

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Enriquecimento de metabólitos ativos de *Hypericum polyanthemum*  
e avaliação da atividade anti- *Trichomonas vaginalis***

**SIMONE TASCA CARGNIN**

**PORTO ALEGRE, 2011.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Enriquecimento de metabólitos ativos de *Hypericum polyanthemum*  
e avaliação da atividade anti- *Trichomonas vaginalis*

Dissertação apresentada por **Simone  
Tasca Cargin** para obtenção do GRAU  
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel

Porto Alegre, 2011.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 25.03.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Marilise Brittes Rott

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C277e Cargnin, Simone Tasca  
Enriquecimento de metabólitos ativos de hypericum polyanthemum e avaliação da atividade anti-trichomonas vaginalis / Simone Tasca Cargnin. – Porto Alegre: UFRGS, 2011. – xiv, 104 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Hypericum. 2. Benzopiranos. 3. Floroglucinol: Derivados. 4. Extração com fluido supercrítico. 5. Trichomonas vaginalis. 6. Citotoxicidade. I. Poser, Gilsane Lino von. II. Cassel, Eduardo. III. Título.

CDU: 615.322:582.824

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia e no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da mesma universidade, e no Laboratório de Operações Unitárias da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

A pesquisa foi financiada pelo CNPq e a autora recebeu bolsa de mestrado deste mesmo órgão financiador.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pela bolsa de estudos e à faculdade de Farmácia da UFRGS, que além de prover uma graduação de qualidade, oferece um Pós-Graduação qualificado e de credibilidade nacional.

À Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser, a Gil, por me dar muitas oportunidades e sempre acreditar nas minhas idéias.

Aos Professores Dr. Eduardo Cassel e Dr. Rubem Vargas pelo grande aprendizado e auxílio nas extrações com fluido supercrítico, e por me permitir conhecer novos mundos, a PUCRS e a engenharia química.

À Profa. Dr. Tiana Tasca, por abrir as portas do Laboratório de Parasitologia para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e, sobretudo, por acreditar em mim.

Aos Professores Dr. Paulo Roehe e Dr. Jarbas Montanha pelo auxílio no estudo com células. Ao aluno de mestrado Samuel, que foi imprescindível para o sucesso dos ensaios de citotoxicidade. Muito obrigada pela ajuda, paciência, e por garantir minha chegada ao IPV.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacognosia pelos agradáveis momentos, especialmente agradeço a bolsista Satchie, pela ajuda nos isolamentos, moagens, pesagens, etc. Contem sempre comigo.

Ao Prof. Dr. Alexandre José Macedo, por me permitir entrar no mundo biofilme, e a Doutoranda Danielle, minha amiga e exemplo na área de microbiologia.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia, meu segundo lar. Agradeço à Amanda, à Muriel, aos bolsistas, por estarem sempre dispostos a ajudar. À Patrícia, a Pat, um agradecimento especial, pois sem sua ajuda nada disso teria sido possível. Sua disposição em ajudar, ensinar e trabalhar são exemplos a serem seguidos.

Agradeço também a mais nova mestranda, também minha grande amiga de infância, Clarinha, pelo apoio, conversas, trabalhos e por estarmos sempre perto, tua amizade é muito importante pra mim. A todos, obrigada por me acolherem se tornarem grandes amigos.

Por fim, agradeço aos meus pais, Leda e Carlos Alberto, pelo amor incondicional, pelo constante incentivo e pela compreensão pelas ausências. À minha irmã, Sílvia, um exemplo de profissional, que está sempre aconselhando e incentivando para que eu prossiga na Pós-Graduação. Ao Marcelo, obrigada por todos os dias, pelo companheirismo e por sempre querer que eu seja uma pessoa melhor.



## RESUMO

Plantas do gênero *Hypericum* são bem conhecidas por sua utilização na medicina tradicional, sendo *Hypericum perforatum* a espécie mais estudada. No Sul do Brasil, esse gênero é representado por cerca de 20 espécies, entre elas, destaca-se *H. polyanthemum*, o qual apresenta em extrato lipofílico a presença de uliginosina B, um derivado de floroglucinol, e três benzopiranos: HP1, HP2 e HP3. Partes aéreas de *H. polyanthemum* foram submetidas à extração com fluido supercrítico (SFE), sendo realizadas extrações sucessivas com dióxido de carbono nas pressões de 90, 120, 150 e 200 bar, em diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C). Posteriormente, as frações obtidas foram comparadas com extrato *n*-hexano obtido por técnica convencional (ultra-som). SFE apresentou maior seletividade que a extração com *n*-hexano, sendo a 50 °C a melhor condição para extrair os metabólitos bioativos. Para extração do composto com maior peso molecular, uliginosina B, pressões mais elevadas foram necessárias. Além disso, avaliou-se a atividade anti- *Trichomonas vaginalis* do extrato obtido por SFE a 50 °C/150 bar e dos compostos isolados. Os resultados indicam que todas as amostras testadas possuem atividade anti-*T. vaginalis*, porém, HP1 demonstrou melhor seletividade frente ao protozoário (isolado metronidazol-resistente e -suscetível), sem apresentar citotoxicidade contra células de mamíferos. Ainda, o HP1 apresentou satisfatória atividade contra isolado metronidazol-resistente (52% de trofozoítos viáveis), apresentando efeito sinérgico quando testado com baixa concentração de metronidazol (23% de trofozoítos viáveis). Todos os compostos isolados provocaram danos na membrana do parasito (liberação de LDH > 90%) e nenhuma das amostras apresentou efeito hemolítico importante, sendo que HP2 e uliginosina B apresentaram citotoxicidade frente a células de mamíferos. Portanto, benzopiranos e derivados de floroglucinol são moléculas promissoras como protótipos para novos fármacos tricomonocida, principalmente HP1, visto que corrobora com a ação do metronidazol em isolados de *T. vaginalis* resistentes. No entanto, mais estudos são necessários a fim de melhorar a atividade antiprotozoária das moléculas testadas, sem que as mesmas apresentem toxicidade para células de mamíferos.

Palavras-Chave: *Hypericum*, benzopiranos, derivados de floroglucinol, extração com fluido supercrítico, *Trichomonas vaginalis*, citotoxicidade.



## ABSTRACT

### Enrichment of active metabolites of *Hypericum polyanthemum* and evaluation of anti- *Trichomonas vaginalis* activity

Plants of the genus *Hypericum* are well known for their use in traditional medicine, being *H. perforatum* the most important species. In South Brazil, this genus is represented by approximately 20 species and among them, *H. polyanthemum* showed in the lipophilic extract the presence of uliginosin B, a phloroglucinol derivative, and three benzopyrans: HP1, HP2 and HP3. Aerial parts of *H. polyanthemum* were submitted a supercritical fluid extraction (SFE), being successively extracted with supercritical carbon dioxide under pressures of 90, 120, 150 and 200 bar at different temperatures (40, 50 and 60 °C), and compared with the *n*-hexane extract obtained by ultrasound-assisted extraction. SFE presented higher selectivity than the *n*-hexane extraction. The best condition to extract the target metabolites has been determined to be at 50 °C, being that for the high molecular-weight compound, uliginosin B, higher pressures was required. Moreover, the anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the extract obtained by SFE at 50 °C/150 bar and the isolated compounds was evaluated. The results showed that all samples have anti-*T. vaginalis* activity; however, HP1 demonstrated the best selectivity against this protozoa (metronidazole-resistant and -susceptible isolates), with no cytotoxicity against mammalian cells. In addition, HP1 has good activity against metronidazole-resistant isolate (52% of viable trophozoites), presenting synergic effect when tested with low concentration of metronidazole (23% of viable trophozoites). All isolated compounds caused damage in the parasites membrane, revealed by more than 90% of LDH release. None of the samples presented important hemolytic effect, and HP2 and uliginosin B presented cytotoxicity against mammalian cells. Therefore, benzopyrans and phloroglucinol derivative are promising molecules as prototypes for new antiprotozoal drugs, especially HP1, which improve metronidazole action against a resistant *T. vaginalis* isolate. Nevertheless, more studies are necessary in order to enhance their *in vitro* antiprotozoal activity without toxicity for mammalian cells.

Keywords: *Hypericum*, benzopyrans, phloroglucinol derivative, supercritical fluid extraction, *Trichomonas vaginalis*, cytotoxicity.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 Espécies de <i>Hypericum</i> nativas do sul do Brasil.....	05
1.2 <i>Hypericum polyanthemum</i> .....	07
1.3 Extração com fluido supercrítico.....	08
1.4 <i>Trichomonas vaginalis</i> : parasito patogênico.....	12
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MANUSCRITO I.....</b>	<b>21</b>
<b>4. MANUSCRITO II.....</b>	<b>41</b>
<b>5. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>89</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>



## 1. INTRODUÇÃO

---





Produtos naturais têm sido utilizados no tratamento e alívio de doenças desde o início da história humana. Baseados na medicina popular, estudos científicos nesta área vêm sendo desenvolvidos há séculos, e ao longo destes anos, têm sido a fonte mais importante de produtos farmacêuticos. Em uma extensa revisão de novos fármacos introduzidos no mercado entre 1981 e 2002, 28% das 868 novas entidades químicas eram produtos naturais ou seus derivados, e outros 24% foram criados a partir de um farmacóforo de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003). Muitas são as razões para pesquisa de produtos naturais como moléculas bioativas, como sua elevada diversidade química (complexidade estrutural), sua similaridade estrutural com proteínas-alvo, entre outras (HARVEY, 2007).

Atualmente, as pesquisas em torno da descoberta de novos medicamentos no combate a infecções por microrganismos têm recebido pouca atenção, sendo que apenas 23% dos medicamentos lançados no mercado entre 01/1981 e 06/2006 são antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários (NEWMAN e CRAG, 2007). Dentre eles, com menor parcela encontram-se os antiparasitários, onde apenas 15 novos medicamentos foram introduzidos no mercado.

Doenças parasitárias causadas por helmintos e protozoários possuem grande prevalência mundial e afetam principalmente populações de países tropicais subdesenvolvidos. Por esta razão, o investimento na pesquisa de novos fármacos antiparasitários é extremamente baixo (0,1% do investimento total). Historicamente, a descoberta de medicamentos para este fim tem sido conduzida através do uso de poucos recursos e estratégias de baixo risco por parte das indústrias farmacêuticas (FREARSON *et al.*, 2007). Ainda, muitos fármacos foram primeiramente desenvolvidos para outras indicações, como por exemplo, a miltefosina, uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente como antineoplásico e que se mostrou efetiva no tratamento de infecções por protozoários (BLAHA *et al.*, 2006).

Considerando que aproximadamente um bilhão de pessoas são afetadas por doenças parasitárias e que, em consequência da infecção, entre 137 a 534 mil pessoas morrem por ano e entre 12,8 a 56,6 milhões de pessoas sofrem prejuízos na qualidade de vida (DALY, do inglês *disability-adjusted life year*) (FREARSON *et al.*, 2007), doenças parasitárias são um problema de saúde pública grave com consequências sócio-econômicas relevantes. Portanto, alternativas

terapêuticas eficientes e de baixo custo devem ser investigadas.

Muitas pesquisas com produtos naturais visando atividade citotóxica contra parasitos vêm sendo desenvolvidas (FRÖLICH *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2007; BARRETT, 2010; BUCKNER e NAVABI, 2010; GIORDANI *et al.*, 2010). Plantas do gênero *Hypericum* são conhecidas na medicina tradicional, tendo como principal representante *H. perforatum* L., Erva-de-São-João, espécie europeia utilizada no tratamento da depressão leve a moderada (BILIA *et al.*, 2002; CERVO *et al.*, 2002). Neste gênero, derivados de floroglucinol encontram-se amplamente distribuídos, sendo hiperforina e *ad*-hiperforina, moléculas encontradas em *H. perforatum* L. Verrota e colaboradores (2007), verificaram uma relevante atividade da hiperforina frente ao protozoário *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária. Neste contexto, este trabalho aborda a ação anti-*Trichomonas vaginalis* de produtos naturais (benzopiranos e derivados de floroglucinol) oriundos de *Hypericum polyanthemum*, espécie nativa do sul do Brasil.

*Trichomonas vaginalis* é um patógeno de mucosa causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo, que acomete o trato urogenital humano de cerca de 170 milhões de pessoas por ano (WHO, 2001). Metronidazol é o medicamento de escolha para o tratamento de infecções causadas por *T. vaginalis*, no entanto, isolados resistentes já foram descritos (SOBEL *et al.*, 1999; KLEBANOFF *et al.*, 2001). Assim, a pesquisa de novas moléculas ativas, que possuam ação frente a isolados resistentes sem apresentar toxicidade a células humanas, torna-se de grande importância.

No estudo da atividade biológica de produtos naturais, deve-se considerar o montante de material vegetal a ser empregado a fim de obter produtos isolados em quantidade suficiente para identificação e ensaios biológicos (cerca de 50 mg). Para o isolamento de substâncias presentes em pequena concentração no material vegetal seco (0,001%) é necessária uma grande quantidade planta (5 kg) (McCHESNEY *et al.*, 2007). Desta forma, o emprego de técnicas analíticas de extração e purificação que utilizem reduzidas quantidades (poucos gramas) de material vegetal é um caminho a ser explorado. Neste sentido, a extração com fluido supercrítico pode contribuir como método de preparo de amostra adequado e

eficiente (LANÇAS *et al.*, 1997).

A extração com fluido supercrítico é um processo extrativo que utiliza um fluido no estado supercrítico, frequentemente o dióxido de carbono. Esta técnica apresenta inúmeras vantagens, como utilizar um solvente não inflamável, atóxico e de fácil remoção do extrato. Além disso, se corretamente planejada, permite o isolamento seletivo de classes de compostos, evitando a necessidade de etapas adicionais de purificação dos extratos. Todas estas características são aliadas ao fato de ser uma técnica simples, envolvendo poucas etapas e com um rendimento superior às técnicas clássicas com tempo inferior de extração (LANÇAS, 2002).

A crescente demanda pela utilização de plantas no tratamento ou prevenção de doenças, bem como a exploração das mesmas visando à obtenção de substâncias de interesse, tem resultado em uma intensa exploração da flora nativa, o que pode levar à redução das populações naturais dessas espécies, colocando-as em risco de extinção (FRANÇA, 2003). Desta forma, torna-se de grande importância o desenvolvimento de métodos que possibilitem a extração de substâncias presentes em espécies vegetais de forma mais seletiva, com maior rendimento e ainda, utilizando quantidades reduzidas de material vegetal.

A abordagem deste trabalho foi o desenvolvimento de nova metodologia de extração de metabólitos ativos de *Hypericum polyanthemum* utilizando dióxido de carbono supercrítico, visando obter frações enriquecidas nos metabólitos ativos, sem a utilização de solventes orgânicos e com maior rapidez. Os extratos obtidos por esta metodologia, assim como os produtos isolados, foram avaliados quanto à ação antiparasitária, utilizando como modelo celular o protozoário *Trichomonas vaginalis*.

### **1.1 Espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil**

O gênero *Hypericum* L., pertencente à família Guttiferae (Clusiaceae), possui mais de 460 espécies, divididas em 30 seções. Algumas espécies são endêmicas, outras estão distribuídas mundialmente. Estas espécies possuem grande variabilidade, o que também se reflete na habilidade de sintetizar metabólitos bioativos. Porém, estas espécies possuem uma forte tendência a acumular

compostos fenólicos com padrão de substituição floroglucinol (ROBSON, 1990; 2006).

Aproximadamente vinte espécies do gênero *Hypericum* têm ocorrência natural no Brasil e concentram-se principalmente na região sul do país. Estas espécies pertencem à seção *Brathys* e *Trigynobrathys*. Esta última seção possui o maior número de representantes nativos (18 espécies), sendo *Hypericum piriái* Arechav. e *Hypericum gentianoides* (L.) Britton, os únicos dois representantes da seção *Brathys* (ROBSON, 1990).

Algumas das espécies nativas do Rio Grande do Sul (RS) foram avaliadas quanto à constituição química, verificando-se a produção de compostos fenólicos, tais como xantonas (ROCHA *et al.*, 1994), benzofenonas (BERNARDI *et al.*, 2005), benzopiranos (FERRAZ *et al.*, 2001), floroglucinóis (ROCHA *et al.*, 1995; FERRAZ *et al.*, 2002a; NÖR *et al.*, 2004), flavonóides e taninos (DALL'AGNOL *et al.*, 2003), bem como ausência de hipericina e derivados (FERRAZ *et al.*, 2002b), considerados juntamente com hiperforina, as substâncias marcadoras químicas de *Hypericum perforatum* L., espécie nativa da Europa, Ásia e África (BILIA *et al.*, 2002).

Além disso, algumas propriedades farmacológicas vêm sendo reveladas por estudos biológicos. Dentre estas, destacam-se aquelas demonstradas para os benzopiranos de *H. polyanthemum*: ação antitumoral (FERRAZ *et al.*, 2005a), antiproliferativa (GRIVICICH *et al.*, 2008), atividade inibitória da monoamina oxidase (IMAO) (GNERRE *et al.*, 2001), antimicrobiana (DALL'AGNOL *et al.*, 2005) e antinociceptiva (HAAS *et al.*, 2010). Entre os derivados de floroglucinol isolados, uliginosina B de *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002a), *H. carinatum* e *H. polyanthemum* (NÖR *et al.*, 2004) apresentou atividade antimicrobiana (DALL'AGNOL *et al.*, 2005); hiperbrasilol B, presente em *H. caprifoliatum*, *H. connatum* (NÖR *et al.*, 2004) e *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995), assim como japonicina A, isolada de *H. myrianthum*, também possuem ação antimicrobiana (ROCHA *et al.*, 1995; DALL'AGNOL *et al.*, 2005). Além dos produtos isolados, muitos extratos e frações vêm apresentando atividades interessantes, como acaricida (RIBEIRO, *et al.*, 2007), antiviral (SCHMITT *et al.*, 2001; FRITZ *et al.*, 2007), analgésica (VIANA *et al.*, 2003), antifúngica (FENNER *et al.*, 2005), antioxidante (BERNARDI *et al.*, 2008a), antiproliferativa (FERRAZ *et al.*, 2005b), e tipo

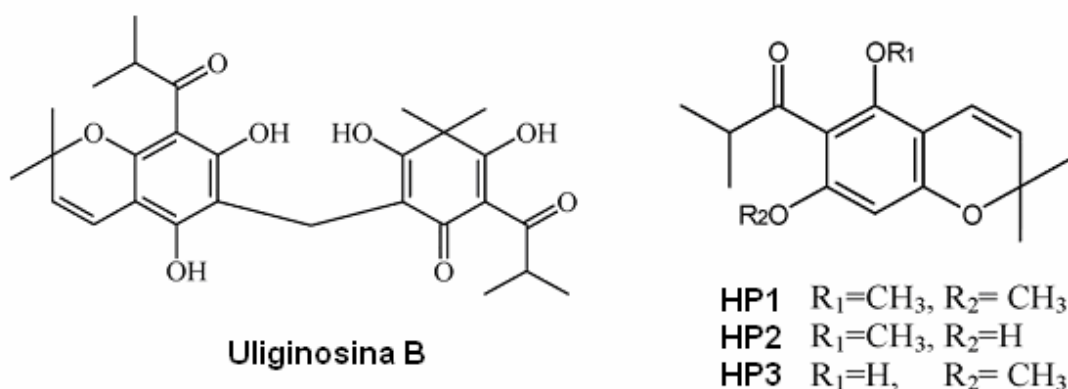
antidepressiva (VIANA *et al.*, 2003; 2006), de modo que a continuidade nos estudos, tanto químicos quanto biológicos, dessas espécies de *Hypericum* se faz necessária.

## 1.2 *Hypericum polyanthemum*

*Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Figura 1) apresenta como principais metabólitos secundários o derivado de floroglucinol uliginosina B, e os três benzopiranos: 6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP1), 7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) e 5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP3) (FERRAZ *et al.*, 2001; NÖR *et al.*, 2004) (Figura 2).



**Figura 1.** *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt.



**Figura 2.** Estrutura química do derivado de floroglucinol uliginosina B e dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3.

Embora as diversas espécies de *Hypericum* nativas do RS apresentem rica composição fitoquímica, os resultados obtidos com *H. polyanthemum* demonstram sua relevância como potencial recurso medicinal natural. Dentre todas as atividades relatadas no item 1.1, estudos destacam o efeito antinociceptivo de compostos isolados desta espécie, atividade mais importante no ponto de vista farmacológico. Inicialmente, o extrato *n*-hexano apresentou tal efeito mediado pelo sistema opióide (VIANA *et al.*, 2003) e, em um segundo momento, estudos mostraram que o floroglucinol uliginosina B, investigado por esta atividade, não atuava por este mecanismo de ação (STOLZ *et al.*, 2008). Na sequência, os benzopiranos também foram analisados e HP1 demonstrou ser o responsável pela ação mediada pelo sistema opióide (HAAS *et al.*, 2010).

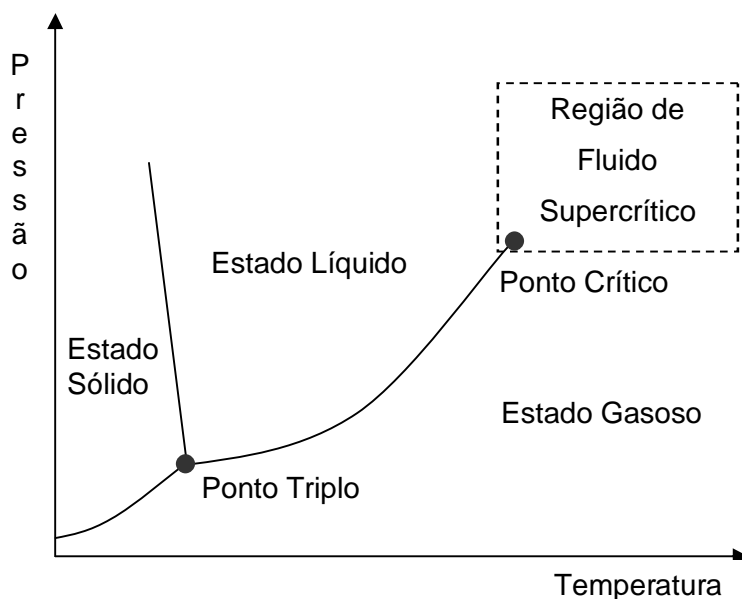
O destacado potencial terapêutico demonstrado por extratos apolares e substâncias isoladas de *H. polyanthemum* levou ao desenvolvimento de protocolos de cultivo otimizados para a espécie e de metodologias que aumentem o rendimento dos metabólitos ativos. A micropropagação foi realizada a partir de plantas coletadas em Caçapava do Sul, RS (BERNARDI *et al.*, 2007), e o posterior cultivo a campo conduzido com sucesso (BERNARDI *et al.*, 2008b). Estes estudos mostraram que as plantas cultivadas são capazes de manter a biossíntese dos benzopiranos, bem como a de outros compostos fenólicos. Já a extração com fluido supercrítico (SFE) surgiu como uma alternativa ao uso de solventes orgânicos à baixas pressões, que objetiva o enriquecimento dos metabólitos ativos de *H. polyanthemum* por ser mais seletiva. SFE utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente apresenta inúmeras vantagens, além da baixa polaridade do CO<sub>2</sub> sugerir seu uso na extração de compostos lipofílicos, como benzopiranos e derivados de floroglucinol (RÖMPP *et al.*, 2004; GLISIC *et al.*, 2008). Os resultados obtidos pelo emprego desta metodologia serão abordados no manuscrito I.

### **1.3 Extração com Fluido Supercrítico**

Em 1879, Hannay e Hogarth's fizeram as primeiras observações da dissolução de solutos utilizando fluido supercrítico. No entanto, a extração com fluido supercrítico começou a ser realizada comercialmente apenas no final da década de 70, na descafeinação de café e chá. A sua maior aplicabilidade tem sido na indústria de alimentos, porém, uma série de novas aplicações vem sendo explorada,

incluindo fracionamento de óleos essenciais e lipídeos, extração de compostos bioativos de plantas e algas marinhas, processamento de biomateriais, engenharia de partículas de materiais farmacêuticos (micro e nanopartículas), remoção de metais pesados e pesticidas do solo, entre outras (PASQUALI *et al.*, 2006; REVERCHON e DE MARCO, 2006; HERRERO *et al.*, 2010).

A extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extration*) consiste em um processo extrativo que emprega como solvente extrator um fluido no estado supercrítico (Figura 3). Este estado é obtido através de um aumento simultâneo da temperatura e da pressão da substância, normalmente dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), produzindo uma modificação na sua densidade e, como consequência, de seu poder de solvatação, o que permite uma melhor solubilização de solutos de interesse (LANÇAS, 2002).



**Figura 3.** Diagrama pressão *versus* temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido, gasoso e supercrítico (Fonte: CASSEL *et al.*, 2008).

As propriedades físico-químicas de um fluido no estado supercrítico são intermediárias àquelas dos gases ou dos líquidos e, muitas vezes, se aproximam às melhores características de cada um como, por exemplo, o alto poder de solvatação de um líquido e a baixa viscosidade de um gás (CARRILHO *et al.*, 2001).

Há muitas variáveis a se considerar no desenvolvimento de um método de extração com fluido supercrítico. Devem-se lançar mão de dados experimentais, análise termodinâmica, procedimentos de modelagem matemática para o equilíbrio de fases, entre outros. O desenho de processos que utilizam solventes supercríticos é fortemente dependente do equilíbrio de fases, o qual é altamente sensível a mudanças nas condições operacionais. Portanto, a engenharia do equilíbrio de fases desempenha um papel fundamental neste processo (HERRERO *et al.*, 2010).

A seleção de condições de operação depende do composto específico ou família de compostos a ser extraído. O peso molecular, polaridade e termolabilidade dos compostos devem ser levados em consideração no desenvolvimento de um protocolo de extração. No caso de compostos termolábeis, é aconselhável que a temperatura utilizada na SFE seja entre 35 e 60 °C. Fixando-se a pressão, o aumento de temperatura irá diminuir a densidade do CO<sub>2</sub>, reduzindo o seu poder de solvência, mas aumenta a pressão de vapor dos compostos a serem extraídos, levando a uma maior tendência de estes compostos passarem para a fase fluída. Neste caso, a natureza da amostra irá definir o sucesso da extração. Se o soluto for não-volátil, um aumento de temperatura pode resultar em uma menor taxa de extração devido a uma redução na solubilidade. Por outro lado, se o soluto for volátil, há uma competição entre a solubilidade do CO<sub>2</sub>, que diminui com o aumento da temperatura, e sua volatilidade, que aumenta com o aumento da temperatura (REVERCHON e DE MARCO, 2006; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Embora a temperatura seja um parâmetro importante na SFE, a pressão de extração é o mais relevante, pois pode ser usado para ajustar a seletividade do fluido. Quanto maior a pressão, maior é o poder solvente e menor a seletividade da extração. Outros parâmetros cruciais para otimizar o rendimento de extração são: vazão de CO<sub>2</sub>, tamanho de partícula da matriz e tempo de extração. É importante maximizar o tempo de contato do fluido com a matriz, a fim de aumentar a eficiência da extração. Este parâmetro está relacionado com a taxa de vazão do CO<sub>2</sub>, pois quanto menor a velocidade do fluido, menor a vazão, mais tempo o fluido ficará em contato com a amostra e mais profundamente ele penetrará na matriz, resultando em maior rendimento da extração. Em geral, o menor tamanho de partícula gera



uma maior área de superfície e reduz o comprimento de difusão do solvente, o que é benéfico para a extração. Porém, partículas muito pequenas, podem resultar em extração heterogênea devido à formação de canais na matriz, e como consequência, perda de eficiência e rendimento do processo (REVERCHON e DE MARCO, 2006; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

A obtenção de compostos presentes em produtos naturais empregando o processo de extração supercrítica, consiste na extração de princípios ativos da matriz sólida através da solubilização dos mesmos em um solvente nas condições supercríticas. Este processo abrange duas etapas principais: etapa de dissolução de solutos na matriz vegetal e etapa referente ao seu transporte da fase sólida para a fase fluida. Na etapa de extração o solvente percola o leito fixo de partículas sólidas e dissolve os compostos de interesse presentes na matéria-prima. A matriz sólida absorve o solvente supercrítico e, em paralelo, os compostos a serem extraídos são dissolvidos no solvente. Estes compostos dissolvidos são transportados para a superfície do sólido através de um mecanismo de difusão. Através da interface sólido-fluido se processa a transferência dos compostos extraídos para fase fluida. Esta transferência é regulada pelo equilíbrio de fases sólido-fluido. Os princípios ativos dissolvidos no fluido supercrítico seguem em direção à etapa de expansão, momento no qual ocorre a precipitação do soluto devido à passagem do solvente do estado supercrítico para o estado gasoso. A facilidade na qual ocorre a separação solvente-soluto é um dos motivos que inserem a extração supercrítica como importante operação unitária aplicada o setor fitofarmacêutico (CASSEL *et al.*, 2008).

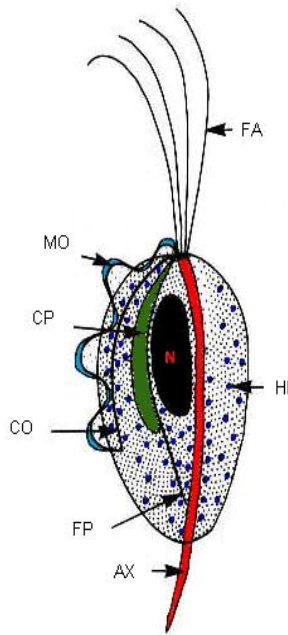
A SFE possui inúmeras vantagens quando comparada às técnicas clássicas de extração, como extração líquido-líquido, maceração estática, entre outras. Uma das principais vantagens é decorrente ao uso do CO<sub>2</sub> como agente extrator, o qual é praticamente atóxico, não inflamável, possui custo razoavelmente baixo, é de fácil reciclo após o uso e despressurização (tecnologia limpa), e atinge o estado supercrítico em condições relativamente amenas (Temperatura crítica: 31 °C e Pressão crítica: 73 atm). Sendo um gás nas condições normais (pode ser operado em baixas temperaturas), é fácil de ser eliminado ou reaproveitado ao concluir-se a extração, fazendo com que o extrato já esteja pronto para a análise, evitando a

degradação de substâncias termolábeis. Este fato é de grande relevância por permitir a concentração do analito durante a etapa de extração, evitando posteriores manipulações da amostra para eliminação do solvente (LANÇAS, 2002; HERRERO *et al.*, 2010).

Muitas espécies vegetais vêm sendo submetidas ao processo de extração com fluido supercrítico, como por exemplo, *Baccharis dracunculifolia* (CASSEL *et al.*, 2000), *Foeniculum vulgare* (Díaz-Maroto *et al.*, 2005) e *Garcinia mangostana* (ZARENA e UDAYA SANKAR, 2009). Porém, até o momento, existem poucos dados na literatura apresentando resultados de SFE de plantas do gênero *Hypericum* (CUI e ANG, 2002; RÖMPP *et al.*, 2004; SEGER *et al.*, 2004; GLISIC *et al.*, 2008). Uma importante vantagem da extração de metabólitos secundários deste gênero por esta metodologia é que devido à baixa polaridade do CO<sub>2</sub>, há maior seletividade por constituintes lipofílicos (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007), levando à extração seletiva e em elevado rendimento de substâncias com características apolares, o que sugere a sua aplicabilidade na extração de benzopiranos e derivados de floroglucionol, metabólitos presentes em *H. polyanthemum*.

#### **1.4 *Trichomonas vaginalis*: parasito patogênico**

*Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado, anaeróbio facultativo, que tem a capacidade de formar pseudópodes, apresentando um corpo celular muito plástico (9,0 x 7,0 µm), adotando forma elipsóide, piriforme ou oval. O *T. vaginalis* possui: quatro flagelos anteriores; um flagelo recorrente que está aderido ao corpo do parasito pela costa, formando a membrana ondulante; uma estrutura de microtúbulos formando o axóstilo, que percorre longitudinalmente a célula e ao longo do qual se distribuem os hidrogenossomos (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990) (Figura 4). Quando interage com células epiteliais, o *T. vaginalis* altera o formato de seu corpo, assumindo forma amebóide, apresentando interdigitações com as células do hospedeiro, em um íntimo contato, e possivelmente, em continuidade (FURTADO e BENCHIMOL, 1998).



**Figura 4.** Características morfológicas de *Trichomonas vaginalis*. FA: flagelos anteriores, MO: membrana ondulante, CP: corpo parabasal, CO: costas, N: núcleo, FP: filamento parabasal, HI: hidrogenossomos, AX: axóstilo (Adaptado de: <http://www.learnerhelp.com/vaginitis.html>).

O núcleo celular é proeminente e possui hidrogenossomos, organelas produtoras de energia que estão presentes como grânulos cromáticos e osmiofílicos, localizados junto à costa e/ou axóstilo (SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Ao contrário da maioria dos eucariotos, o protozoário não apresenta mitocôndria e utiliza os hidrogenossomos para realizar o metabolismo fermentativo dos carboidratos, com o hidrogênio como aceptor de elétrons (MÜLLER, 1993).

O estabelecimento de *T. vaginalis* na vagina se inicia com o aumento do pH, visto que o pH normal da vagina é ácido (3,8 a 4,5) e o organismo cresce em pH maior que 5,0. Além disso, ocorre uma concomitante redução de *Lactobacillus acidophilus* e aumento na proporção de bactérias anaeróbias (MACIEL *et al.*, 2004).

A interação parasito-hospedeiro é um processo complexo, no qual estão envolvidos componentes associados à superfície celular do parasito, às células epiteliais do hospedeiro e componentes solúveis encontrados nas secreções uretral e vaginal (LEHKER e ALDERETE, 2000). O *T. vaginalis* atinge o parasitismo por vários mecanismos, porém a capacidade de citoaderência é uma das principais vias.

O parasito precisa se aderir às células epiteliais do hospedeiro para estabelecer e manter a infecção e isso é possível devido à presença de adesinas no seu glicocálix (ALDERETE *et al.*, 1995; BASTIDA-CORCUERA *et al.*, 2005), que parecem interagir com as células do hospedeiro via interações do tipo receptor-ligante (KUCKNOR *et al.*, 2005). Cerca de quatro moléculas antigênicas de superfície também estão relacionadas à adesão do parasito às células epiteliais vaginais e essas moléculas têm sua expressão regulada durante o ataque às células do hospedeiro (ARROYO *et al.*, 1993; GARCIA e ALDERETE, 2007).

Nas mucosas, como o trato genital feminino, o sistema imune desempenha um importante papel na homeostasia, lançando mão de seus mecanismos inatos e adaptativos para lidar com a constante exposição à microrganismos patogênicos e alérgenos (CHAPLIN, 2010). Após o parasito colonizar o sítio de infecção, o escape da resposta imune do hospedeiro por distintos mecanismos torna-se fundamental para o estabelecimento do parasitismo. Ocorre um revestimento da superfície do tricomonas com proteínas e macromoléculas do hospedeiro, evitando assim, o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (PETERSON e ALDERETE, 1982). Outra estratégia é a degradação de imunoglobulinas e fatores do sistema complemento do hospedeiro, através da secreção de cisteínas-proteinases (PROVENZANO e ALDERETE, 1995), e remoção (fagocitose) dos lactobacilos logo após a infecção por *T. vaginalis*, anulando o efeito da microbiota normal, que produz peróxido de hidrogênio, substância capaz de neutralizar as cisteínas-proteinases (RENDÓN-MALDONADO *et al.*, 1998). Além disso, o parasito é capaz de fazer alterações fenotípicas, alternando a expressão de antígenos de superfície, como a proteína imunogênica P270 (LÓPEZ *et al.*, 2000).

O *T. vaginalis* é um patógeno de mucosa causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Estima-se a ocorrência de 170 milhões de novos casos por ano, valores superiores à prevalência de outros microrganismos de transmissão sexual, como por exemplo, *Chlamydia trachomatis* (92 milhões) e *Neisseria gonorrhoeae* (62 milhões) (WHO, 2001; JOHNSTON e MABEY, 2008). Diferentemente dessas infecções bacterianas, que acometem mais mulheres jovens, a tricomonose apresenta maior prevalência em

homens e mulheres com mais idade (BOWDEN *et al.*, 1999; MILER *et al.*, 2005).

Dentre as complicações da tricomonose pode-se destacar nascimento prematuro e baixo peso de recém-nascidos (COTCH *et al.*, 1991; 1997); aumento da predisposição de mulheres à doença inflamatória pélvica, câncer cervical e infertilidade (GRODSTEIN *et al.*, 1993; ZHANG e BEGG, 1994; VIKKI *et al.*, 2000). O *T. vaginalis* está associado a graves problemas de saúde, uma vez que há evidências que ele aumenta a transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (VAN DER POL *et al.*, 2008). Desta forma, este parasito pode ter um papel crítico na amplificação da transmissão do HIV.

A doença causada pelo *T. vaginalis* apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas. Os sinais e sintomas dependem das condições de cada indivíduo, da agressividade e da carga parasitária infectante (MACIEL *et al.*, 2004). Homens são, na maioria das vezes, assintomáticos, o que facilita a transmissão da doença, e podem ter somente uma infecção auto-limitada (KRIEGER *et al.*, 1993; LEHKER e ALDERETE, 2000). Em mulheres, o sintoma clássico da doença, embora ocorra em somente 10-20% das pacientes infectadas, é corrimento amarelo, abundante, espumoso e mucopurulento, além de odor vaginal anormal e prurido vulvar (LEHKER e ALDERETE, 2000). A vagina e a cérvix podem apresentar sintomas inflamatórios específicos para tricomonose (2 a 5% dos casos), com erosão e pontos hemorrágicos na parede cervical, sinal conhecido como *colpitis macularis* ou cérvix com aspecto de morango (MILER *et al.*, 2005).

Embora a primeira descrição da ocorrência de *T. vaginalis* em secreção vaginal tenha ocorrido em 1836, sendo, em 1940, reconhecido causador de corrimento vaginal com transmissão através de relação sexual (HUPPERT, 2009), o diagnóstico clínico e laboratorial da tricomonose continua apresentando inúmeras dificuldades, principalmente porque os exames utilizados no diagnóstico apresentam baixa sensibilidade.

Desde meados de 1954, utiliza-se o metronidazol como fármaco de escolha no tratamento da tricomonose. O metronidazol é um derivado nitroimidazólico, que penetra na célula através de difusão e tem o grupamento nitro reduzido pela enzima piruvato ferredoxina óxido redutase (PFOR), que em *T. vaginalis* estão localizadas

nos hidrogenossomos. Essa redução produz intermediários instáveis, quimicamente reativos, os quais quelam o DNA e provocam a morte seletiva das células anaeróbias (MENDZ e MÉGRAUD, 2002).

O largo emprego e, muitas vezes, o uso indiscriminado do metronidazol, têm levado uma emergente seleção de isolados de *T. vaginalis* resistentes. Em 2004, a agência regulatória norte americana, Food and Drug Administration (FDA), aprovou o uso de outro nitroimidazólico para o tratamento da tricomonose, o tinidazol. Porém, existe a preocupação que ocorram isolados resistentes a este fármaco também, visto que o mesmo possui mecanismo de ação igual ao metronidazol. Desta forma, surge a necessidade de pesquisas visando à obtenção de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da tricomonose. Assim, este trabalho tem o objetivo de verificar a atividade anti-*T. vaginalis* de produtos naturais, visando a obtenção de protótipos de novos fármacos que atuem como tricomicida.

## 2. OBJETIVOS

---

Visto que produtos naturais são importantes fontes de compostos bioativos, os objetivos deste trabalho foram: validar uma metodologia de extração e enriquecimento de substâncias ativas de *Hypericum polyanthemum*, e verificar a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* de extrato obtido por essa metodologia, bem como dos produtos isolados.

Os objetivos específicos propostos foram:

1. Verificar se o método de extração com fluido supercrítico (SFE) é adequado e capaz de enriquecer de forma significativa os extratos de *H. polyanthemum*;
2. Realizar extrações utilizando dióxido de carbono supercrítico em diferentes temperaturas e pressões, objetivando verificar qual é a melhor condição de extração dos metabólitos bioativos através de quantificação dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência;
3. Fazer o isolamento, a partir dos extratos obtidos por SFE, dos compostos bioativos de *H. polyanthemum*;
4. Testar a atividade de uma fração de *H. polyanthemum* obtida por SFE e dos compostos isolados frente o protozoário patogênico *Trichomonas vaginalis*;
5. Investigar possíveis mecanismos de ação dos compostos que se mostrarem ativos;
6. Avaliar a citotoxicidade dos compostos frente a células de mamíferos, utilizando como modelo células epiteliais de rim de macaco verde africano (VERO).





Visando ordenar os conteúdos estudados, os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de manuscritos:

- I) “Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*.”
- II) “Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid and its isolated compounds.”



### 3. Manuscrito I

---

“Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*.”

Artigo publicado na Revista Journal of Chromatography B.  
([doi:10.1016/j.jchromb.2009.11.012](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.012))



**Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum***

Simone Tasca Cargnin<sup>a</sup>, Jéssica de Matos Nunes<sup>a</sup>, Juliana Schulte Haas<sup>a</sup>, Luís Fernando Baladão<sup>b</sup>, Eduardo Cassel<sup>b</sup>, Rubem Figueiró Vargas<sup>b</sup>, Sandra Beatriz Rech<sup>a</sup>, Gilsane Lino von Poser<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, 90610.000 - Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 277, 90619.900 - Porto Alegre, RS, Brazil.

---

\* Corresponding author: Tel.: +55 51 33085529; Fax: +55 51 33085437.

*E-mail address:* [gilsane@farmacia.ufrgs.br](mailto:gilsane@farmacia.ufrgs.br) (G.L. von Poser).



## Abstract

The aerial parts of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferae) were successively extracted with supercritical carbon dioxide (SC CO<sub>2</sub>) under pressures of 90, 120, 150 and 200 bar at different temperatures (40, 50 and 60 °C), and compared with the *n*-hexane extract obtained by ultrasound-assisted extraction. The samples obtained were examined regarding extraction yield and HPLC quantification of the main secondary metabolites, the benzopyrans HP1 (6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylbenzopyran), HP2 (7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran) and HP3 (5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl) and the phloroglucinol derivative, uliginosin B. SFE presented higher selectivity than the *n*-hexane maceration, and the best condition to extract the target metabolites has been determined to be at 50 °C and for the high molecular-weight compound, uliginosin B, higher pressures was required.

**Keywords:** Supercritical extraction; *Hypericum*; Benzopyrans; Phloroglucinol derivative; Herb processing.





## 1. Introduction

*Hypericum* genus is represented in South Brazil by approximately 20 species, found in small disperse populations or restricted to a single locality. Among them, *Hypericum polyanthemum* showed in its lipophilic extract the presence of uliginosin B, a phloroglucinol derivative, and three benzopyrans: 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylbenzopyran (HP1), 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran (HP2) and 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran (HP3), isolated from aerial plant parts [1,2]. These substances have been found to be involved with some biological properties as antiviral [3], antimicrobial [4], antinociceptive [5], antitumor [6,7], acaricidal [8] and antioxidant [9], presented by the plant extracts.

Although the *H. polyanthemum* extracts and isolated compounds demonstrated different activities, the antinociceptive effect is the most relevant from the pharmacological point of view. The *n*-hexane extract presented such effect mediated by the opioid system [5] and further studies showed that the phloroglucinol derivative uliginosin B, investigated for this activity, is not mediated by the opioid system [10]. Therefore, the benzopyrans were evaluated and HP1 demonstrated to be responsible for the opioid-mediated mechanism [11].

Due to the highly restricted distribution and the therapeutic potential, protocols for *in vitro* [12] and *ex vitro* [13] propagation of *H. polyanthemum* were established and the HPLC analysis revealed that the benzopyrans (HP1, HP2 and HP3) and uliginosin B isolated from field grown plants are also accumulated in micropropagated and acclimatized plants. Nevertheless, in addition to culture conditions optimization, the extraction process is crucial for the enhancement of bioactive substances levels.

Numerous factors influence the chemical quality of medicinal plants from crop establishment to extraction of raw material [14]. Various types of extraction can be applied to the plant material resulting in significant changes in the concentrations and proportions of active components affecting safety and benefits [15].

Supercritical fluid extraction (SFE) is a technique used for separation processes,

where the solvent generally used, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), is not toxic, non explosive, of low cost and easily removed from the extract. Furthermore, the supercritical fluid has properties such as high diffusivity, low viscosity and low surface tension, which confers attractive characteristics as a solvent for the extraction of components from the solid matrix [16]. The advantages of carbon dioxide under supercritical conditions ( $P > 73$  bar;  $T > 31$  °C) also include the selectivity [17] and the non degradation of thermolabile compounds [18].

Various natural extracts containing bioactive compounds can be obtained using supercritical extraction procedures [19-22], which afford a simple, inexpensive, fast, effective and virtually solvent-free sample pretreatment technique. Majority of analytical SFE are performed with CO<sub>2</sub> for the several practical reason cited above. Due to its low polarity, it shows a great selectivity for lipophilic compounds [23,24], which suggests applicability for benzopyrans and phloroglucinol derivatives extraction. Nevertheless, pressure and temperature changes through extraction process modify the CO<sub>2</sub> density and alter the supercritical fluid selectivity as well as the solubility of the substance under extraction by this solvent, affecting the yield and presence of the compounds in the resulting extracts. Therefore, the extraction of specific components from medicinal plants requires research concerning the conditions [21], which give a high yield of total extract and high content of desired pharmacological active compounds.

Intending to establish an efficient benzopyrans and uliginosin B extraction method, the objective of this study was to determine the influence of SFE using CO<sub>2</sub> as fluid on the yield of total extract of aerial parts of *H. polyanthemum*, under successively increased pressures and different temperatures. Additionally, bioactive compounds contents resulted from the different treatments were quantified by HPLC means and compared to those obtained from the *n*-hexane extract of the plant.

## **2. Experimental**

## 2.1. Plant material

Plants of *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt were harvested during its flowering stage, in Guaritas, Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil, in October, 2008. Voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) (*Hypericum polyanthemum*, Bordignon *et al.* 1405). Plant material was carefully dried and powdered to obtain the *n*-hexane extract and to submit to the SFE with CO<sub>2</sub>.

## 2.2. Preparation of the extracts

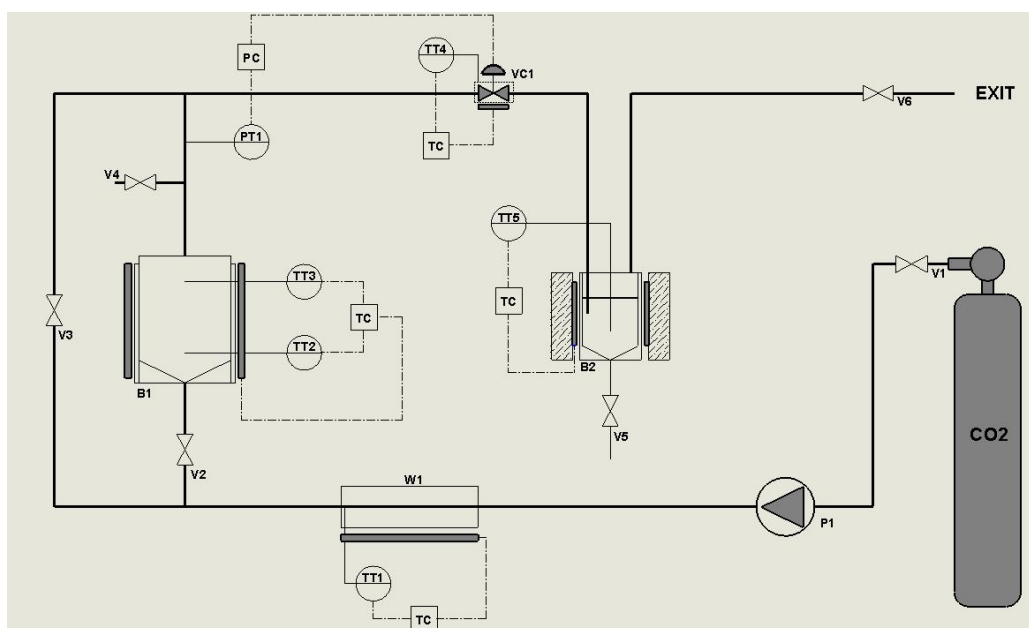
### 2.2.1. *n*-Hexane extract

Powdered aerial parts (0.05 g DW) were extracted 15 times during 20 min with 5 mL of *n*-hexane in an ultrasonic bath (Ultrasonic, São Paulo, Brazil) until colorless liquid extract was obtained. Each triplicate sample was evaporated to dryness under reduced pressure.

### 2.2.2. Supercritical extraction

Supercritical extractions were carried out on pilot-scale automated equipment (Fig.1) previously described [25]. The extraction vessel is supplied with a heating jacket and an automated temperature controller. Heating tapes were used throughout the apparatus to maintain constant temperature in the extraction section. To ensure constant and steady solvent delivery the pump head was cooled by a circulating fluid, which passes through a chiller. Flow rates and accumulated gas volumes passing through the apparatus were measured using a flowmeter assay, 1-300 g min<sup>-1</sup> (Thar 06618-2, USA). Ke (USA) micrometering valves (VC1) were used for flow control throughout the apparatus. Heating tapes with automated temperature controller were also used around this valve to prevent both freezing of the solvents and solid solute precipitation following depressurization. Pressure in the extractor was monitored with a digital transducer system, Novus 8800021600, acquired from Novus Produtos Eletrônicos (Brazil) with a precision of ± 1.0 bar. The temperature controller (TC) was connected to thermocouples (PT-100), with an accuracy of 0.5K. Powdered aerial plant material (180 g DW) was used and the extractions were conducted at different temperatures (40, 50, and 60 °C) while the pressures ranged

from 90 to 200 bar. SC CO<sub>2</sub> extraction was successively performed at 90, 120, 150 and 200 bar, collecting the samples of each pressure after 80, 40, 40 and 55 minutes, respectively. In each extraction pressure the end of the process was confirmed when no variation in mass extract was observed after 30 minutes (3 x 10 minutes). The supercritical carbon dioxide flowed at rate of  $6.67 \times 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}$  through the extraction vessel.



**Fig 1.** Schematic diagram of the experimental apparatus: P1 - high pressure pump; W1 - preheater; B1 - extraction vessel; B2 - separation vessel; VC1 - micrometering; TC - temperature controllers, V1 - V6 - sphere valves.

### 2.3. HPLC analysis

Extracts obtained by *n*-hexane ultrasound-assisted maceration and supercritical fluid technique were treated with acetone in order to remove waxes and insoluble impurities, evaporated to dryness and dissolved in HPLC grade methanol, filtered (0.22 μm pore size, Merck) and analyzed by high performance liquid chromatography.

### 2.3.1 Benzopyrans determination

HP1, HP2 and HP3 analysis were performed according to the method previously described [12] using a Waters 600 pump and a Waters 2487 dual  $\lambda$  absorbance detector set to 220 and 270 nm. The separation was carried out with an isocratic solvent system (60% CH<sub>3</sub>CN, 40% H<sub>2</sub>O) through a Waters Nova-Pack C18 column (4  $\mu$ m, 3.9 x 150 mm) adapted to a guard column Waters Nova-Pack C18 60A (3.9 x 20 mm) and flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>.

### 2.3.2 Uliginosin B determination

Uliginosin B yield was determined using the same equipment under isocratic solvent condition (95% CH<sub>3</sub>CN, 5% H<sub>2</sub>O, 0.01% TFA), flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> and detection at 220 nm. For quantification, excellent linearity (found in the concentration range between 2 and 800  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, with high reproducibility and accuracy) of the calibration curve was achieved ( $r^2 > 0.999$ ). For intra-assay determination, three replicates of eight concentrations of the analyte were used. The detection limit of the compound was 5.38  $\mu$ g/mL and for quantitative analysis, peak areas were used to calculate the amount of uliginosin B present in the extracts and compared to standard isolated from the aerial parts of *in natura* *H. polyanthemum*. The identification was made on the basis of the ultraviolet absorption spectra and retention time (21.76 min).

### 2.4 Statistical analysis

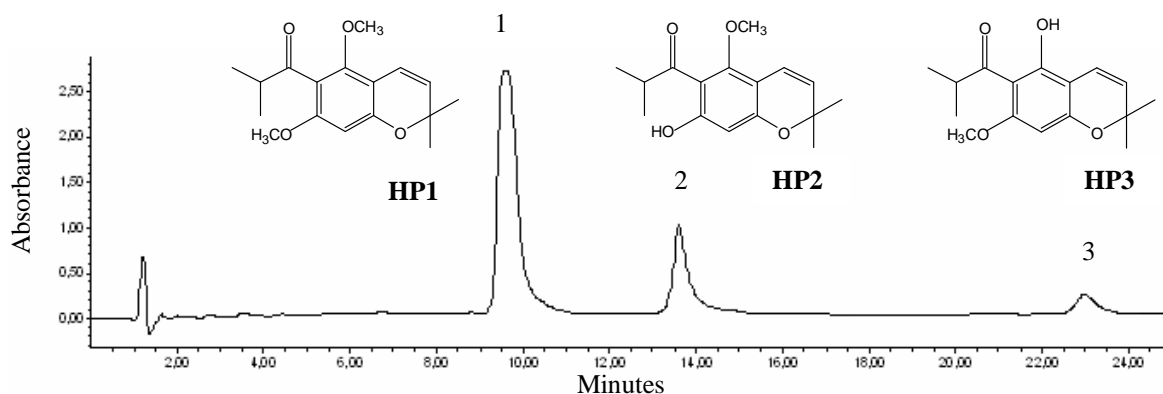
Means difference among each extraction condition was tested for significance by ANOVA using a probability value of  $P < 0.05$ . Tukey test was used to indicate mean separation among these conditions (SPSS Software, version 10).

## 3. Results and discussion

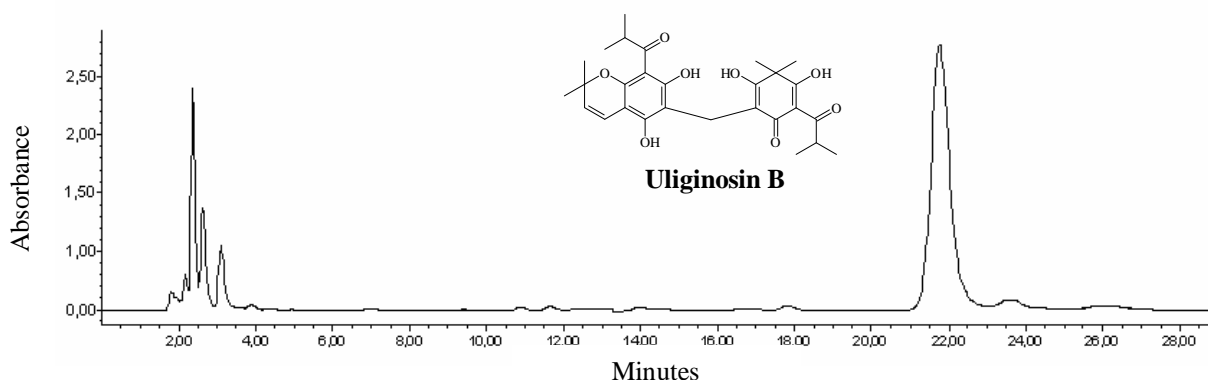
The performance goals of SFE with CO<sub>2</sub> are to reduce the use of hazardous chemicals, the extraction time and enrich the bioactive compounds contents [19-22]. This fact promotes a nontoxic condition of the process and leads to extracts without

residues. The advantages presented justify the SFE technology application to obtain extracts from plants with regard to *n*-hexane extraction. To examine the effect of temperature and pressure on extraction yield and benzopyrans and uliginosin B contents of the resulting *H. polyanthemum* extracts, SC CO<sub>2</sub> extraction was successively performed at 90, 120, 150 and 200 bar and at 40, 50 or 60 °C.

The *H. polyanthemum* lipophilic extracts, besides the dominating benzopyrans and phloroglucinol derivative, mainly contain alkanes, fatty acids and wax esters. In fact, the occurrence of alkanes in *Hypericum* species is noteworthy [23] and these compounds were found in all the investigated native species [26]. To obtain purified extracts, each fraction was treated with acetone, producing an insoluble fatty residue, containing epicuticular waxes, which was eliminated through a paper filtration. This is a well established procedure which is efficient to eliminate these undesirable components [27]. After this procedure, the HPLC analysis of the fractions showed the presence of the three benzopyrans (Fig. 2) and of uliginosin B (Fig. 3) isolated from *in natura* *H. polyanthemum* [1,2].



**Fig 2.** HPLC profile of benzopyrans (1) HP1, (2) HP2 and (3) HP3 from the CO<sub>2</sub> SFE fraction obtained at 60 °C temperature and 120 bar pressure. Conditions used: Waters Nova-Pack C18 column (4 μm, 3.9 x 150 mm) adapted to a guard column Waters Nova-Pack C18 60A (3.9 x 20 mm); isocratic solvent system (60% CH<sub>3</sub>CN; 40% H<sub>2</sub>O); flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>; injection volume of 20 μL; detection performed at 270 nm at room temperature.



**Fig 3.** HPLC profile of uliginosin B from the CO<sub>2</sub> SFE fraction obtained at 50 °C temperature and 150 bar pressure. Conditions used: Waters Nova-Pack C18 column (4 μm, 3.9 x 150 mm) adapted to a guard column Waters Nova-Pack C18 60A (3.9 x 20 mm); isocratic solvent system (95% CH<sub>3</sub>CN; 5% H<sub>2</sub>O; 0.01% TFA); flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>; injection volume of 20 μL; detection performed at 220 nm at room temperature.

The total extraction contents obtained with successive increase of pressure and different temperatures were 30.01 mg/g (40 °C), 22.15 mg/g (50 °C), 17.39 mg/g (60 °C), while the *n*-hexane extraction afforded an amount of 23.40 mg/g (Table 1). Although the yield achieved by the *n*-hexane ultrasound-assisted extraction was equivalent or superior those obtained with SFE at 50 and 60 °C, respectively, these fractions were richest than the *n*-hexane extract regarding the metabolite concentrations. For example, the best supercritical conditions for the extraction of the two most important bioactive compounds afforded concentrations more than 3-fold higher for HP1 (60 °C, 120 bar) and 5-fold higher for uliginosin B (50 °C, 150 bar) when compared to the *n*-hexane extraction (Table 1). Furthermore, it is important to highlight that, except for the HP3 content, the superior extract yield obtained with the organic solvent was not enough to provide higher quantity of the analyzed metabolites. This fact suggests that the SFE was more selective than the conventional technique to obtain the target metabolites, probably due to the differences of the extractor polarity mean and the affinity to the solute, providing a rentable source of bioactive metabolites.

The contents of HP1, HP2, HP3 and uliginosin B obtained in the supercritical fluid extraction process showed a different concentration trend with pressure increase as well as temperature variation (Table 1). Higher total yields of HP1 (368

mg/100 g plant) was obtained at 40 °C, being 65% of this amount obtained at 90 bar. Nevertheless, calculating on the basis of the percentage of extract, the HP1 richest fraction (ca. 373.2 mg/g) was verified at 60 °C and 120 bar. Higher total yields of HP2 (272 mg/100 g plant) was obtained at 50 °C, being half of this amount obtained at 120 bar. Coincidentally, this condition afforded a fraction with high concentration of the compound (213.2 mg/g).

A similar profile was observed at 60 °C/120 bar (202.4 mg/g), even though the total extraction of HP2 at this temperature was inferior to the amount achieved at 50 °C. The same behavior reported for HP2 was observed in the extraction of HP3 (Table 1).

For the uliginosin B extraction, the pressure of 90 bar and temperature of 40 °C afforded high amounts of the metabolite (184 mg/100 g plant). Nevertheless, considering the total amount recovered at the 50 °C experiment it can be seen that the increase of temperature and pressure had a determinant role in extraction yields (Table 1). It is interesting to point out that the temperature of 50 °C was also found to be the optimum condition for the extraction of phloroglucinols from *H. perforatum* using supercritical carbon dioxide [28].

The results obtained in this work indicated that when higher temperatures are used (i.e. 50 °C and 60 °C) higher pressures are necessary to obtain uliginosin B, due to its higher molecular-weight. As demonstrated in Table 1, at 60 °C this compound was detected only at the pressure of 150 bar. Therefore, the extraction of uliginosin B at higher temperatures strongly depends on the CO<sub>2</sub> density. These results are in accordance with the reports of studies with other medicinal plants where higher-molecular-weight compounds are extracted in larger quantities at the end of the extraction process [24].

Taking into account the total amount of the benzopyrans and phloroglucinol derivative in the experiments performed at successive increased pressures and different temperatures, it was observed that the increase of temperature leads to a decrease in the mass amount of extract (g/100g) and an increase of HP1, HP2, HP3 and uliginosin B concentration. The total concentration of these metabolites represents 27.80% of the extract obtained at 40 °C, while at 50 °C and 60 °C, it



corresponds to 51.82% and 50.1% of the extract obtained, respectively. These data are in accordance to a study performed with *H. perforatum* where an increased amount of extract was followed by a decrease of hyperforin concentration, as a consequence of the increased yield of other compounds [23]. Nevertheless, in the work of Glisic et al. [21] this effect was not observed and the authors reported that the absolute extracted amount of hyperforin and adhyperforin was almost constant, not depending of the total yield of extract, i.e., on density of SC CO<sub>2</sub>, determined by the temperature.

**Table 1** - Summary of the extraction yields and benzopyrans and uliginosin B contents in the SFE extract of *H. polyanthemum* at different pressures and temperatures, and comparison with the *n*-hexane extract. Different letters <sup>(a,b,c)</sup> among the same pressures indicate significant differences among the different temperatures ( $P < 0.05$ ).

Extraction conditions										
<i>T</i> (°C)	<i>P</i> (bar)	Extraction yield (g/100g)	HP1		HP2		HP3		Uliginosin B	
			mg/100g plant	mg/g in the extract (% ± S.D.)	mg/100g plant	mg/g in the extract (% ± S.D.)	mg/100g plant	mg/g in the extract (% ± S.D.)	mg/100g plant	mg/g in the extract (% ± S.D.)
40	90	1.315	239	182.6 ± 6.7 <sup>b</sup>	62	47.5 ± 1.6 <sup>b</sup>	70	53.3 ± 2.0 <sup>c</sup>	184	140.9 ± 8.3
	120	0.265	13	51.0 ± 12.3 <sup>c</sup>	3.6	13.7 ± 3.2 <sup>c</sup>	4	14.8 ± 3.6 <sup>b</sup>	16	60.6 ± 6.7 <sup>b</sup>
	150	1.091	81	74.3 ± 10.8 <sup>c</sup>	21	19.5 ± 2.8 <sup>c</sup>	24	21.7 ± 3.2 <sup>b</sup>	29	26.9 ± 2.9 <sup>c</sup>
	200	0.330	35	107.2 ± 10.9 <sup>a</sup>	13	38.4 ± 16.8 <sup>a</sup>	15	28.9 ± 2.6 <sup>a</sup>	23	69.9 ± 13.5 <sup>b</sup>
50	90	0.338	92	272 ± 1.1 <sup>a</sup>	68	187.6 ± 6.0 <sup>a</sup>	38	111.4 ± 10.4 <sup>b</sup>	nd	nd
	120	0.621	170	274.3 ± 27.6 <sup>b</sup>	142	213.2 ± 17.6 <sup>a</sup>	97	155.7 ± 38.6 <sup>a</sup>	75	120.3 ± 6.0 <sup>a</sup>
	150	0.393	55	141.3 ± 13.2 <sup>b</sup>	46	117.5 ± 5.8 <sup>b</sup>	40	102.6 ± 9.8 <sup>a</sup>	138	352.5 ± 14.8 <sup>a</sup>
	200	0.863	17	19.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	16	18.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	15	17 ± 1.6 <sup>b</sup>	139	161.6 ± 3.0 <sup>b</sup>
60	90	0.077	20	264.7 ± 8.6 <sup>a</sup>	14	200.8 ± 13.6 <sup>a</sup>	10	133.9 ± 6.8 <sup>a</sup>	nd	nd
	120	0.531	198	373.2 ± 7.7 <sup>a</sup>	110	202.4 ± 11.4 <sup>a</sup>	105	167.6 ± 18.9 <sup>a</sup>	nd	nd
	150	0.376	75	198.2 ± 10.7 <sup>a</sup>	40	158.1 ± 12.2 <sup>a</sup>	36	97 ± 5.1 <sup>a</sup>	68	180.6 ± 19.0 <sup>b</sup>
	200	0.755	14	18.1 ± 2.9 <sup>b</sup>	11	14.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	12	15.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	158	209.9 ± 19.3 <sup>a</sup>
<i>n</i> -hexane		2.340	275	117.5 ± 1.8	148	63.3 ± 0.5	194	82.7 ± 22.7	163	69.7 ± 3.4

nd: not detected

The results obtained in the present work cannot be compared in details with those achieved with other *Hypericum* species, considering that the Brazilian species do not present hyperforin or adhyperforin. The literature of SC CO<sub>2</sub> extraction focuses on *H. perforatum*, which accumulates the above mentioned compounds [21] and no report regarding plants of the genus without hyperforin is available. The dimeric phloroglucinol derivatives found in Brazilian species differ from hyperforin and adhyperforin, which possess a bicyclononane skeleton substituted with several isoprene chains. The dimeric compounds frequently present a benzopyran nucleus formed by the cyclization of the prenyl unit with an adjacent hydroxyl group. Together with these dimeric compounds, some species, such as *H. polyanthemum*, also present the benzopyran nucleus found as monomers [1,2]. Therefore, such difference in the composition of the lipophilic fraction may account for specific extraction conditions of the plant studied in this work.

#### **4. Conclusions**

The experimental results for the bioactive metabolites yields obtained in the extraction of *H. polyanthemum* demonstrated that the compounds were easily extracted by SC CO<sub>2</sub> with successively extractions at 90, 120, 150 and 200 bar in the three studied temperatures, being the best condition to extract the benzopyrans and uliginosin B determined to be at 50 °C. Further optimization of the extraction protocol is under investigation to obtain these pharmacological active compounds.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPERGS for financial support. We wish to thank CBIM/UFRGS for the HPLC facilities.

#### **References**

- [1] A.B.F. Ferraz, S.A.L. Bordignon, C. Staats, J. Schripsema, G.L. von Poser, *Phytochemistry* 57 (2001) 1227.
- [2] C. Nör, D. Albring, A.B.F. Ferraz, J. Schripsema, V. Pires, P. Sonnet, D. Guillaume, G.L. von Poser, *Biochemical Systematics and Ecology* 32 (2004)

517.

- [3] A.C. Schmitt, A.P. Ravazzolo, G.L. von Poser, J. Ethnopharmacol. 77 (2001) 239.
- [4] R. Dall’Agnol, A. Ferraz, A.P. Bernardi, D. Albring, C. Nör, L. Sarmento, L. Lamb, M. Hass, G.L. von Poser, E.E.S. Schapoval, Phytomedicine 10 (2003) 511.
- [5] A.F. Viana, A.P. Heckler, R. Fenner, S.M.K. Rates, Braz. J. Med. Biol. Res. 36 (2003) 631.
- [6] A. Ferraz, I. Grivicich, G.L. von Poser, A.T. Henriques, G. Schwartzmann, A.B. da Rocha, Fitoterapia 76 (2005) 210.
- [7] I. Grivicich, A. Ferraz, D.H. Faria, A. Regner, G. Schwartzmann, A.T. Henriques, G.L. von Poser, A.B. da Rocha, Phytotherapy Res. 22 (2008) 1577.
- [8] V.L.S. Ribeiro, E. Toigo, S.A.L. Bordignon, K. Gonçalves, G. von Poser, Vet. Parasitol. 147 (2007) 199.
- [9] A.P.M. Bernardi, C. López-Alarcón, B.A. Aspée, S.B. Rech, G.L. von Poser, R. Bridi, C. S. Dutra Filho, E. Lissi, J. Chil. Chem. Soc. 53 (2008) 1565.
- [10] A.P.M Heckler, A.F. Viana, R. Fenner, C. Nor, M. Kliemann, J.C. do Rego, J. Costentin, G.L. von Poser, S.M.K. Rates, Atividade antinociceptiva de uliginosina isolada de *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). 20<sup>a</sup> Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia, Brasil, 2005.
- [11] E.D. Stolz, J.S. Haas, L. Grazziotin, L. Wild, G.L. von Poser, S.M.K. Rates, Uliginosina, um floroglucinol isolado de *Hypericum polyanthemum*, apresenta efeito antinociceptivo mediado pela neurotransmissão dopaminérgica. V Oficina de neurociências – Fronteiras da Investigação. Garibaldi, Brasil, 2008.
- [12] A.P.M. Bernardi, N. Maurmann, S.B. Rech, G.L.von Poser, Acta Physiol. Plant.

29 (2007) 165.

- [13] A.P.M. Bernardi, J.M. Nunes, M.K. Marchioro, L.M.G. Rosa, G.L. von Poser, S.B. Rech, *Plant Physiol. Biochem.* 46 (2008) 694.
- [14] A. Poutaraud, P. Girardin, *Plant Gen. Res.* 3 (2005) 178.
- [15] B. Schilter, C. Andersson, R. Anton, A. Constable, J. Kleiner, J. O'Brien, A.G. Renwick, O. Korver, F. Smit, R. Walker, *Food Chem. Toxicol.* 41 (2003) 1625.
- [16] L.T. Taylor, *Supercritical Fluid Extraction*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1996.
- [17] E.L. Cardozo Jr., L. Cardozo-Filho, O. Ferrarese-Filho, E.F. Zanoelo, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 6835.
- [18] V.M. Rodrigues, P.T.V. Rosa, M.O.M. Marques, A.J. Petenate, M.A.A. Meireles, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1518.
- [19] O.J. Catchpole, N.B. Perry, B.M.T. da Silva, J.B. Grey, B.M. Smallfield, *J. Supercrit. Fluids* 22 (2002) 129.
- [20] I. Zizovic, M. Stamenić, J. Ivanović, A. Orlović, M. Ristić, S. Djordjević, S.D. Petročić, D. Skalac, *J. Supercrit. Fluids* 43 (2007) 249.
- [21] S. Glisic, A. Smelcerovic, S. Zuehlke, M. Spiteller, D. Skala, *J. Supercrit. Fluids* 45 (2008) 332.
- [22] C.R. Piantino, F.W.B. Aquino, L.A. Follegatti-Romero, F.A. Cabral, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2008) 209.
- [23] H. Römpp, C. Seger, C.S. Kaiser, E. Haslinger, P.C. Schmidt, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 443.
- [24] S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 2.
- [25] E. Cassel, R.M.F. Vargas, C. Bedinot, Unidad Piloto de Extracción Supercrítica Automatizada, In: *Aplicaciones industriales de los Taninos vegetales:*

productos y procesos, EDIPUCRS, Porto Alegre, 2007.

- [26] A.B.F. Ferraz, R.P. Limberger, S.A.L. Bordignon, G.L. von Poser, A.T. Henriques, *Flav. Frag. J.* 20 (2005) 335.
- [27] L. Rocha, A. Marston, O. Potterat, M.A.C Kaplan, H. Stoeckli-Evans, K. Hostettmann, *Phytochemistry* 40 (1995) 1447.
- [28] Y. Cui, C.Y.W. Ang, *J. Agric. Food. Chem.* 10 (2002) 2755.

#### 4. Manuscrito II

---

“Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid and its isolated compounds.”

Artigo submetido à publicação no periódico Journal of Antimicrobial Chemotherapy.





**Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid and its isolated compounds**

Simone Tasca Cargnin<sup>a</sup>, Patrícia de Brum Vieira<sup>a</sup>, Samuel Cibulski<sup>c</sup>, Eduardo Cassel<sup>b</sup>, Jarbas Montanha<sup>c</sup>, Paulo Roehe<sup>c</sup>, Tiana Tasca<sup>a</sup>, Gilsane Lino von Poser<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, 90610.000 - Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 277, 90619.900 - Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Av. Sarmiento Leite, 500, 90050.170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

---

\* Corresponding author: Tel.: +55 51 33085529; Fax: +55 51 33085437.

*E-mail address:* [gilsane@farmacia.ufrgs.br](mailto:gilsane@farmacia.ufrgs.br) (G.L. von Poser).



## Abstract

This work assessed the anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid at 50 °C and 150 bar, and the isolated compounds, the benzopyrans HP1, HP2, HP3, and the phloroglucinol derivative uliginosin B. The results showed that all samples had anti-*T. vaginalis* activity; however, HP1 demonstrated the best selectivity against this protozoan (metronidazole-resistant and susceptible isolates), with no cytotoxicity against mammalian cells. This compound presented a high selectivity index (SI) (73.97), which confirmed a significant antiprotozoal activity and good selectivity. Moreover, HP1 had good activity against a metronidazole-resistant isolate (52% of trophozoites viable), presenting a synergic effect when tested with a low concentration of metronidazole (23% of trophozoites viable). Investigation of the mechanism of action revealed that all isolated compounds caused damage to the parasites' membrane, shown by more than 90% of LDH release. None of the samples presented a notable hemolytic effect, while HP2 and uliginosin B exhibited cytotoxicity against mammalian cells. Therefore, benzopyrans and the phloroglucinol derivative are promising molecules as prototypes for new antiprotozoal drugs, especially HP1, which improved metronidazole's effect on a resistant *T. vaginalis* isolate. Nevertheless, more studies are necessary in order to enhance their *in vitro* antiprotozoal activity without toxicity towards mammalian cells.

**Keywords:** *Trichomonas vaginalis*, cytotoxic effect, *Hypericum*, benzopyrans, phloroglucinol derivative.



## 1. Introduction

Natural products have historically been the major source of pharmaceutical agents. According to the WHO (2002)<sup>1</sup> more than 90% of current therapeutic classes derive from a natural product prototype. However, the vast majority of natural compounds have not yet been tested for biological activity and several novel sources of biodiversity are potentially available.<sup>2,3</sup> Many studies have shown that medicinal plants from several regions of the world contain compounds active against protozoa, especially *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei brucei*,<sup>4</sup> *Plasmodium falciparum*,<sup>5,6</sup> *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*.<sup>7,8</sup>

*Trichomonas vaginalis*, an amitochondriate protist, is a microaerophilic mucosal pathogen which affects the human urogenital tract, causing trichomonosis, the most common non-viral sexually transmitted disease (STD).<sup>9</sup> According to the WHO in 2001,<sup>9</sup> there are about 170 million cases of trichomonosis worldwide every year. Studies have indicated that complications related to this disease include infertility,<sup>10</sup> pelvic inflammatory disease,<sup>11</sup> predisposition to cervical cancer,<sup>12</sup> an increase of in the probability of high-risk human papillomavirus (HPV) infection,<sup>13</sup> birth outcomes and increased transmission and acquisition of the human immunodeficiency virus (HIV).<sup>14</sup>

Metronidazole and a related 5-nitroimidazole, tinidazole, are the only drugs recommended by the FDA for the treatment of *T. vaginalis* infection; worse still, resistant isolates have been described.<sup>15-17</sup> Drug failures appeared as soon as metronidazole was approved for the treatment of trichomonosis in the late 1950s and an alarming increase in infections caused by resistant isolates has occurred. In many cases resistance is overcome with prolonged therapy and higher doses of metronidazole, but occasionally patients continue to be infected despite these measures.<sup>18</sup> Moreover, high doses are often not well tolerated by patients, with the development of unpleasant side effects including nausea, headache, dizziness, rash, dry mouth, and a metallic taste sensation.<sup>19</sup>

In the context of improving the therapy of *T. vaginalis* infection, natural products could be a source of new drugs with high activity and low toxicity, which can be further optimized by synthetic procedures. Plants of the genus *Hypericum* are well known for their use in traditional medicine, with *Hypericum perforatum* L., St. John's

wort, being the most important species, and this has been used in herbal medicines for the treatment of several diseases, including infections caused by microorganisms.<sup>20</sup> Antimalarial activity was observed and attributed to a major lipophilic constituent, hyperforin, a phloroglucinol derivative.<sup>6</sup>

In southern Brazil, the genus *Hypericum* is represented by approximately 20 species. One of these, *H. polyanthemum*, has been found to contain in its lipophilic extract uliginosin B, a phloroglucinol derivative, and three benzopyrans: 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylbenzopyran (HP1), 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran (HP2) and 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethylbenzopyran (HP3) (Figure 1).<sup>21,22</sup> With the intention of optimizing the method of extraction of these bioactive compounds, a previous study was conducted using supercritical fluid extraction (SFE) technology.<sup>23</sup> SFE is a technique used for separation processes, where the solvent generally employed, carbon dioxide, is non toxic, easily removed from the extract, and shows great selectivity for lipophilic compounds.<sup>24,25</sup>

Considering the increase in drug resistance and the fact that lipophilic compounds such as benzopyrans and phloroglucinol derivatives have potential antiprotozoal activity, in this study we examined the anti-*T. vaginalis* activity in a fraction of *H. polyanthemum* extract obtained by SFE and the isolated compounds, HP1, HP2, HP3, and uliginosin B.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Plant material**

The aerial parts of specimens of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt were collected in Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil, in October 2008. A voucher specimen was deposited in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) (*Hypericum polyanthemum*, Bordignon et al. 1405). Plant collection was authorized by Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) and Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) 003/2008 P 02000.001717/2008 – 60.

## 2.2 Supercritical fluid extraction and quantification of metabolites

The dried and powdered plant material was successively extracted with supercritical carbon dioxide under pressures of 90, 120, 150, and 200 bar at different temperatures (40, 50 and 60 °C). The bioactive compounds in each fraction were quantified by HPLC using Waters equipment, a Nova-Pack C18 column and an isocratic solvent system.<sup>26,27</sup> The optimum temperature for extraction of bioactive compounds by SFE was 50 °C, where the total concentration of the metabolites represented 51.82% of the extract obtained. The quantification of HP1, HP2, HP3, and uliginosin B in the extract obtained at 50 °C and 150 bar, the fraction chosen for biological assays, showed values of 141.3, 117.5, 102.6 and 352.5 mg per g of extract, respectively.<sup>23</sup>

## 2.3 Isolation of bioactive compounds

The compounds were isolated from SFE fractions by column chromatography on silica gel 60 using mixtures of *n*-hexane: dichloromethane of increasing polarity as eluent, and further purified by preparative thin-layer chromatography (TLC) on 20 cm × 20 cm glass supported plates covered with 0.5 mm silica gel GF<sub>254</sub> (Merck) and *n*-hexane: dichloromethane (1:1) as solvent. The bands were detected under UV light (254 nm), and the purity was confirmed by HPLC analysis, taking into account the retention time of the compounds compared with standards (authentic samples) isolated from the aerial parts of *H. polyanthemum*, as described by Ferraz *et al.*,<sup>21,28</sup> where the identities and purities of the compounds were confirmed by NMR spectroscopic analysis.

## 2.4 Culture of *Trichomonas vaginalis*

The *T. vaginalis* isolate sensitive to metronidazole used in this study, 30236 (ATCC) was kindly donated by Prof. Dr. Geraldo A. De Carli (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil), and the metronidazole-resistant isolate, TV-LACM2 (a fresh clinical isolate) was obtained from a female patient attending the Laboratório de Análises Clínicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Trichomonads were cultured axenically *in vitro* in trypticase–yeast extract–maltose (TYM) medium (pH 6.0), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated bovine serum, and incubated at 37 °C ( $\pm$  0.5).<sup>29</sup> Organisms in the logarithmic phase of growth and exhibiting more than 95% viability and normal morphology, were harvested, centrifuged, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in fresh TYM medium for cytotoxicity assays.

## **2.5 Anti-*Trichomonas vaginalis* assay**

The cytotoxicity of the SFE extract and the isolated compounds against *T. vaginalis* was determined *in vitro*. The extract at a concentration of 5.2 mg/mL and the isolated compounds at 1.0 mg/mL were diluted with sterile water after first being dissolved in DMSO, the final concentration of which never exceeded 0.62% in the test medium.<sup>30</sup> For these assays 96-well microtiter plates were used, where 100  $\mu$ L TYM medium were added to each well and, subsequently, 100  $\mu$ L of extract and isolated compounds were added to the first well. A dilution series was then produced by thoroughly mixing the contents of the wells, then removing 100  $\mu$ L and transferring this to the next well, repeating the process to reach a final eight-fold dilution for all samples tested. Next, parasites were resuspended in TYM medium and counted with a hemocytometer, and 100  $\mu$ L of this suspension were added to each well, with the final volume of 200  $\mu$ L containing  $5.0 \times 10^4$  trophozoites/mL. The plates were incubated for 24 h at 37 °C, after which trophozoite viability was determined by microscopic observation, and the MIC values for the isolated compounds were calculated. A fluorimetric method based on the reduction of the resazurin salt, which is proportional to the number of viable trophozoites, was used to test the activity of the SFE extract.<sup>30</sup> The resazurin method was not employed when the isolated compounds were tested because of their natural fluorescence which interferes with resazurin fluorescence. A vehicle control, a negative control containing only trophozoites, and a positive control with 8.0  $\mu$ M metronidazole (Sigma-Aldrich, USA) were included.<sup>30</sup> To perform the quantitative assay with the isolated compounds, HP1, HP2, HP3, and uliginosin B were incubated at final concentrations of 250, 125 and 62.5  $\mu$ g/mL with  $5.0 \times 10^4$  trophozoites/mL. This assay was carried out using microtubes which were incubated at 37 °C for 24 h. Subsequently, the contents of the



microtubes were mixed and the number of viable trophozoites was counted in an aliquot of 10  $\mu\text{L}$  with a hemocytometer.

At least three independent experiments were carried out, in triplicate, and the results were expressed as the percentage of living parasites after 24 h of incubation considering motility and normal morphology (percentage of living organisms compared to negative control). Positive and negative controls were also performed using microtubes. The concentration required to inhibit the growth of 50% of the parasites ( $\text{IC}_{50}$ ) was determined by linear regression.

## **2.6 *In vitro* metronidazole susceptibility assay**

The metronidazole susceptibility assay was carried out according to Tachezy *et al.*<sup>31</sup> Briefly, the assay was performed in 96-well microtiter plates, where metronidazole at 74000  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich, USA) was added to the first well and an eight-fold dilution was obtained. Next, the trophozoites (TV-LACM2) were added ( $5.0 \times 10^5$  trophozoites/mL) and incubated for 24 h at 37 °C, after which their viability was determined on an inverted microscope. In order to verify a possible synergic effect of the compounds being investigated and metronidazole, HP1, the most active compound, at different concentrations (62.5, 125 and 250  $\mu\text{g/mL}$ ), was tested with 8.0  $\mu\text{M}$  of metronidazole. The number of viable trophozoites was counted with a hemocytometer as described in the anti-*Trichomonas vaginalis* assay.

## **2.7 Hemolytic assay**

The hemolytic assay was performed according to the method described by Gauthier *et al.*<sup>32</sup> with some modifications. Type O positive blood from healthy human volunteers was collected with Alsever's solution (1:1) and centrifuged at 2000 rpm for 5 min. The erythrocyte fraction was washed three times with 1x PBS (pH 7.0) and then resuspended in the same buffer to give a 1% (v/v) red cell suspension. Samples of the substances under investigation were dissolved in Milli-Q to achieve a final concentration of 125  $\mu\text{g/mL}$ . A volume of 1.1 mL of cell suspension at 1% was added to microtubes (2.0 mL) and then 400  $\mu\text{L}$  of sample solution and/or water was added to obtain a final concentration of approximately 0.7% of erythrocytes. The microtubes

were incubated at 37 °C under horizontal agitation (360°, 10 rpm) for 1 h and then were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. The experiment was performed in triplicate, and the percentage of hemolysis caused by each sample tested was calculated in comparison to 100% hemolysis attributed to the hemolytic action of saponin commercial fraction, the extract of *Quillaja saponaria*.<sup>33</sup>

## **2.8 Lactate dehydrogenase assay**

In the lactate dehydrogenase (LDH) assay, the leakage of the cytoplasmic enzyme LDH into the extracellular medium was measured. The presence of LDH in the culture medium is associated with damaged membranes and, consequently, with cytotoxicity.<sup>34</sup> LDH release was analyzed in relation to the toxicity of the compounds towards parasites and mammalian cells (VERO). To investigate LDH release from parasites (ATCC 30236 and TV-LACM2) all isolated compounds, at a final concentration of 125 µg/mL, were incubated with  $5.0 \times 10^4$  trophozoites of *T. vaginalis* and 1.0 mM of a protease inhibitor cocktail (Sigma) at 37 °C, for 24 h. The LDH assay was also performed with mammalian cells with the HP2 compound (125 µg/mL), the most toxic to the cells. HP2 was incubated with  $4.0 \times 10^4$  cells/mL per well, in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, for 24 h. LDH was measured spectrophotometrically in the supernatant for both parasite isolates and cells, using a commercial kit (Labtest). Parasites/cells lysed with liquid nitrogen for 1 min and untreated parasites/cells were used as positive and negative controls, respectively. The LDH released was calculated as a percentage of the positive control, considered 100% of cellular damage.

## **2.9 Cytotoxicity against the VERO cell line**

Cell viability was quantified using the mammalian VERO cell line and a commercially available reagent [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). The cytotoxicity was determined by a colorimetric method based on the reduction of tetrazolium salts by viable cells as described previously.<sup>35</sup> Briefly, VERO (ATCC CCL-81), a normal

kidney epithelial cell line from African green monkey, was cultured in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin 100 IU/mL; streptomycin 100 µg/mL). Experiments were performed in 96-well microtiter plates, where a suspension of  $4.0 \times 10^4$  cells/mL per well was incubated in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. When cells reached more than 80% confluence, the medium was replaced and the cells treated with *H. polyanthemum* extract at concentrations of 0.65, 0.325, 0.162, and 0.081 mg/mL, and isolated compounds at final concentrations of 250, 125, 62.50 and 31.25 µg/mL, dissolved in DMSO at a maximum final concentration of 0.62%. After 24 h of incubation, stock MTT solution (2.0 mg/mL) was added (40 µL per well) and plates were incubated for a further 3 h. DMSO (100 µL per well) was then added and the plates incubated for 10 min to stop the reaction and to dissolve the insoluble purple formazan. The amount of MTT-formazan present is directly proportional to the number of living cells and was determined by measuring the optical density (OD) at 550 nm using a microplate reader (Anthos 2020). Untreated cells were used as a negative control. Three wells per dose were analyzed in three different experiments, and the results were expressed as the percentage of viable cells in comparison to negative control. The concentration of the compound that killed 50% of the cells (CC<sub>50</sub>) was calculated by linear regression.

## 2.10 Statistical analysis

The data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using a probability value of  $P < 0.05$ . Tukey's test was used to identify significant differences between means among the different treatments (SPSS Software, version 14).

## 3. Results and discussion

Taking into account that approximately 5% of all clinical cases of trichomonosis are caused by *T. vaginalis* isolates with some level of resistance to metronidazole, its treatment constitutes a major therapeutic challenge and treatment options are limited.<sup>36,19</sup> In this study we demonstrated the anti-*T. vaginalis* activity of *H. polyanthemum* SFE extract (MIC: 325 mg/L) and its isolated compounds (from 62.5

to 250 mg/L).

The antiprotozoal activity presented by all isolated compounds in the *in vitro* susceptibility quantitative assay was dose-dependent, with the phloroglucinol derivative being the most active (less than 20% of trophozoites viable) (Figure 2), presenting an IC<sub>50</sub> value of 121.96 µM (Table 1). The benzopyran HP1 reduced the number of viable trophozoites by around 70% (Figure 2), and among the benzopyrans it presented the lowest IC<sub>50</sub> (226.50 µM) (Table 1). HP2 exhibited less antiprotozoal activity than HP1 and also presented marked toxicity against mammalian cells (Figure 3). On the other hand, HP3 was not found to be toxic, but its antiprotozoal activity was unremarkable (60% of trophozoites viable), corresponding to half the activity of HP1 (Figure 2).

Since compound HP2 was the most toxic to mammalian cells, we attempted to define its mechanism of action in cells through the analysis of LDH release. This experiment confirmed that the compound did not exert its cytotoxic effect by causing damage to the cell membrane, with only 26.5% of LDH release (data not shown). However, the exact mechanism of action remains unknown and should be further investigated. Considering the chemical structure of these benzopyrans (Figure 1), it could be inferred that the hydroxyl in position 7 of the benzopyran nucleus of the HP2 structure could be responsible for the cytotoxic effect against mammalian cells, although this radical is not essential for the antiprotozoal activity.

The LDH and hemolytic assays were performed in order to examine the action of isolated compounds on membranes, indicating selectivity for the parasites or human cells. In the hemolysis test none of the substances caused any notable hemolysis of the erythrocytes (Figure 4). However, the LDH assay showed that all samples caused damage to the parasite membranes, leading to more than 90% of LDH release (Figure 5).

The SFE extract and the isolated compounds were evaluated for their toxicity against mammalian cells using the VERO cell line. The isolates showed a CC<sub>50</sub> ranging from 213.91 to 16753.33 µM (Table 1). The most toxic compound was HP2, since a low number of viable cells was observed (Figure 3). On the other hand, considering their molecular weights uliginosin B, a phloroglucinol derivative, presented a higher cytotoxic effect against VERO cells, represented by the lowest CC<sub>50</sub> value. Nevertheless, the *H. polyanthemum* extract was not toxic to mammalian

cells (more than 83% of viable cells; data not shown), even though it contained a large amount of uliginosin B, at 35.25%.

We calculated the selectivity index (SI) of the compounds, defined as the ratio of cytotoxicity to biological activity ( $SI = CC_{50} \text{ VERO cells} / IC_{50} \text{ parasites}$ ) (Table 1). It is generally considered that biological efficacy is not due to *in vitro* cytotoxicity when  $SI \geq 10$ .<sup>37</sup> Thus, a low selectivity index is indicative of the high *in vitro* cytotoxicity of the sample and the lack of selectivity for the parasites. Uliginosin B, a molecule that appeared very promising when evaluated only for antiprotozoal purposes, presented a low SI value (1.75), thereby showing itself not to be selective. By contrast, the benzopyran HP1 had a SI value of 73.97, proving it to be the most promising compound with significant antiprotozoal activity and good selectivity. Therefore, benzopyrans and the phloroglucinol derivative are molecules with high selectivity for the trichomonads, with a mechanism of cytotoxicity that may involve loss of membrane integrity (high LDH values).

Furthermore, HP1 presented activity against a metronidazole-resistant clinical isolate (TV-LACM2), being able to kill 47% of trophozoites at the highest concentration (250  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figure 6). The metronidazole MIC for this isolate was measured and, different to ATTC-30236, for which the MIC was low (8.0  $\mu\text{M}$ ), the TV-LACM2 isolate presented a value of 289  $\mu\text{M}$  (Table 2). HP1 was evaluated regarding its synergic effect with 8.0  $\mu\text{M}$  of metronidazole, and we found a strong potentiating effect with only 30% of trophozoites viable, indicating a successful association (Figure 7). It could be suggested that the HP1 antiprotozoal activity against the resistant isolate was due to an interaction with the membrane lipids of the parasite (100% of LDH release) (Figure 5), resulting in cell damage and, consequently, cell death. Lipophilicity is an important consideration in the design of novel antiparasitic drugs, since long alkyl chains can interact with membrane lipids allowing the penetration of the compounds into the cytoplasm of the parasite.<sup>38,39</sup> Our findings indicate that the HP1 mechanism of action differs from that of metronidazole, which is activated in the hydrogenosomes of the parasites, resulting in the production of nitrogen radicals that damage DNA. Consequently, an existing resistance to metronidazole would not influence the susceptibility to HP1. However, the exact mechanism of the cytotoxic effect of HP1 has not yet been entirely elucidated.

Comparison of our results with those of other studies is particularly complex

because different parasites, substances and methods were used to measure activity. Notwithstanding, other authors have found that hyperforin, a phloroglucinol derivative, and 4-methoxy-2,2-dimethyl-6-(2-(2,4-dihydroxy)phenyl-transethenyl) chromene, which possesses a benzopyran nucleus, demonstrated activity against *Plasmodium falciparum*, with IC<sub>50</sub> values of 1.5 μM and 30.1 μM, respectively.<sup>40,6</sup> Uliginosin B, a compound belonging to the phloroglucinol derivative class, presented an IC<sub>50</sub> value 81-fold higher than that of hyperforin, and the IC<sub>50</sub> value of HP1 was 7.5-fold higher than the substance which possesses a benzopyran nucleus. Nevertheless, it is important to underline the fact that this is the first report on the anti-*T. vaginalis* activity of benzopyrans (HP1, HP2 and HP3) and the phloroglucinol derivative, uliginosin B.

Although the compounds investigated here did not exhibit pronounced activity against *T. vaginalis* when compared with metronidazole, they show promise as prototypes for new antiprotozoal drugs. Nevertheless, further studies on structural modifications to these compounds are necessary in order to enhance the *in vitro* antiprotozoal activity of the phloroglucinol derivative and benzopyrans. This is especially relevant for HP1, since this compound was able to improve the action of metronidazole against a resistant *T. vaginalis* isolate, indicating a synergic effect. In conclusion, special attention should be paid to benzopyran HP1, the most promising compound as a chemotype.

## Acknowledgements

S.T.C. and S.C. are recipients of fellowships from the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq, Brazil), P.B.V. from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). The authors are grateful to Sérgio Bordignon for collecting and identifying the plant material.

## Funding

This work was supported by CNPq (Brazil) grants [473525/2008-9] awarded to G.L.P. and [477348/2008-4] awarded to T.T., and by the NANOBIOTEC-Brazil program from CAPES.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

1. World Health Organization, 2002. Traditional and Alternative Medicine, Fact Sheet # 271. World Health Organization, Geneva.
2. McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochem* 2007; **68**, 2015–22.
3. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 2008; **13**, 894–901.
4. Camacho MdR, Phillipson JD, Croft SL *et al.* Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J Ethnoph* 2003; **89**, 185–91.
5. Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *J Ethnoph* 2004; **92**, 177–91.
6. Verotta L, Appendino G, Bombardelli E *et al.* *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure–activity study. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; **17**, 1544–8.
7. Muelas-Serrano S, Nogal JJ, Martínez-Díaz RA *et al.* *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnoph* 2000; **71**, 101–7.
8. Giordani RB, Vieira PB, Weizenmann M *et al.* Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Nat Prod* 2010; **73**, 2019–23.
9. World Health Organization, 2001. Global prevalence and incidence of selected

curable sexually transmitted infections: overview and estimates. In: WHO, Geneva, pp 27–29.<[www. who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm](http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm)>.

**10.** Goldstein F, Goldman MB, Cramer DW. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 1993; **137**, 577-84.

**11.** Cherpes T, Wiesenfeld H, Melan M *et al.* The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 2006; **33**: 747–52.

**12.** Viikki M, Pukkala E, Nieminen P *et al.* Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol* 2000; **39**, 71-5.

**13.** Noël JC, Fayt I, Munoz MRR *et al.* High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. *Arch Gynecol Obstet* 2009; **282**, 503-5.

**14.** Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B *et al.* *Trichomonas vaginalis* Infection and Human Immunodeficiency Virus Acquisition in African Women. *J Infect Dis* 2008; **197**, 548-54.

**15.** Grossman JH, Galask RP. Persistent vaginitis caused by metronidazole resistant trichomonas. *Obstet Gynecol* 1990; **76**: 521–2.

**16.** Sobel JD, Nagappan V, Nyirjesy P. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis-an emerging problem. *N Engl J Med* 1999; **341**, 292–3.

**17.** Klebanoff MA, Carey JC, Hauth JC *et al.* Failure of Metronidazole to Prevent Preterm Delivery among Pregnant Women with Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infection. *N Engl J Med* 2001; **345**, 487-93.

**18.** Blaha C, Duchene M, Aspöck H *et al.* *In vitro* activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and -susceptible strains of *Trichomonas*



*vaginalis*. J Antimicrob Chemother 2006; **57**, 273–8.

**19.** Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF *et al.* Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 2004; **17**, 783–93.

**20.** Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. J Ethnoph 2010; **131**, 511–21.

**21.** Ferraz ABF, Bordignon S, Staats C *et al.* Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. Phytochem 2001; **57**, 1227–30.

**22.** Nör C, Albring D, Ferraz ABF *et al.* Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. Biochem System Ecol 2004; **32**, 517–19.

**23.** Cargnin ST, Nunes JM, Haas JS *et al.* Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. J Chromat B 2010; **878**, 83–7.

**24.** Römpf H, Seger C, Kaiser CS *et al.* Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. Eur J Pharm Sci 2004; **21**, 443-51.

**25.** Pourmortazavi SM, Hajimirsadegh SS. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. J Chromat A 2007; **1163**, 2-24.

**26.** Bernardi APM, Maurmann N, Rech SB *et al.* Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. Acta Physiol. Plant 2007; **29**, 165-70.

**27.** Nunes JM, Pinhatti AV, von Poser GL *et al.* Promotive effects of long-term fertilization on growth of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants

during acclimatization. *Ind Crops Prod* 2009; **30**, 329–32.

**28.** Ferraz ABF, Schripsema J, Pohlmann AR *et al.* Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. *Biochem System Ecol* 2002; **30**, 989-91.

**29.** Diamond LS. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 1957; **43**: 488-90.

**30.** Duarte M, Giordani RB, De Carli GA *et al.* A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. *Experim Parasitol* 2009; **123**, 195–8.

**31.** Tachezy J, Kulda J, Tomková. Aerobic resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole induced *in vitro*. *Parasitol* 1993; **106**, 31-7.

**32.** Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K *et al.* Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semisynthetic and natural lupane-and oleanane-type saponins. *Bioorg Med Chem* 2009; **17**, 2002–8.

**33.** Sun Y, Tong H, Li M *et al.* Immunological adjuvant effect of *Japanese ginseng* saponins (JGS) on specific antibody and cellular response to ovalbumin and its haemolytic activities. *Vaccine* 2008; **26**, 5911-7.

**34.** Allen M, Millett P, Dawes E *et al.* Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers *in vitro*. *Clin Mater* 1994; **16**:189-94.

**35.** Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; **65**, 55-63.

**36.** Rasoloson D, Tomkova E, Cammack R *et al.* Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitol* 2001; **123**: 45-56.

- 37.** Nava-Zuazo C, Estrada-Soto S, Guerrero-Álvarez J *et al.* Design, synthesis, and *in vitro* antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl}ureas. *Bioorg Med Chem* 2010; **18**, 6398–403.
- 38.** Basselin M, Robert-Gero M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol Res* 1998; **84**: 78-83.
- 39.** Del Olmo E, Alves M, Lopéz JL *et al.* Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and aminoalcohols. *Bioorg Med Chem Lett* 2002; **12**: 659-62.
- 40.** Boonlaksiri C, Oonanant W, Kongsaree P *et al.* An antimalarial stilbene from *Artocarpus integer*. *Phytochem* 2000; **54**, 415-7.



## Legend for Figures

**Figure 1.** Chemical structure of uliginosin B and benzopyrans HP1, HP2 and HP3 isolated from *H. polyanthemum*.

**Figure 2.** Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of isolated compounds of *H. polyanthemum*. Data represent means  $\pm$  standard deviation of at least three experiments. Different letters <sup>(a,b,c,d)</sup> at the same concentration indicate significant differences among the compounds ( $P < 0.05\%$ ).

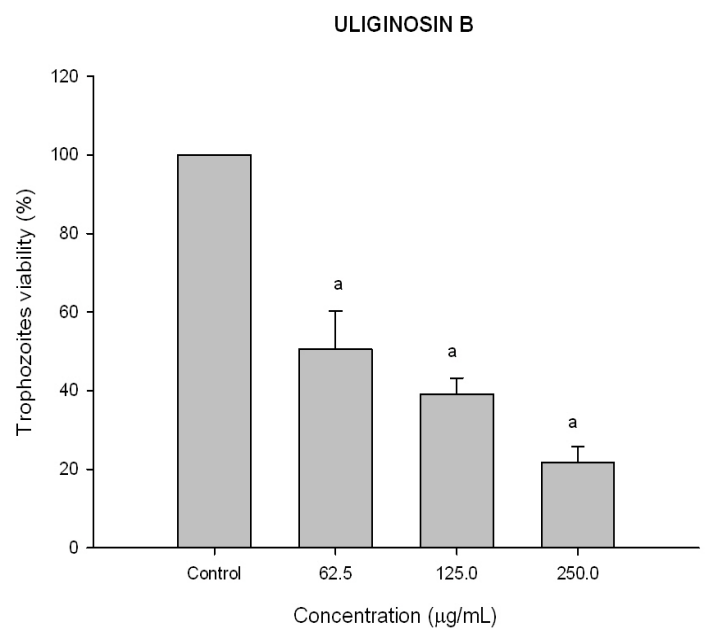
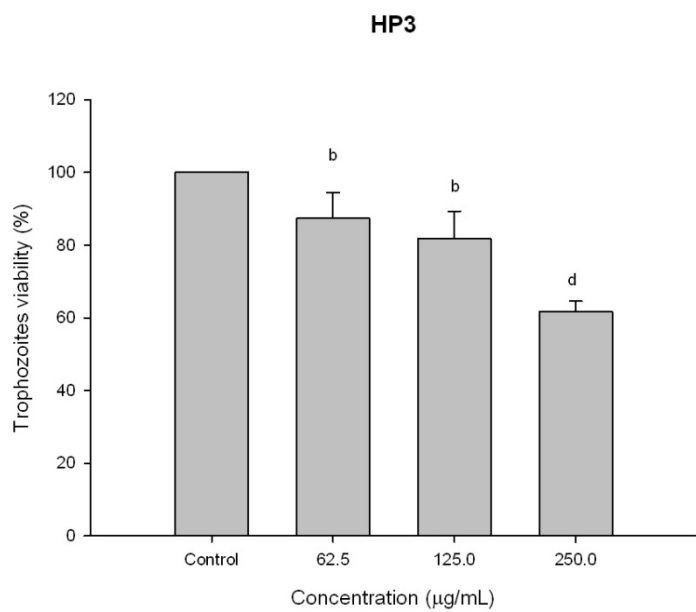
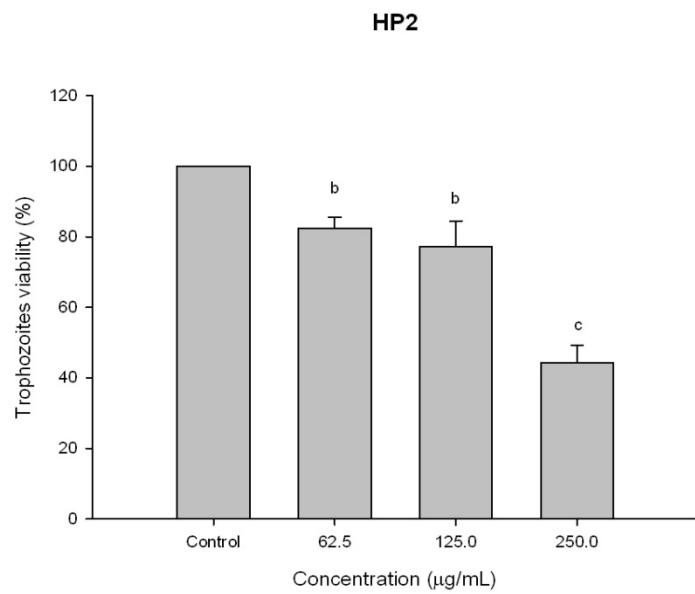
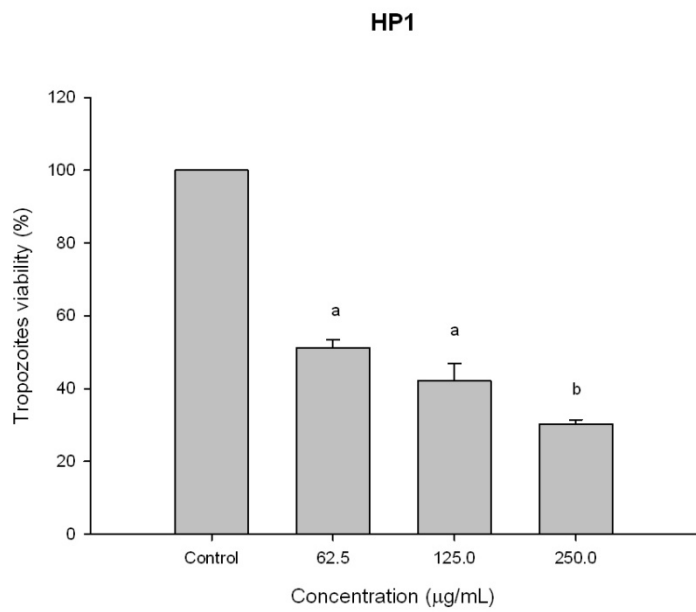
**Figure 3.** Cytotoxicity against mammalian cells after treatment with isolated compounds from *H. polyanthemum* at different concentrations. Data represent means  $\pm$  standard deviation of at least three experiments. Different letters <sup>(a,b,c,d)</sup> at the same concentration indicate significant differences among the compounds ( $P < 0.05\%$ ).

**Figure 4.** Percentage of hemolysis caused by benzopyrans and phloroglucinol derivative. The control corresponds to hemolytic action of extract of *Quillaja saponaria*.

**Figure 5.** Parasite LDH release in the presence of different compounds. (A) corresponds to ATCC-30236 and (B) TV-LACM2 *T. vaginalis* isolates. The control comprised parasites lysed in liquid nitrogen. Values correspond to one experiment representative of three different parasite cultures.

**Figure 6.** Viability of metronidazole-resistant clinical isolate of *T. vaginalis* trophozoites (TV-LACM2) in the presence of the benzopyran HP1. Data represent means  $\pm$  standard deviation. Different letters <sup>(a,b,c,d)</sup> indicate significant differences among the different concentrations and in relation to control ( $P < 0.05\%$ ).

**Figure 7.** Synergic effect of different concentrations of HP1 in the presence of 8.0  $\mu$ M metronidazole (MTZ). The control represents *T. vaginalis* trophozoites (TV-LACM2) without treatment. Data represent means  $\pm$  standard deviation. Different letters <sup>(a,b,c,d)</sup> indicate significant differences among the concentrations and (\*) significant difference compared to control and MTZ ( $P < 0.05\%$ ).



**Figure 2.**





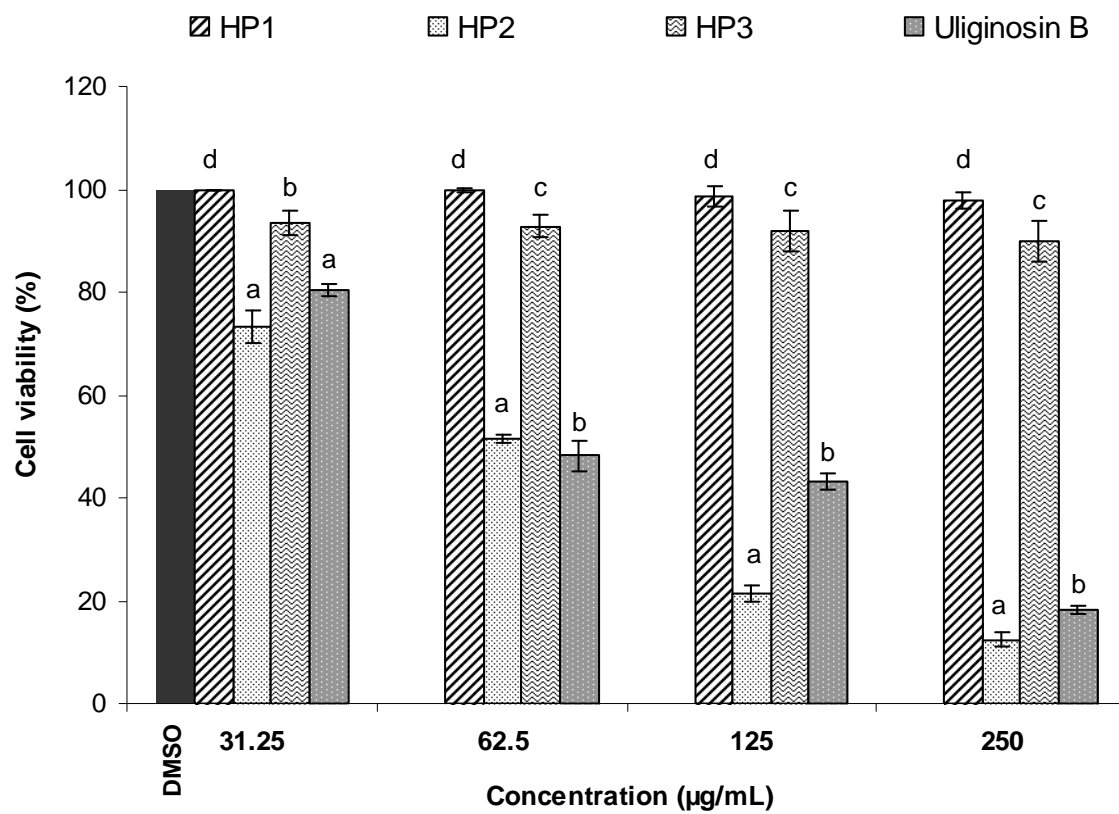
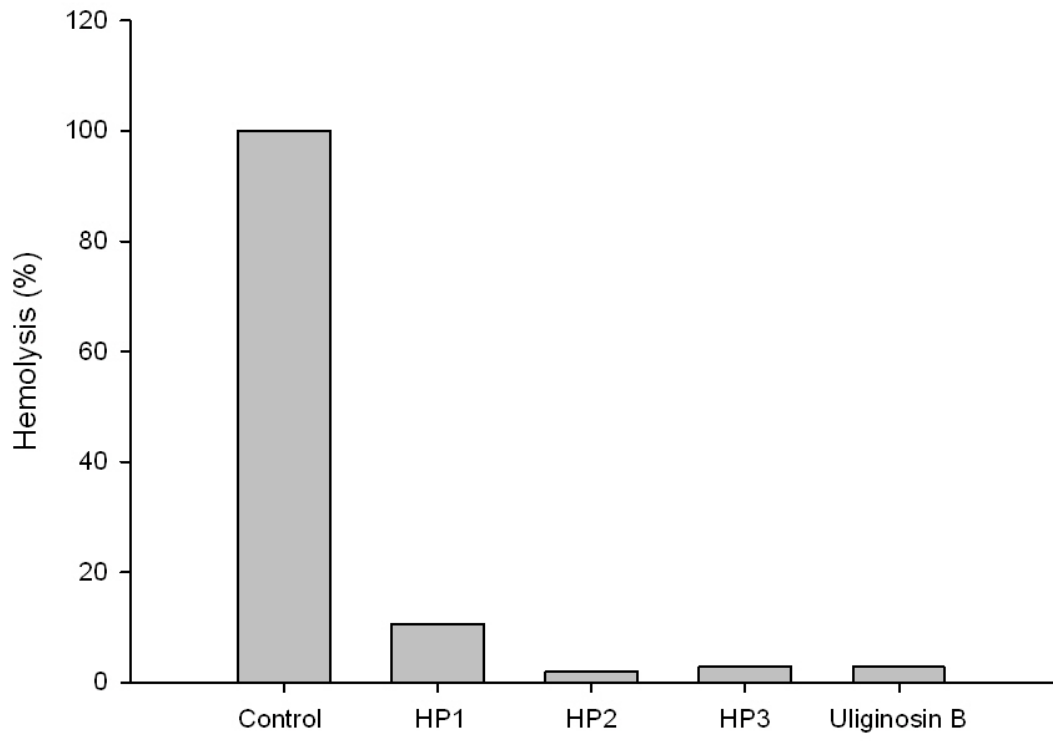


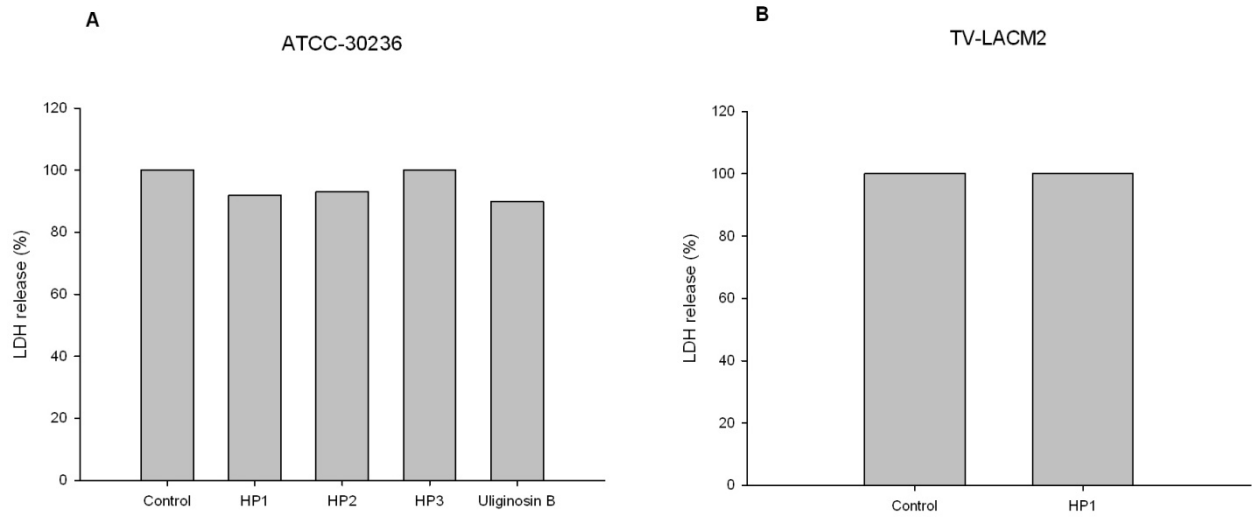
Figure 3.





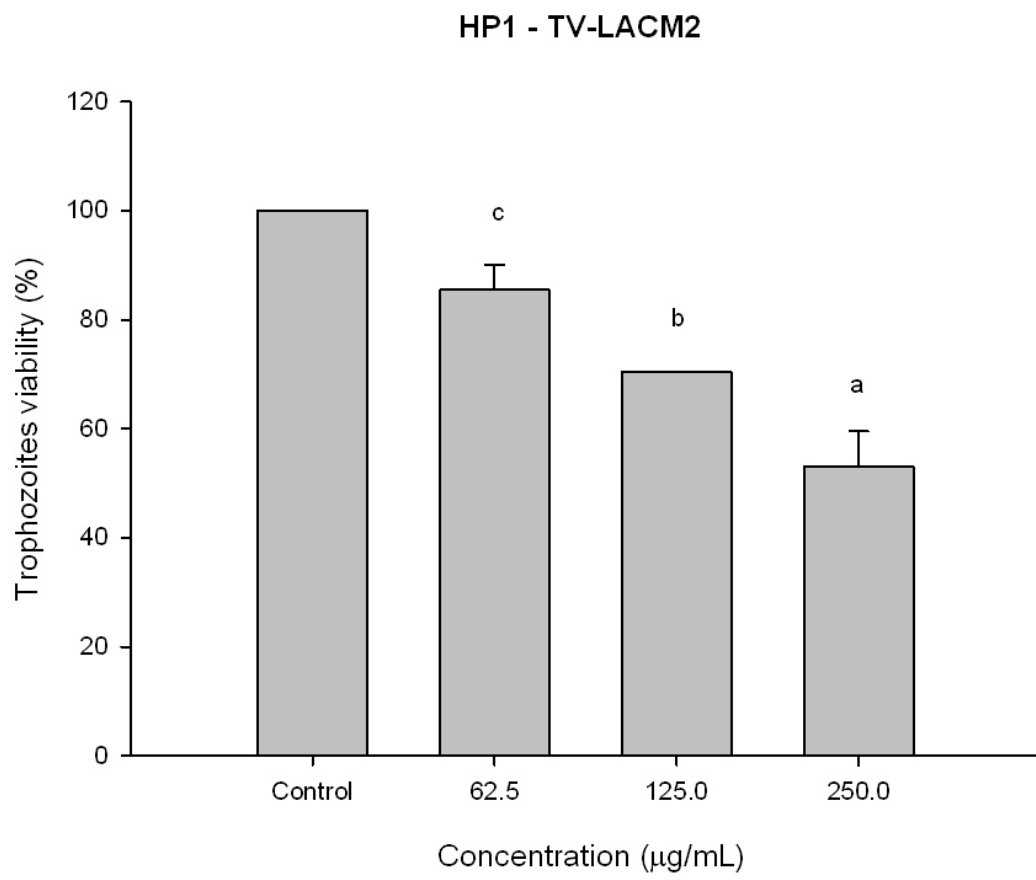
**Figure 4.**





**Figure 5.**

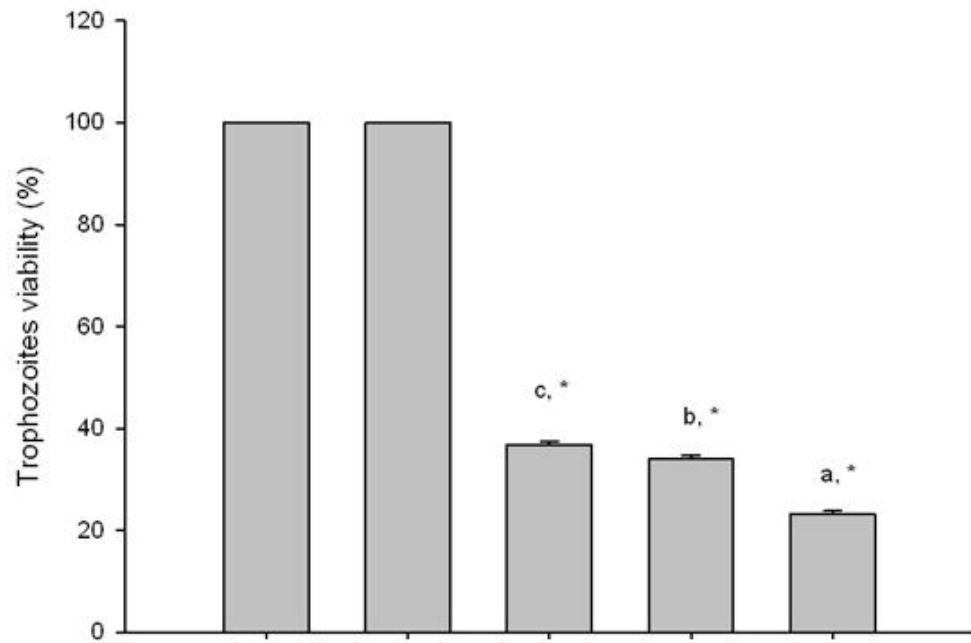




**Figure 6.**







MTZ 8.0 μM	-	+	+	+	+
HP1 62.5 μg/mL	-	-	+	-	-
HP1 125 μg/mL	-	-	-	+	-
HP1 250 μg/mL	-	-	-	-	+

**Figure 7.**



**Table 1.** Antiprotozoal and cytotoxic activity of isolated compounds and SFE extract of *H. polyanthemum*.

<b>Sample</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>CC<sub>50</sub></b>	<b>SI*</b>
SFE extract	206.98 mg/L	1426.13 mg/L	6.89
HP1	226.50 $\mu$ M	16753.33 $\mu$ M	73.97
HP2	833.65 $\mu$ M	280.24 $\mu$ M	0.33
HP3	1230.40 $\mu$ M	10429.05 $\mu$ M	8.48
Uliginosin B	121.96 $\mu$ M	213.91 $\mu$ M	1.75

\*SI: selectivity index.



**Table 2.** The *in vitro* metronidazole susceptibility of the metronidazole-resistant clinical isolate of *T. vaginalis* (TV-LACM2) and determination of metronidazole MIC value.

Concentration of metronidazole ( $\mu\text{M}$ )	Trophozoites viability
9250	-
4620	-
2310	-
1160	-
578	-
289	-
144	+
72	+

(-): non-viable; (+): viable.



## 5. DISCUSSÃO GERAL

---





Há milhares de anos produtos naturais têm ampla utilização no tratamento e prevenção de doenças, e ainda são compostos de interesse tanto em sua forma natural como modelo para modificação sintética. O valor dos produtos naturais pode ser mensurado analisando-se diferentes critérios, como: (i) taxa de introdução de novas entidades químicas de ampla diversidade estrutural, inclusive servindo como modelo para modificações semi-sintéticas e sintéticas; (ii) número de doenças prevenidas ou tratadas por estas substâncias; e (iii) sua frequência de uso no tratamento de doenças (CHIN *et al.*, 2008).

Em estudo desenvolvido por Newman e colaboradores (2003), verificou-se que 28% das novas entidades químicas introduzidas no mercado eram produtos naturais ou seus derivados, e 24% foram criadas a partir de um farmacóforo de origem natural. O percentual combinado (52%), sugere que produtos naturais são importantes fontes de novos fármacos e estruturas interessantes para modificação estrutural.

Analisando indicações médicas por fonte de compostos, produtos naturais e relacionados são utilizados para tratar 87% de doenças em humanos (48/55), atuando como antibacterianos, anticâncer, antiparasitários, anticoagulante, entre outros. Ainda, nos Estados Unidos, 84 de 150 medicamentos prescritos são produtos naturais ou afins, e são utilizados como agentes antilérgicos, analgésicos, medicamentos cardiovasculares e ainda no tratamento de doenças infecciosas (CHIN *et al.*, 2008).

Plantas do gênero *Hypericum* são bem conhecidas pelo seu uso na medicina tradicional, sendo *H. perforatum* L. uma das espécies mais importantes e estudadas. Motivados pelas diversas atividades biológicas apresentadas pelo gênero, nosso grupo de pesquisa iniciou, em 2001, estudos com espécies nativas do Rio Grande do Sul. Na análise fitoquímica, verificou-se a ausência de hipericina e hiperforina, substâncias marcadoras de *H. perforatum* L., e, até o momento, os compostos encontrados em extratos lipofílicos foram benzopiranos, derivados de floroglucinol e benzofenonas (FERRAZ *et al.*, 2001; FERRAZ *et al.*, 2002a; NÖR *et al.*, 2004; BERNARDI *et al.*, 2005).

Tanto extratos quanto compostos isolados de espécies nativas foram testados

frente inúmeras atividades biológicas, apresentando resultados promissores. Dentre estas espécies, destaca-se *Hypericum polyanthemum*, o qual apresenta distintas atividades, sendo o efeito antinociceptivo o mais relevante do ponto de vista farmacológico. Visando obter extratos de *H. polyanthemum* enriquecidos nos metabólitos de interesse, tanto para fins de testar atividades biológicas, quanto para isolamento de compostos, torna-se de grande importância o estabelecimento de um protocolo de extração utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico, o qual apresenta inúmeras vantagens quando comparado com solventes orgânicos.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a metodologia introduzida apresentou-se adequada e eficiente na extração de benzopiranos e derivados de floroglucinol, metabólitos apolares de *H. polyanthemum*. Mesmo que o rendimento dos extratos obtidos por extração com fluido supercrítico (SFE) seja igual ou pouco superior ao rendimento do extrato obtido por extração com *n*-hexano, estas frações apresentaram-se muito mais ricas nos metabólitos bioativos. Ainda, verificou-se que condições que fornecem elevado rendimento de extrato, provêm extratos com menor concentração de metabólitos.

Sendo a temperatura um parâmetro com efeito variável, dependente da natureza do material vegetal empregado na extração, neste trabalho, a temperatura acarretou um aumento da extração de metabólitos de *H. polyanthemum*, principalmente de benzopiranos.

Em geral, a temperatura de 50 °C mostrou-se bastante adequada na extração de benzopiranos e derivados de floroglucinol, visto que esses metabólitos representam aproximadamente 52% do extrato obtido nesta temperatura. No entanto, a melhor condição de extração de cada metabólito varia de acordo com suas características moleculares. A melhor condição de extração dos benzopiranos HP1 e HP3 é a 60 °C, 120 bar, porém, o rendimento de HP1 é cerca de três vezes maior que o verificado para HP3. Para extrair HP2 e o derivado de floroglucinol uliginosina B, 50 °C é a temperatura mais adequada, sendo as pressões ideais 120 e 150 bar, respectivamente. Em posse dessas informações, pode-se direcionar a extração com fluido supercrítico conforme o metabólito de interesse.

As vantagens obtidas por esta metodologia vão além do enriquecimento dos

metabólitos ativos por possuir alta seletividade. A extração é relativamente rápida (de 15 min a 2 h), há uma grande redução do uso de solventes orgânicos (tecnologia limpa), os extratos são livres de clorofila, facilitando o isolamento de compostos, e ainda, o CO<sub>2</sub> é de fácil remoção do extrato, evitando posteriores manipulações da amostra antes das análises (LANÇAS, 2002). Os benefícios desta metodologia são particularmente importantes quando objetiva-se avaliar atividades biológicas. Extratos enriquecidos e livres de solventes orgânicos são desejáveis em ensaios biológicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Tendo-se como importante o estudo de novos agentes terapêuticos no campo da Parasitologia, neste trabalho, extrato de *Hypericum polyanthemum* obtido por extração com fluido supercrítico foi submetido à avaliação de atividade citotóxica frente o protozoário *Trichomonas vaginalis*. Ainda, os metabólitos secundários majoritários de *H. polyanthemum* foram isolados por cromatografia em coluna a partir de extratos obtidos por SFE, e também foram avaliados frente ao parasito.

O *T. vaginalis* é agente etiológico da tricomonose, doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo. Este protozoário reside no trato urogenital feminino e masculino, causando vaginites, uretrites e prostatites. Inúmeras são as consequências na saúde de pacientes infectadas, incluindo predisposição ao câncer cervical, complicações na gestação, aumento dos riscos de infertilidade e HIV (JOHNSTON e MABEY, 2008). Derivados 5-nitroimidazólicos, metronidazol e tinidazol, são os únicos fármacos aprovados pelo FDA para o tratamento da tricomonose. No entanto, estima-se que pelo menos 5% dos isolados clínicos apresentem resistência ao metronidazol (CUDMORE *et al.*, 2004). Sendo que atualmente não existem tratamentos alternativos aos 5-nitroimidazólicos, faz-se necessária a pesquisa de novos compostos anti-*T. vaginalis* estruturalmente distintos aos nitroimidazóis e, conseqüentemente, citotóxicos por mecanismos de ação alternativos.

Os resultados da atividade anti-*T. vaginalis* indicam que compostos obtidos a partir de extrato lipofílico de *Hypericum polyanthemum* podem ser utilizados como moléculas protótipo no desenvolvimento de fármacos tricomonocidas, visto que possuem promissora atividade citotóxica frente o *T. vaginalis*. Tanto o extrato quanto os produtos isolados apresentaram atividade tricomonocida, porém o

derivado de floroglucinol uliginosina B e o benzopirano HP1 apresentaram efeitos citotóxicos mais pronunciados, matando aproximadamente 75% de trofozoítos de *T. vaginalis*. Estudos preliminares a fim de elucidar o mecanismo de ação destas substâncias foram conduzidos. Todos os compostos testados provocaram liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) do parasito para o meio de cultura, e nenhum composto provocou significativa hemólise de eritrócitos, indicando uma possível seletividade dos compostos à membrana dos parasitos.

Paralelamente ao ensaio antiparasitário, procederam-se ensaios para avaliar a citotoxicidade dos compostos frente a células de mamíferos (células VERO), pois tão importante quanto ser citotóxico para os parasitos, é não ser tóxico para células humanas. Nestes ensaios, verificou-se que o derivado de floroglucinol uliginosina B e o benzopirano HP2, apresentam-se tóxicos frente ao modelo celular empregado. HP1, composto que apresentou promissora atividade anti- *T. vaginalis*, mostrou-se ser atóxico para estas células, apresentando elevado índice de seletividade.

Pelo fato do benzopirano HP1 apresentar-se altamente seletivo para os parasitos, submeteu-se o composto à avaliação frente a um isolado clínico de *T. vaginalis* resistente ao metronidazol. O HP1 também foi capaz de matar esse isolado, restando viáveis, na maior concentração testada, cerca de 50% dos trofozoítos. Além disso, o HP1 potencializou com grande sucesso o efeito do metronidazol quando o mesmo foi testado em baixa concentração (8,0  $\mu$ M), verificando-se, em média, apenas 30% de trofozoítos viáveis.

Com relação à atividade citotóxica frente a células de mamíferos, benzopiranos e derivados de floroglucinol não haviam sido avaliados até o momento. Os benzopiranos foram testados previamente quanto à citotoxicidade e efeito antiproliferativo frente a diferentes linhagens de células tumorais, e todos compostos mostraram-se ativos (FERRAZ *et al.*, 2005a, 2005b; GRIVICICH *et al.*, 2008). Além disso, os benzopiranos apresentaram efeito sobre células do epitélio endotelial microvascular envolvidas no processo de angiogênese, sendo que HP3 e principalmente HP2, apresentaram maior efeito citotóxico. Estes isômeros atuam inibindo a proliferação celular tanto através de alteração do ciclo celular normal quanto por indução de mecanismo apoptótico, morte celular programada. HP2

apresentou efeito indutor de apoptose 30 vezes maior que HP3 (NÖR, 2006).

Visto que os benzopiranos podem atuar no ciclo celular das células e/ou induzir apoptose, que o HP2 é um composto fortemente indutor de apoptose, e ainda, que este composto provocou morte celular em células de mamíferos, é possível que seu mecanismo de citotoxicidade frente a estas células seja por indução do processo apoptótico. Esta hipótese é de certa forma confirmada no ensaio de dosagem de LDH, onde foi verificada a liberação de apenas 26% da enzima, indicando que o HP2 não provoca extenso dano na membrana celular das células, o que caracterizaria um processo de necrose, onde há rompimento da membrana celular com extravasamento do conteúdo citoplasmático (KROEMER e LEVINE, 2008).

A mitocôndria é uma organela que possui papel essencial no desenvolvimento do processo apoptótico, sendo ainda desconhecidos os mecanismos que levam à morte celular de organismos amitocondriados, como o *T. vaginalis* (CHOSE *et al.*, 2003). Este parasito possui hidrogenossomos, organela pouco comum que apresenta funções semelhantes à mitocôndria, contendo enzimas que participam do metabolismo do piruvato, como por exemplo, a enzima piruvato ferredoxina óxido redutase (PFOR) (MÜLLER, 1993). Esta enzima é a responsável por reduzir o grupo nitro do metronidazol, gerando intermediários instáveis que levam à morte celular do parasito. Desta forma, enzimas localizadas nos hidrogenossomos possuem importante papel na morte celular do *T. vaginalis*.

O benzopirano HP1 parece atuar nos parasitos por mecanismo distinto aos nitroimidazólicos, pois além de ter atividade frente a isolados de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol, ele potencializou seu efeito quando testado em baixa concentração. Visto o crescente aumento de isolados resistentes ao metronidazol, a possibilidade do mecanismo de ação deste benzopirano ser diferenciado é de extrema relevância na descoberta de novos fármacos tricomonocidas. Porém, o exato mecanismo de ação do HP1 ainda não foi esclarecido, sendo necessários estudos de microscopia e biologia molecular, uma perspectiva deste trabalho.

Considerando o potencial farmacológico dos produtos naturais testados, sugere-se a realização de processos de modificação estrutural nas moléculas avaliadas, principalmente do benzopirano HP1, visando melhorar a atividade antiprotozoária

sem alterar o efeito atóxico nas células de mamíferos. Neste sentido, a extração com fluido supercrítico pode auxiliar nos processos de semi-síntese, visto que são conhecidas as melhores condições de extração dos metabólitos e, portanto, podem ser obtidos em elevadas quantidades.

A carência de estudos relacionados à Parasitologia aliado ao fato da diversidade dos produtos naturais servir como bons protótipos de novas moléculas bioativas, apontam a necessidade de mais pesquisas na área de produtos naturais, tanto por parte de indústrias, como governo e instituições acadêmicas.

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

---





Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o método de extração com fluido supercrítico é adequado na extração do derivado de floroglucinol uliginosina B, e dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3, metabólitos secundários de *Hypericum polyanthemum*. Ainda, evidenciou-se uma nova e promissora atividade biológica para estes metabólitos, atividade frente o protozoário *Trichomonas vaginalis*. Os dados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. A extração com fluido supercrítico (SFE) foi capaz de enriquecer de forma bastante significativa os extratos de *H. polyanthemum*, sendo o dióxido de carbono um solvente adequado na extração de benzopiranos e derivados de floroglucinol, compostos lipofílicos de *H. polyanthemum*.
2. As melhores condições de SFE para cada um dos compostos foram determinadas, sendo 50 °C a temperatura que, em geral, mostrou-se mais adequada.
3. Os extratos obtidos por SFE apresentaram-se além de enriquecidos, livres de clorofila, o que facilitou o processo de isolamento dos metabólitos bioativos.
4. O extrato de *H. polyanthemum* obtido por SFE e seus compostos isolados apresentaram relevante atividade citotóxica frente o protozoário *Trichomonas vaginalis*, sendo que o benzopirano HP1 e o derivado de floroglucinol uliginosina B apresentaram atividade mais promissora.
5. Nenhum dos compostos testados apresenta significativa lise de eritrócitos, e todos provocam acentuados danos à membrana celular dos parasitos.
6. Os compostos HP1 e HP3 mostraram-se atóxicos, e HP2 e uliginosina B tóxicos frente a células de mamíferos, utilizando como modelo células VERO.
7. Levando-se em conta a citotoxicidade frente o parasito e frente a células VERO, o composto HP1 apresentou o maior índice de seletividade para os parasitos.

8. HP1 também se mostrou eficaz no combate ao isolado clínico de *T. vaginalis* resistente ao metronidazol, apresentando efeito sinérgico a este fármaco quando testados concomitantemente.
9. Benzopiranos e derivados de floroglucinol, compostos testados neste estudo, podem servir como protótipo de novos fármacos tricomonocida, sendo HP1 o composto com atividade anti- *T. vaginalis* mais promissora, e, portanto, merece especial atenção.

## 7. REFERÊNCIAS

---



ALDERETE, J.F.; ARROYO, R.; LEHKER, M.W. Analysis for adhesins and specific cytoadhesion of *Trichomonas vaginalis*. *Methods in Enzymology*, v. 253, p. 407-414, 1995.

ARROYO, R.; GONZALES-ROBLES, A.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; ALDERETE, J.F. Signaling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, v. 7, p. 299-309, 1993.

BARRETT, M.P. Potential new drugs for human African trypanosomiasis: some progress at last. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 23, p. 603-608, 2010.

BASTIDA-CORCUERA, F.D.; OKUMURA, C.Y.; COLOCOUSSI, A.; JOHNSON, P.J. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryotic Cell*, v. 4, p. 1951-1958, 2005.

BERNARDI, A.P.M.; FERRAZ, A.; ALBRING, D.; BORDIGNON, S.; SCHRIPEMA, J.; BRIDI, R.; DUTRA FILHO, C.S.; HENRIQUES, A.T.; POSER, G.L.V. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 784-786, 2005.

BERNARDI, A.P.M.; MAURMANN, N.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 29, p. 165-170, 2007.

BERNARDI, A.P.; LÓPEZ-ALARCON, C.; ASPEC, A. ; RECH, S.B.; VON POSER, G.L.; BRIDI, R.; LISSI, E. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 52, p. 1326-1329, 2008a.

BERNARDI, A.P.M.; NUNES, J.M.; MARCHIORO, M.K.; ROSA, L.M.G.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Phenolic compounds profiles during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 694-700, 2008b.

BILIA, A.R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. St. John's wort and depression, efficacy, safety and tolerability – an update. *Life Sciences*, v. 70, p. 3077-3096, 2002.

BLAHA, C.; DUCHENE, M.; ASPOCK, H.; WALOCHNIK, J. *In vitro* activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and -

susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 273-278, 2006.

BOWDEN, F.J.; PATERSON, B.A.; MEIN, J.; SAVAGE, J.; FAIRLEY, C.K.; GARLAND, S.M.; TABRIZI, S.N. Estimating the prevalence of *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and human papillomavirus infection in indigenous women in northern Australia. *Sexually Transmitted Disease*, v. 75, p. 431-434, 1999.

BUCKNER, F.S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009–2010. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 23, p. 609–616, 2010.

CARRILHO, E.; TAVARES, M.C.H.; LANÇAS, F.M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. *Química Nova*, v. 24, p.509-515, 2001.

CASSEL, E.; FRIZZO, C.D.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINI, L.; LORENZO, D., DELLACASSA, E. Extraction of *Baccharis* oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 39, p. 4803-4805, 2000.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W. Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais. In: Eduardo Cassel e Leandro Machado Rocha. (Org.). *Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapêuticos*. 2 ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 213-228, 2008.

CERVO, L.; ROZIO, M.; EKALLE-SOPP, C.B.; GUIISO, G.; MORAZONNI, P.; CACCIA, S. Role of hyperforin in the anti-depressant like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacology*, v. 164, p. 423-428, 2002.

CHAPLIN, D.D. Overview of immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, p. S3-23, 2010.

CHIN, Y-W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drug Discovery From Natural Sources. In *Drug Addiction. From Basic Research to Therapy*, Rapaka, R.S., Sadée, W., Eds.; Springer / American Association of Pharmaceutical Scientists, New York, p. 17-39, 2008.

CHOSE, O.; SARDE, C.O; GERBOD, D.; VISCOGLIOSI, E.; ROSETO, A. Programmed cell death in parasitic protozoans that lack mitochondria, *Trends in Parasitology*, v. 19, p. 559-564, 2003.

COTCH, M.F.; PASTOREK, J.G.; NUGENT, R.P.; YERG, D.E.; MARTIN, D.H.; ESCHENBACH, D.A. Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. *Obstetrics and Gynecology*, v. 78, p. 1087-1092, 1991.

COTCH, M.F.; PASTOREK, J.G.; NUGENT, R.P.; HILLIER, S.L.; GIBBS, R.S.; MARTIN, D.H.; ESCHENBACH, D.A.; EDELMAN, R.; CAREY, J.C.; REGAN, J.A.; KROHN, M.A.; KLEBANOFF, M.A.; RAO, A.V.; RHOADS, G.G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sexually Transmitted Disease*, v. 24, p. 353-360, 1997.

CUDMORE, S.L.; DELGATY, K.L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S.F.; PETRIN, D.P.; GARBER, G.E. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 783-793, 2004.

CUI, Y.; ANG, C.Y.W. Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of phloroglucinols from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2755-2757, 2002.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.B.F.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.I.N.; LAMB, L.; HASS, M.E.A.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v. 10, p. 511-516, 2003.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.B.F.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 291-293, 2005.

DÍAZ-MAROTO, M.C.; DÍAZ-MAROTO, H.I.J.; SÁNCHEZ-PALOMO, E.; PÉREZ-COELLO, M.S. Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5385-5389, 2005.

FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S.M.K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.B.F.; BERNARDI, A.P.M.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v. 12, p. 236-240, 2005.

FERRAZ, A.B.F.; BORDIGNON, S.A.L.; STAATS, C.; SCHRIPSEMA, J.; VON POSER, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*, v. 57, p. 1227-1230, 2001.

FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPSEMA, J.; POHLMANN, A.R.; VON POSER, G.L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 989-991, 2002a.

FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D.R.A.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum* (Guttiferae). *Pharmaceutical Biology*, v. 40, p.294-297, 2002b.

FERRAZ, A.B.F.; GRIVICICH, I.; VON POSER, G.L.; HENRIQUES, A.T.; FARIA, D.H.; KAYSER, G.B.; SCHWARTSMANN, G.; DA ROCHA, A.B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. *Fitoterapia*, v. 76, p. 210-215, 2005a.

FERRAZ, A.B.F.; ROCHA, A.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A.T.; VON POSER, G.L. Screening for the antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine*, v. 12, p. 112-115, 2005b.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade, p. 123-146, 2003.

FREARSON, J.A.; WYATT, P.G.; GILBERT, I.H.; FAIRLAMB, A.H. Target assessment for antiparasitic drug discovery. *Trends in Parasitology*, v. 23, p. 589-595, 2007.

FRITZ, D.; VENTURI C.R.; CARGNIN, S.T.; SCHRIPSEMA, J.; ROEHE P.M.; MONTANHA, J.; VON POSER, G.L. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 517-520, 2007.

FRÖLICH, S.; SCHUBERT, C.; BIENZLE, U.; JENETT-SIEMS, K. *In vitro* antiplasmodial activity of prenylated chalcone derivatives of hops (*Humulus lupulus*) and their interaction with haemin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, p. 883-887, 2005.



FURTADO, M.B.; BENCHIMOL, M. Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* and human epithelial cells. *Parasitology Research*, v. 84, p. 213-220, 1998.

GARCIA, A.F.; ALDERETE, J.F. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiology*, v. 25, p. 7-116, 2007.

GIORDANI, R.B.; VIEIRA, P.B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D.B.; SOUZA, A.P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G.A.; BOGO, M.R.; ZUANAZZI, J.A.; TASCIA T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 2019-2023, 2010.

GLISIC, S.; SMELCEROVIC, A.; ZUEHLKE, S.; SPITELLER, M.; SKALA, D.J. Extraction of hyperforin and adhyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 45, p. 332-337, 2008.

GNERRE, C.; VON POSER, G.L.; FERRAZ, A.; VIANA, V.; TESTA, B.; RATES, S.M.K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1273-1279, 2001.

GRIVICICH I.; FERRAZ A.; FARIA D.H.; REGNER A.; SCHWARTSMANN G.; HENRIQUES A. T.; VON POSER G.L.; DA ROCHA A.B. Synergistic effect of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum* in U-373 MG glioblastoma cell line. *Phytotherapy Research*, v. 22, p. 1577-1580, 2008.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M.B.; CRAMER, D.W. Relation of Tubal Infertility to History of Sexually Transmitted Diseases. *American Journal of Epidemiology*, v. 137, p. 577-584, 1993.

HAAS, J.S.; VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. *Planta Medica*, v. 76, p. 1419-1423, 2010.

HARVEY A.L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 9, p. 294-232, 2007.

HERRERO M.; MENDIOLA J.A.; CIFUENTES A.; IBANEZ E. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.

HONIGBERG, B. M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M. (Ed.). *Trichomonads Parasitic in Humans*. New York: *Springer*, p. 05-35, 1990.

HUPPERT, J.S. Trichomoniasis in teens: an update. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v. 21, p. 371-378, 2009.

JOHNSTON, V.J.; MABEY, D.C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion Infection Disease*, v. 21, p. 56-64, 2008.

KLEBANOFF, M.A.; CAREY, J.C.; HAUTH, J.C.; HILLIER, S.L.; NUGENT, R.P.; THOM, E.A.; ERNEST, J.M.; HEINE, R.P.; WAPNER, R.J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MIODOVNIK, M.; SIBAI, B.M.; DORSTEN, J.P.V.; DOMBROWSKI, M.P.; O'SULLIVAN, M.J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J.M.; LEVENO, K.J. Failure of Metronidazole to Prevent Preterm Delivery among Pregnant Women with Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 487-493, 2001.

KRIEGER, J.N.; JENNY, C.; VERDON, M.; SIEGEL, N.; SPRINGWATER, R.; CRITCHLOW, C.W.; HOLMES, K.K. Clinical manifestations of trichomoniasis in men. *Annals of Internal Medicine*, v. 118, p. 844-849, 1993.

KROEMER, G; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 1004-1010, 2008.

KUCKNOOR, A.S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J.F. Heterologous expression in *Trichomonas foetus* of functional *Trichomonas vaginalis* AP65 adhesin. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 887-897, 2005.

LANÇAS, F.M.; VILEGAS, J.H.Y.; NOSSACK, A.C.; VASCONCELOS, E.C.; CELEGHINI, R.M.S.; CAPPELARO, E.A.; VON BAER, D.; ESCALONA, A.; HASEGAWA, M. Novas aplicações de sistemas SFE " Home Made". II. Plantas da América do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, p. 418-422, 1997.

LANÇAS, F.M. Extração com fluido supercrítico: *quo vadis?* *Revista Analytica*, v. 02, p. 30-36, 2002.

LEHKER, M.W.; ALDERETE, J.F. Biology of Trichomonosis. *Current Opinion in Infection Disease*, v. 13, p. 37-45, 2000.

LÓPEZ, L.B.; BRAGA, M.B.M.; LÓPEZ, J.O.; ARROYO, R.; COSTA E SILVA FILHO, F. Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 10, p. 173-186, 2000.

MACIEL, G.P.; TASCA, T.; DE CARLI, G.A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 40, p. 152-160, 2004.

McCHESNEY, J.D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MENDZ, G.L.; MÉGRAUD, F. Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? *Trends in Microbiology*, v. 10, p. 370-375, 2002.

MILLER, W.C.; SWYGARD, H.; HOBBS, M.M.; FORD, C.A.; HANDCOCK, M.S.; MORRIS, M.; SCHMITZ, J.L.; COHEN, M.S.; HARRIS, K.M.; UDRY, J.R. The prevalence of trichomoniasis in young adults in the United States. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 32, p. 593-598, 2005.

MÜLLER, M. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, v. 139, p. 2879-2889, 1993.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

NÖR, C.; FERRAZ, A.B.F.; ALBRING, D.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILHAUME, D.; VON POSER, G.L. Chemotaxonomic features of phloroglucinol derivatives occurring in *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 517-519, 2004.

NÖR, C. Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre: UFRGS, 2006.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p. 299-310, 2006.

PETERSON, K.M.; ALDERETE, J.F. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infectetion and Immunity*, v. 37, p. 755–762, 1982.

POURMORTAZAVI, S.M.; HAJIMIRSADEGH, S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1163, p. 2-24, 2007.

PROVENZANO, D.; ALDERETE, J.F. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, v. 63, p. 3388-3395, 1995.

RENDÓN-MALDONADO, J.G.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. *Experimental Parasitology*, v. 89, p. 241-250, 1998.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Review: supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, p. 146-166, 2006.

RIBEIRO, V.L.S.; TOIGO, E.; BORDIGNON, S.; GONÇALVES, K.; VON POSER, G. L. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 147, p. 199-203, 2007.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. *Trigynobrathys*. *Bulletin of the British Museum - Nature History (Bot)*, v. 20, p. 1-151, 1990.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Clusiaceae). 4(3). Section 9. *Hypericum sensu lato* (part 3): subsection 1. *Hypericum* series 2. Senanensia,

subsection 2. Erecta and section 9b. Graveolentia. *Systematics and biodiversity*, v. 4, p. 19-98, 2006.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI- EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 36, p. 1381-1385, 1994.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; STOECKLI- EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1447-1452, 1995.

RÖMPP, H.; SEGER, C.; KAISER, C.S.; HASLINGER, E.; SCHMIDT, P.C. Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. *Europe Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 21, p.443-451, 2004.

SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 239-245, 2001.

SCHWEBKE, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 794-803, 2004.

SEGER, C.; RÖMPP, H.; STURM, S.; HASLINGER, E.; SCHMIDT, P.C.; HADACEK, F. Characterization of supercritical fluid extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by HPLC-MS and GC-MS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 21, p. 453-463, 2004.

SOARES, D.C.; PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A.; SARAIVA, E.M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitology International*, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOBEL, J.D.; NAGAPPAN, V.; NYIRJESY, P. Metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis-an emerging problem. *New England Journal of Medicine*, v. 341, p. 292-293, 1999.

STOLZ, E.D.; HAAS, J.S.; GRAZZIOTIN, L.; WILD, L.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. Uliginosina, um floriglucinol isolado de *Hypericum polyanthemum*, apresenta efeito antinociceptivo mediado pela neurotransmissão dopaminérgica. *V Oficina de neurociências-Fronteiras da Investigação*, Garibaldi, Brasil, 2008.

VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R.A.; CHEN, P.L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C.S. *Trichomonas vaginalis* Infection and Human Immunodeficiency Virus Acquisition in African Women. *Journal of Infection Disease*, v. 197, p. 548-554, 2008.

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; BOMBARDELLI, E.; BRUN, R. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure–activity study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, p. 1544-1548, 2007.

VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.; FENNER, R.; RATES, S.M.K. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 631-634, 2003.

VIANA, A.F.; DO REGO, J.C.; MUNARI, L.; DOURMAP, N.; HECKLER, A.P.; DALLA COSTA, T.; VON POSER, G.L.; COSTENTIN, J.; RATES, S.M.K. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham.& Schltdl.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 20, p. 507-514, 2006.

VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v. 39, p. 71-75, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. In: WHO, Geneva, pp 27–29. <[www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm](http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm)>.

ZARENA, A.S.; UDAYA SANKAR, K. Supercritical carbon dioxide extraction of xanthenes with antioxidant activity from *Garcinia mangostana*: Characterization by HPLC/LC–ESI-MS. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 49, p. 330-337, 2009.

ZHANG, Z.F.; BEGG, C.B. Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *International Journal of Epidemiology*, v. 23, p. 682-690, 1994.