild *Tragopogon porrifolius* Plant Extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-8, 2016.
- ALVES, C.T.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v.9, n.2, p. 139–146, 2014.
- AMBRIZ-PÉREZ, D.L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E.P.; HEREDIA, J.B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p.1-14, 2016.
- ARULSELVAN, P.; FARD, M.T.; TAN, W.S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M.E.; KUMAR, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-15, 2016.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-31, 2014.
- AZEVEDO, C.F.; BRUNO, R.L.A.; ALMEIDA, V.P.; QUIRINO, Z.G.M.; FELIX, L.P. Caracterização morfológica dos órgãos reprodutivos de duas espécies de *Centrosema* (Fabaceae). **Revista Eletrônica de Biologia**, v.4, n.2, p.42-52, 2011.
- BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; ROSALES, C.; LÓPEZ-MACÍAS, C.; GÓMEZ, M.I. Control and Resolution Mechanisms of the Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, p.1-2, 2014.
- BANJARNAHOR, S.D.S.; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v. 23, n. 4, p.239-244, 2014.
- BARBOSA-FEVEREIRO, V. P. *Centrosema* (A. P. de Candolle) Bentham do Brasil – Leguminosae – Faboideae. **Rodriguésia**, v.29, n. 42, p.159-219, 1977.

BERKOW, E.L.; LOCKHART, S.R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v.10, n. 237–245, 2017.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.S.; SACKESEN, C.S.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v.5, p.9–19, 2012.

BONGOMIN, F.; SARA GAGO, S.; OLADELE, R.O.; DENNING, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v.3, n. 57, p. 1-29, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BREWER, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.221-247, 2011.

BRUNETTI, C.; FERDINANDO, M.D.; FINI, A.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p.3540-3555, 2013.

CAMPOS, L.M.; MELO, L.; LEMOS, A.S.O.; GUEDES, M.C.M.R.; SILVA, T.P.; FIGUEIREDO, G.F.; REIS JUNIOR, J.L.; ROCHA, V.N.; MELO, R.C.N.; ARAÚJO, M.G.F.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. *Mitracarpus frigidus*: A promising antifungal in the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Industrial Crops & Products**, v.123, p.731-739, 2018.

CARMELIET, P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. **Oncology**, v.69, n.3, p.4–10, 2005.

CARVALHO, E. **Estudo do desenvolvimento de ovos de *Parapharyngodon baina* Pereira Sousa & Souza Lima, 2010 (Nematoda, Oxyuroidea) e avaliação da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Centrosema coriaceum* Benth. (Fabaceae) SOBRE NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS ADULTOS DE *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata: Tropiduridae). 71f. 2016.** Dissertação (Mestrado em comportamento e biologia animal) - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v.122, p.785–794, 2015.

CHEN, C.; HU, J.; ZENG, P.; PAN, F.; YASEEN, M.; XU, H.; LU, J.R. Molecular mechanisms of anticancer action and cell selectivity of short α -helical peptides. **Biomaterials**, v.35, p.1552-1561, 2014.

CHEN, H.; PU, J.; LIU, D.; YU, W.; SHAO, Y.; YANG, G.; XIANG, Z.; HE, N. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black *Mulberry* (*Morus nigra* L.). **PLOS ONE**, p.1-14, 2016.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p.7204-7218, 2018.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J.F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLOS Pathogens**, p.1-10, 2017.

CLINICAL STANDARD LABORATORY INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, 2014.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. **Nutrition** v. 12, n. 4, p.274-277, 1996.

CORADIN, L.; KARDEC, A.; RAMOS, B. **Forrageiras Fabaceae: Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste**. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1074715/1/centrosema1.pdf> > Acessado em 22 de janeiro de 2019.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and câncer. **Nature**. v.420, n.6917, p. 860–867, 2002.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Triggering apoptosis in hematopoietic cells with cytotoxic drugs. Cold Spring Harbor Protocols, v. 2016, n. 7, p. pdb. prot087130, 2016a.

DATOGUIA, T.S.; VELLOSO, E.D.R.P.; HELMAN, R.; MUSACCHIO, J.G.; SALVINO, M.A.; SOARES, R.A.; HIGASHI, M.; FADEL, A.V.; SILVA, R.S.A.; HAMERSCHLAK, N.; SANTOS, F.P.S.; CAMPREGHER, P.V. Overall survival of Brazilian acute myeloid leukemia patients according to the European LeukemiaNet prognostic scoring system: a cross-sectional study. **Medical Oncology**, v.35, n.141, p.1-6, 2018.

DINARELLO, C.A. The paradox of pro-inflammatory cytokines in câncer. **Revista Cancer Metastasis**, v. 25, p.307–313, 2006.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; Franco Maria LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

DWIVEDI, P.; BENDIAK, B.; CLOWERS, B.H.; HILL JR, H.H. Rapid Resolution of Carbohydrate Isomers by Electrospray Ionization Ambient Pressure Ion Mobility Spectrometry-Time-of-Flight Mass Spectrometry (ESI-APIMS-TOFMS). **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**. v.18, p.1163–1175, 2007.

ELKHATEEB, Y.A.M.; ALSHAMMARY, M.R. Effects of Fast Foods in Relation to Free Radicals and Antioxidants. **American Journal of Laboratory Medicine**, v.2, n. 6, p.156-162, 2017.

EKPO, M.; MBAGWU, H.; CLEMENT JACKSON, C.; ENO, M. Antimicrobial and wound healing activities of *Centrosema pubescens* (Leguminosae). **Journal of Physics: Conference Series**, v.1, p.1-6, 2011.

FANG, L.; CHANG, H.M.; CHENG, J.C.; LEUNG, P.C.K.; SUN, Y.P. Nitric Oxide and cGMP Induce COX-2 Expression and PGE2 Production in Human Granulosa Cells Through CREB Signaling Pathway. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.100, n.2, p.262–269, 2015.

FARIAS, L.S.; MENDEZ, A.S.L. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata subsp. Pruinosa*. **Revista Química Nova**, v.37, n.3, p.483-486, 2014.

FEOFILOVA, E.P. The fungal cell wall: modern concepts of its composition and biological function. **Mikrobiologia** v,79, p.723-733, 2010.

FOLIN, O.; CIOOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627, 1927.

FROST, D.J; BRANDT, K.D; CUGIER, D; GOLDMAN, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of antibiotics**, v.48, n.4, p.306-310, 1995.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A.K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.25, p.149–164, 2017.

GETHIN, G. Understanding the inflammatory process in wound healing. **British Journal of Community Nursing**, p.1-4, 2012.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and DisabilityAdjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncology**, v.3, n.4, p.524-548, 2017.

GOOGLE IMAGENS. Imagen de *Centrosema coriaceum* Benth. Disponível em <http://www.fotolog.com/pedrinho_viana/21384163> Acessado em 12 de janeiro de 2018.

GREENWELL, M.; RAHMAN, P.K.S.M. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.6, n.10, p.4103–4112, 2015.

GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n.6, p.883–899, 2010.

GULATI, K.; GUHATHAKURTA, S.; JOSHI, J.; RAI, N.; RAY, A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. **MOJ Immunology**, v. 4, n.2, 1-9, 2016.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v.9, n.2, p.207–211, 2009.

HASSANPOUR, S.H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**. v.4, p.127-129, 2017.

HATAMI, T.; EMAMI, S.A.; MIRAGHAEI, S.S.; MOJARRA, M. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis* Willd. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.13, n.2, p.551-558, 2014.

HICKOK, J.R.; THOMAS, D.D. Nitric Oxide and Cancer Therapy: The Emperor has NO Clothes. **Current Pharmaceutical Design**. v.16, n.4, p.381–391, 2010.

HUANG, A.; CAO, S.; TANG, L. The tumor microenvironment and inflammatory breast cancer. **Journal of Câncer**, v.8, n.10, p.1884-1891, 2017.

HUANG, M.T.; GHAI, G.; HO, C.T. Inflammatory Process and Molecular Targets for Antiinflammatory Nutraceuticals. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v.3, p.127-139, 2004.

HUBER, S.C. Biochemical Mechanism for Regulation of Sucrose Accumulation in Leaves during Photosynthesis. **Plant Physiology**, v.91, p.656-662, 1989.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em < <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk> > Acessado em 15 de dezembro de 2018.

ISO, E. N. 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.

IWAKI, T; IEFUJI, H; HIRAGA, Y; ET AL. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Microbiology**, v.154, p.830-841, 2008.

JETTEN, N.; VERBRUGGEN, S.; GIJBELS, M.J.; POST, M.J.; WINTHER, M.P.J.; DONNERS, M.P.C. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, v.17, n.1, p.109-118, 2013.

KHAN, M.S.A., AHMAD, I., CAMEOTRA, S.S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, v.3, n.54, p.1–16, 2013.

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE, R.P.; MUKTA, M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p. 5678–5698, 2012.

KEDARE, S.B.; SINGH, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n.4, p.412–422, 2011.

KOVAL'SKII, I.V.; KRASNYUK, I.I.; KRASNYUK JR, I.I.; NIKULINA, O.I.; BELYATSKAYA, A.V.; KHARITONOV, Y.Y.; FELDMAN, N.B.; LUTSENKO, S. V. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action. Mechanisms of rutin pharmacological action (review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 2, p.73-76, 2014.

LANDSKRON, G.; LA FUENTE, M.D.; THUWAJIT, P.; THUWAJIT, C.; HERMOSO, M.A. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **Journal of Immunology Research**, p.1-19, 2014.

LEITE, M.C; BEZERRA, A.P; DE SOUSA, J.P; ET AL. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-10, 2014.

LEITE, M.C.A.; BEZERRA, A. P.B.; SOUSA, J.P.; LIMA, E.O. Investigating the antifungal activity and mechanism (s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275–284, 2015.

LEMONS, A.S.O.; CAMPOS, L.M.; MELO, L.; GUEDES, M.C.M.R.; OLIVEIRA, L.G.; SILVA, T.P.; MELO, R.C.N.; ROCHA, V.N.; AGUIAR, J.A.K.; APOLÔNIO, A.C.M.; SCIO, E.; FABRI, R.L. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Psychorubrin, a Pyranonaphthoquinone Isolated From *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.724, p.1-11, 2018.

LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. Flavonoides e radicais livres. **Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria**, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

LIN, C.Z.; ZHU, C.C.; HU, M.; WU, A.Z.; BAIRU, Z.D.; KANGSA, S.Q. Structure-activity relationships of antioxidant activity in vitro about flavonoids isolated from *Pyrethrum tatsienense*. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v.3, n.3, p.123-127, 2014.

LIN, J.P., YANG, J.S., LIN, J.J., LAI, K.C., LU, H.F., MA, C.Y., SAICHUENWU, R., WU, K.C., CHUEH, F.S., GIBSON WOOD, W., CHUNG, J.G. Rutin inhibits human

leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. **Environmental Toxicology**, v.27, n.8, p.480–484, 2012.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. v.4, n.8, p.118-126, 2010.

MACÊDO, D.G.; RIBEIRO, D.A.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I. R.A.; SOUZA, M.M.A. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.14, n.6, p. 491 – 508, 2015.

MADKA, V.; RAO, C.V. Anti-inflammatory Phytochemicals for Chemoprevention of Colon Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, n.13, p.542-557, 2013.

MALAFRONTI, N.; PESCA, M.S.; BISIO, A.; ESCOBAR, L.M.; DE TOMMASI, N. “New flavonoid glycosides from vernonia ferrugínea.” **Natural Product Communications**, v.4, n.12, p.1639–1642, 2009.

MANI, S. R.; LAKSHMI, B.S. G1 Arrest and Caspase-Mediated Apoptosis in HL-60 Cells by Dichloromethane Extract of *Centrosema pubescens*. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 38, n.6, p.1143-1159, 2010.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: Tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v.23, n.11, p.549–55, 2002.

MARCUM, Z.A.; HANLON, J.T. Recognizing the Risks of Chronic Nonsteroidal AntiInflammatory Drug Use in Older Adults. **Ann Longterm Care**, v.18, n.9, p.24–27, 2010.

MAROON, J.C.; BOST, J.W.; MAROON, A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. **Surgical Neurology International**, v.1, n.80, 2010.

MEEK, I.L.; LAAR, M.A.F.J.V.; VONKEMAN, H.E. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. **Pharmaceuticals**, v. 3, p.2146-2162, 2010.

MELO, L. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-Candida in vitro DE *Mitracarpus frigidus*: ESTUDO EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS, 59 f. 2017.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em farmácia) - Faculdade de farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

MELO, M. S. O. M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.25, n. 2, p.147-157, 1989.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora Vascular do Bioma Cerrado. Cerrado, Ambiente e Flora, **Embrapa, Brazil**, p.289-556, 1998.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN-BEER, T. A. **Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts**. FoodChemistry, v.85, n.2, p.231-237, 2004.

MOO-HUCHIN, V.M.; MOO-HUCHIN, M.I.; ESTRADA-LEÓN, R.J.; CUEVAS-GLODY, L.; ESTRADA-MOTA, I.A.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v.166, p.17–22, 2015.

MUÑOZ, A.J.C.; FINQUELIEVICH, J.; TUR-TUR, C.; ERASO, E.; JAUREGIZAR, N.; QUINDÓS, G.; GIUSIANO, G. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. **Revista Española de Quimioterapia**, v.27, n.3, p.141-158, 2014.

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; ZICHE, M. Role of Nitric Oxide in the Modulation of Angiogenesis. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, n.7, p.521-530, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa- *Maytenus ilicifolia*. Ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 553-556, 2009.

NEWMAN, D.J. The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 402-414, 2017.

NIMSE, S.B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p.27986–28006, 2015.

ORHAN, D.D.; KÜPELI, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Antiinflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *viscum album* ssp. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, n. 1-2, p. 26–30, 2006.

OSAWA, C.C; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**. v.5, n. 47, p. 1- 15, 2016.

PANWAR, S.L.; PASRIJA, R.; PRASAD, R. Membrane homeostasis and multidrug resistance in yeast. **Bioscience Reports**, v.28, p. 217–228, 2008.

PARENTE-ROCHA, J.A.; BAILÃO, A.M.; AMARAL, A.C.; TABORDA, C.P.; PACCEZ, J.D.; BORGES, C.L.; PEREIRA, M. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators of Inflammation**, p-1-16, 2017.

PEREIRA, D.M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.A.; ANDRADE, P.B. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, v.14, p.2202-2211, 2009.

PERLIN, D.; SHOR, E; ZHAO, Y. Update on antifungal drug resistance. **Current Clinical Microbiology Reports**, v.2, n.2, p.84–95, 2015.

PEUKERT, M.; THIEL, J.; PESHEV, D.; WESCHKE, W.; ENDE, W.V.; MOCK, H.P.; MATROS, A. Spatio-Temporal Dynamics of Fructan Metabolism in Developing Barley Grains. **The Plant Cell Preview**, p.1-17, 2014.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D.B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.30, n.1, p.11–26, 2015.

PICCOLO, M.T.; MENALE, C.; CRISPI, S. Combined anticancer therapies: an overview of the latest applications. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.15, n.4, p.408-422, 2015.

PILLAI, S.K.; MOELLERING, R.C.; ELIOPOUOS, G.M. "Antimicrobial combinations" in Antibiotics in laboratory medicine ed. Lorian V., EDITOR. (Philadelphia: LippincottWilliams & Wilkins, New York, 2005, p. 365-440.

PINHO, M.S.L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Revista brasileira de Coloproctologia**, v.25, n.4, p.396-402, 2005.

PINTO, A.Z.L.; ASSIS, A.F.S.; PEREIRA, A.G.; PASA, M.C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no mercado do porto em cuiabá, mato grosso, brasil. **Flovet**, n. 5, p.51-70, 2013.

PISOSCHI, A.M.; NEGULESCU, G.P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v.1, n.1, p.1-10, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v.125, n.1, p.3-13, 2012.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D.J; GIBBS, D.L; NEWELL, V.A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T.A.; GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study,

1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal clinical microbiology**, v.48, n.4, p.1366–1377, 2010.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, n.202, p.1-13, 2014.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n.2, p.337-341, 1999.

RAHMAN, A.H.M.M.; PARVIN, M.I.A. Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi, Bangladesh. **Research in Plant Sciences**, v.2, n.1, p.6-8, 2014.

ROSELLETTI, E.; PERITO, S.; GABRIELLI, E.; MENCACCI, A.; PERICOLINI, E.; SABBATINI, S.; CASSONE, A.; VECCHIARELLI, A. NLRP3 inflammasome is a key player in human vulvovaginal disease caused by *Candida albicans*. **Scientific Reports**, v.7, n.17877, p.1-10, 2017.

SALMAN, M.; ABDEL-HAMEED, E.S.S.; BAZAID, S.A.; AL-SHAMRANI, M.G.; MOHAMED, H.F. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for the determination of sugars in fresh pomegranate fruit juices. **Der Pharma Chemica**, v.6, n.5, p.320-333, 2014.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in Medicine**, v.3, n.11, p. 1-10, 2016.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p.10–24, 2013.

SAVASTANO, C.; SILVA, E.O.; ALVES, L.L.G.; NERY, J.M.; SILVA, N.C.; DIAS, A.L.T. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian hospital. **Brazilian journal of microbiology**, v.47, p.367–372, 2016.

SCORZONI, L.; SILVA, A.C.A.P.; MARCOS, C.M.; ASSATO, P.A.; MELO, W.C.M.A.; OLIVEIRA, H.C.; COSTA-ORLANDI, C.B.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.36, p.1-23, 2017.

SHARMA, J.N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, A.S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology** v.15, p. 252–259, 2007.

SEYFRIED, T.N.; HUYSENTRUYT, L.C. On the Origin of Cancer Metastasis. **Critical reviews in oncogenesis**, v.18, n.1-2, p.43–73, 2013.

SILVA, B. P.; TOSTES, J.B.F.; PARENTE, J.P. Immunologically active polysaccharides from *Centrosema pubescens*. **Fitoterapia**, v. 71, p.516-521, 2000.

SILVA, C.T.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Revista Ciência e Cultura**, v.66, n.1, p.38-42, 2014.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; ARROYO, M.T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p.121–132, 2010.

SOUZA, A.C.O.; AMARAL, A.C. Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.336, p.1-13, 2017.

SPENCER, A. L. R.; SPENCER, J. F. T. Public health microbiology: methods and protocols, 1st ed., **Humana Press Inc.**, New Jersey, 2004, 568p.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; RAMASUBRAMANIAN, A.K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, p.1-12, 2014.

STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, n.54, p.237256, 2000.

SUNDD, P.; POSPIESZALSKA M.K.; CHEUNG, S. L.; KONSTANTOPOULOS, K.; LEY, K. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology**, v.48, n.1, p.1–35, 2011.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v.3, p. 276-284, 2003.

TANG, Y-L.; SHI, Y-H.; ZHAO, W.; HAO, G.; LE, G-W. Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48, p.1187-1194, 2008.

THOMPSON, D.S.; CARLISLE, P.L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. **Eukaryotic cell**, v.10, n.9, p.1173-1182, 2011.

TODORIC, J.; ANTONUCCI, L.; MICHAEL KARIN, M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. **American Association for Cancer Research**, p. 1-12, 2016.

TRÓPICOS. Imagens de *Centrosema coriaceum* Benth. Disponível em <<http://www.tropicos.org/Name/13008041?tab=images> > Acessado em 12 de janeiro de 2018.

VAHORA, H.; KHAN, M.A.; ALALAMI, U.; HUSSAIN, A. The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention. **Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n.1, p.1-12, 2016.

VILA VERDE, G.M.; PAULA, J.R.; CANEIRO, D.M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 66-68, 2003.

WALLACE, J.L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.1, p.5-9, 2005.

WAN, D.; YANG, H.; YAN, C.; SONG, F.; LIU, Z.; LIU, S. Differentiation of glucose-containing disaccharides isomers by fragmentation of the deprotonated non-covalent dimers using negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 115, p.870–875, 2013.

WAN, C.; YU, Y.; ZHOU, S.; TIAN, S.; CAO, S. Isolation and identification of phenolic compounds from *Gynura divaricata* leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n.26, p.101-108, 2011.

WHALEY, S.G.; ROGERS, P.D. Azole Resistance in *Candida glabrata*. **Current Infectious Disease Reports**, v.18, n.41, p.1-10, 2016.

WIEDERHOLD, N.P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and Drug Resistance**, v.10, p. 249–259, 2017.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v.89, p.164–175, 2013.

WONGRAKPANICH, S.; WONGRAKPANICH, A.; MELHADO, K.; RANGASWAMI, J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal AntiInflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging and Disease**, v. 9, n.1, p.143-150, 2018.

YADAV, U.C.S.; RAMANA, K.V. Regulation of NF- κ B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-11, 2013.

YANO, J.; PETERS, B.M.; NOVERR, M.C.; FIDEL JUNIOR, P.L. Novel Mechanism behind the Immunopathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis: “Neutrophil Anergy”. **Infection and Immunity**, v. 86, n.3, p.1-12, 2018.

YU, M.G.; ZHENG, H.Y. Acute Myeloid Leukemia: Advancements in Diagnosis and Treatment. **Chinese Medical Journal**, v.130, n. 2, p. 211-218, 2017.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v.45, n.2, p. 27–37, 2007.

ZHANG, M.; LIU, N.; LIU, H. Determination of the Total Mass of Antioxidant Substances and Antioxidant Capacity per Unit Mass in Serum Using Redox Titration. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, p.1-5, 2014.

ZHU, J.; COLE, R.B. Ranking of Gas-Phase Acidities and Chloride Affinities of Monosaccharides and Linkage Specificity in Collision-Induced Decompositions of Negative Ion Electrospray-Generated Chloride Adducts of Oligosaccharides. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, p.1193–1204, 2001.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R.T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, v.27, p.1-19, 2017.

ZINGER, A.; CHO, W. C.; BEN-YEHUDA, A. Cancer and Aging - the Inflammatory Connection. **Aging and disease**, v. 8, n.5, p. 611-627, 2017.

ZOCOLER, A. M. D.; SANCHES, A. C. C.; ALBRECHT, I.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth. Brazilian **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45 n. 3, p. 551-562, 2009.