



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA CLÍNICA**

MARIA SUÊNIA PEREIRA DA SILVA

**ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO
SEMI-ÁRIDO NORDESTINO: CONTRIBUIÇÃO PARA O TRATAMENTO DE
INFECÇÕES DA CAVIDADE BUCAL**

CAMPINA GRANDE - PB

JULHO/2011

MARIA SUÊNIA PEREIRA DA SILVA

**ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO
SEMI-ÁRIDO NORDESTINO: CONTRIBUIÇÃO PARA O TRATAMENTO DE
INFECÇÕES DA CAVIDADE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Odontologia, área de Clínica Odontológica.

Orientadora: Ana Cláudia Dantas de Medeiros

CAMPINA GRANDE - PB

JULHO/2011

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

S586e Silva, Maria Suênia Pereira da.

Ensaio pré-clínicos com extratos de plantas medicinais do semi-árido nordestino [manuscrito]: contribuição para o tratamento de infecções da cavidade bucal / Maria Suênia Pereira da Silva. – 2011.

81 f.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2011.

“Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia”.

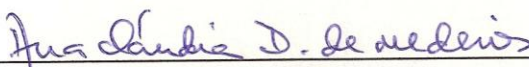
1. Plantas Medicinais. 2. Semi-árido Nordeste. 3. Atividade antimicrobiana. I. Título.

21. ed. CDD 581.634

**ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS COM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO
SEMI-ÁRIDO NORDESTINO: CONTRIBUIÇÃO PARA O TRATAMENTO DE
INFECÇÕES DA CAVIDADE BUCAL**

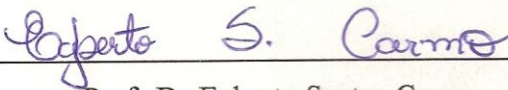
Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Odontologia, área de Clínica Odontológica.

BANCA EXAMINADORA



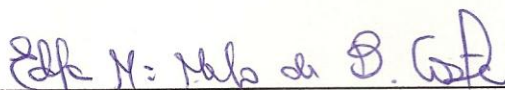
Prof^a Dr^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros

Orientadora (DF/CCBS/UEPB)



Prof. Dr Egberto Santos Carmo

Examinador Externo (UAS/CES/UFCG)



Prof^a Dr^a Edja Maria de Melo Costa

Examinadora Interna (DO/CCBS/UEPB)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me apoiam e não
medem esforços para que as minhas
escolhas sejam bem sucedidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me orienta em tudo o que faço.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Dantas de Medeiros pela orientação, amizade, paciência, compreensão e pelos ensinamentos que foram úteis durante este mestrado e o serão por toda a vida.

Aos meus amigos e colaboradores do Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (Labdem), Amaro, Anne, Cleildo Santana, Deisiane Brandão, Eveline, Felipe Hugo, Laiane, Monike, Ravelly e Thiago que me ensinaram e me ajudaram loucamente durante o curso de mestrado.

Aos meus pais e meu irmão que sempre me apoiaram e me ajudaram em todas as minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Germano Vêras pela análise estatística dos resultados do estudo *in vitro*.

À Prof^ª. Dr^ª. Wanda Lúcia dos Santos e ao seu orientando, Alexandre Medeiros pela colaboração no estudo de toxicidade aguda *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Walclécio Lira pela colaboração no estudo de mutagenicidade *in vivo*.

Aos professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Odontologia, à Capes e à Universidade Estadual da Paraíba responsáveis pela existência desse mestrado.

Ao Prof. Dr. Rui O. Macêdo, da UFPB, pela nebulização dos extratos de *S. brasiliensis* e *X. americana* e aos seus orientandos de doutorado José Valdilanio V. Procópio e Lidiane C. Pinto pela realização da técnica.

Ao biotério da Faculdade de Medicina da UFCG, campus I, pela doação dos animais utilizados nos ensaios de toxicidade aguda e de mutagenicidade. Especialmente ao técnico Sr. Paulinho.

À professora Raissa Catão pela utilização do laboratório de atividade antimicrobiana.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado o uso da medicina tradicional de forma integrada com a medicina ocidental moderna nos sistemas de saúde. No Brasil já existe uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e um dos seus objetivos é disponibilizar plantas medicinais e /ou fitoterápicos para as unidades de saúde do serviço público. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de plantas medicinais do semi-árido do Nordeste sobre microorganismos da cavidade bucal, bem como verificar *in vivo* a toxicidade aguda e a presença de ação mutagênica proveniente dos extratos hidroalcoólicos que apresentaram os maiores halos de inibição do crescimento antimicrobiano. Foram produzidos cinco extratos de cada planta estudada e realizado um *screening* microbiológico. A ação antimicrobiana foi avaliada pelo método da difusão em ágar, utilizando a técnica do cilindro. Os testes de toxicidade aguda foram realizados utilizando ratos Wistar adultos e *Artemia salina*. Para o ensaio de mutagenicidade foi utilizado o teste do micronúcleo. As plantas que apresentaram melhor atividade microbiológica foram principalmente *Schinopsis brasiliensis* Engl. e *Ximenia americana* L., das quais foram produzidas os extratos nebulizados, com o objetivo de se realizar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Apenas o extrato da *S. brasiliensis* produziu, na CIM, halos de inibição do crescimento microbiano, os quais só foram observados frente à *Stafilococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Não sendo observados halos em *Streptococcus oralis* e *Enterococcus faecalis*, provavelmente porque os princípios ativos aos quais estas bactérias são sensíveis, foram destruídos durante o processo de nebulização do extrato. O mesmo ocorreu com os extratos secos da *X. americana* L. que não apresentaram nenhuma ação antimicrobiana contra as cepas testadas. No ensaio de toxicidade aguda com ratos os resultados indicaram que os extratos de *S. brasiliensis* e *X. americana* administrados apresentaram baixa toxicidade. No ensaio de toxicidade com *A. salina*, esses extratos foram tóxicos. No teste do micronúcleo os extratos de *S. brasiliensis* e *X. americana* apresentaram atividade mutagênica em camundongos. Assim, nas concentrações em que foram utilizados, os extratos da *S. brasiliensis* e da *X. americana* apresentaram atividade antimicrobiana, baixa toxicidade em ratos, foram tóxicos para *A. salina* e mutagênicos para camundongos.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas Medicinais, Semi-árido Nordeste, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) has encouraged the use of traditional medicine integrated with modern medicine in health systems. In Brazil there is already a National Policy on Herbal and Medicinal Plants and one of its goals is to provide herbal and / or herbal medicines to health of public service. In this context, the objective was to evaluate in vitro the antimicrobial activity of medicinal plants of the semi-arid Northeast over microorganisms from the oral cavity, and to verify in vivo the presence of acute toxicity and mutagenic action of hydroalcoholic extracts from that presented the largest halos antimicrobial growth inhibition. Five extracts were produced from each plant studied and performed a microbiological screening. The antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion method, using the technique of the cylinder. The acute toxicity tests were conducted using rats and *Artemia salina* of larva. For the mutagenicity test was used the micronucleus test. Plants with improved microbial activity was mainly *Schinopsis brasiliensis* Engl. and *Ximena americana* L., which were produced nebulized extracts, with the objective of performing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Only the extract of *S. brasiliensis* produced in MIC which were only observed against the *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Halos antimicrobial growth inhibition were not observed in *Streptococcus oralis* and *Enterococcus faecalis*, probably because the active ingredients to which these bacteria are sensitive, were destroyed during the process of spraying the extract. The same occurred with the dry extracts of *X. americana* L. not present any antimicrobial activity against the strains tested. In acute toxicity test with rats results indicated that extracts of *S. brasiliensis* administration showed low toxicity. In the toxicity test with *A. salina*, these extracts were toxic. Micronucleus test in extracts of *S. brasiliensis* showed mutagenic activity in mice. Thus, in concentrations that were used, extracts of *S. brasiliensis* and *X. americana* showed antimicrobial activity, low toxicity in rats, were toxic to *A. salina* and mutagenic for mice.

KEYWORDS: Medicinal Plants, Semi-arid Northeast, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - <i>Acanthospermum hispidum</i> DC	27
Figura 02 – <i>Ximenia americana</i> L	28
Figura 03 - <i>Annona coriácea</i> Mart.	30
Figura 04 - <i>Hyptis mutabilis</i> (rich.) Briq.	32
Figura 05 - <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	33
Figura 06- Peso do fígado dos animais tratados.	60
Figura 07- Peso dos rins dos animais tratados.	61
Figura 08 - Peso do coração dos animais tratados.	61
Figura 09 - Peso do pulmão dos animais tratados.	62
Figura 10 - Peso dos animais tratados durante o estudo.	62
Figura 11. Consumo de ração dos animais tratados durante o estudo.	63
Figura 12. Consumo de água dos animais tratados durante o estudo	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico obtido a partir de todas as partes do <i>A. hispidum</i> para as cepas analisadas.	49
Tabela 02 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico obtido a partir da raiz do <i>A. hispidum</i> para as cepas analisadas.	50
Tabela 03 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico obtido a partir da cascas da <i>X. americana</i> contra as cepas analisadas.	52
Tabela 04 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico da <i>S. brasiliensis</i> para cepas analisadas.	53
Tabela 05 – Distribuição das médias da CIM dos extratos nebulizados de <i>S. brasiliensis</i> em diferentes concentrações, para as cepas analisadas.	55
Tabela 06 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos da raiz do <i>A. hispidum</i> em diferentes quantidades, nas cepas testadas.	56
Tabela 07 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos de todas as partes do <i>A. hispidum</i> em diferentes quantidades, nas cepas testadas.	56
Tabela 08 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos da <i>X. americana</i> , em diferentes quantidades, nas cepas testadas.	57
Tabela 09 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico <i>S. brasiliensis</i> em diferentes quantidades, na cepa testada.	58
Tabela 10 – Distribuição do percentual das larvas de <i>A. salina</i> mortas, imersas em soluções com diferentes concentrações do extrato nebulizado da <i>X. americana</i> .	59
Tabela 11- Distribuição do percentual das larvas de <i>A. salina</i> mortas, imersas em soluções com diferentes concentrações do extrato nebulizado da <i>S. brasiliensis</i> .	59
Tabela 12 - Distribuição da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongos tratados com o extrato da <i>S. brasiliensis</i> .	64
Tabela 13 - Distribuição da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongos tratados com extrato da <i>X. americana</i> .	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – American Type Culture Collection
BBO – Bibliografia Brasileira de Odontologia
BHI – Brain Heart Infusion
CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CL₅₀ – Concentração Letal Média
DMSO - dimetilsulfóxido
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
GM – Gabinete do Ministro
IHO-S – Índice de Higiene Oral Simplificado
ISG – Índice de Sangramento Gengival
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
OECD – Organization for Economic Co-operation and Development
OMS – Organização Mundial de Saúde
pH – Potencial hidrogeniônico
PMCC – Paramonoclorofenolcanforado
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PSF – Programa de Saúde da Família
SUS – Sistema Único de Saúde
UEPB – Universidade Estadual da Paraíba
UFC – Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivo Específico	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Etnofarmacologia	18
3.2	Plantas Medicinais	18
3.2.1	Plantas Medicinais com Atividade Antimicrobiana	19
3.2.2	Utilização de Plantas Medicinais na Odontologia	22
3.2.3	Plantas Medicinais Utilizadas neste Estudo	26
3.2.3.1	<i>Acanthospermum hispidum</i> DC (Carrapixo-de-cigano)	26
3.2.3.2	<i>Ximenia Americana</i> (Ameixa)	28
3.2.3.3	<i>Annona coriácea</i> (Araticum)	30
3.2.3.4	<i>Hyptis mutabilis</i> (rich.) Briq. (Alfavaca)	31
3.2.3.5	<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. (Braúna)	33
3.3	Avaliação da Toxicidade Aguda de Plantas Medicinais	34
3.4	Avaliação da Atividade Mutagênica de Plantas Medicinais	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Amostras	40
4.2	Obtenção dos Extratos	40
4.2.1	Extratos Hidroalcoólicos	40
4.2.2	Extratos Nebulizados	41
4.3	SCREENING MICROBIOLÓGICO	41
4.3.1	Cepas Microbianas	41
4.3.2	Meios de Cultura	42
4.3.3	Controles Utilizados	42
4.3.4	Preparação da Suspensão Microbiana	42
4.3.5	Ensaio Microbiológico por Difusão em Ágar	43
4.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	44
4.5	Determinação da Quantidade Mínima Eficaz (QME)	44
4.6	Ensaio de Toxicidade Aguda	44
4.6.1	Teste de Letalidade com <i>Artemia salina</i>	44
4.6.2	Ensaio de Toxicidade Aguda com Ratos	45
4.7	Ensaio de Mutagenicidade dos Extratos	46
4.7.1	Teste do Micronúcleo	46
4.7.2	Tratamento dos Animais e Coleta do Sangue Periférico	47
4.8	Análise Estatística dos Dados	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Atividade Antimicrobiana dos Extratos Testados	49
5.1.1	<i>Screening</i> Microbiológico	49

5.1.2	Concentração Inibitória Mínima (CMI)	54
5.1.3	Quantidade Mínima Eficaz (QME)	55
5.2	Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Artemia salina</i>	58
5.3	Ensaio de Toxicidade Aguda com Ratos	59
5.4	Ensaio de Mutagenicidade	63
6	CONCLUSÕES	65
	REFÊRENCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem uma importante fonte de novos componentes biologicamente ativos, resultando em valiosos produtos, freqüentemente usados no tratamento de doenças. O uso de plantas ou preparações feitas a partir delas, para tratar infecções, é uma prática antiga, utilizada por uma boa parte da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento, no qual o acesso aos serviços públicos de saúde é geralmente limitado. Os componentes antimicrobianos de plantas podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por outros mecanismos diferentes, do que aqueles presentes nos antimicrobianos em uso, tendo um significativo valor clínico (ANIBAL, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado o uso da Medicina Tradicional/Medicina Complementar de forma integrada com a Medicina ocidental moderna, nos sistema de saúde. Com base nisso, no Brasil foi aprovada e publicada, por meio de Portaria GM nº 971, de 03 de maio de 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, na qual está inserida a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, cujo um dos objetivos é disponibilizar plantas medicinais e /ou fitoterápicos nas unidades de saúde (BRASIL, 2006).

No Brasil, muitas espécies de plantas são utilizadas de forma empírica, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Assim como mencionado por Cunha; Silva; Roque (2003), o que se observa é que num país com enorme biodiversidade de plantas com ação medicinal, ainda são poucas as pesquisas sobre o seu potencial terapêutico. Além do que é perceptível que existe por parte de alguns pacientes e da própria classe odontológica e médica um certo preconceito quanto à Fitoterapia, pois ainda perdura a mentalidade de que esse método terapêutico é uma pratica típica de curandeirismo (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

No semi-árido brasileiro, região que ocupa 11,5% do território nacional, existe aproximadamente oito mil espécies vegetais. Diante dessa vasta biodiversidade e da necessidade da descoberta de novas moléculas bioativas, é de fundamental importância o estudo farmacológico da flora dessa região, ainda pouco estudada sob esse aspecto (NOVAIS et al., 2003).

Novais et al. (2003) investigaram espécies nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro com o intuito de descobrir novas drogas antimicrobianas. Os ensaios foram realizados contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dos 137 extratos de vegetais avaliados, sete apresentaram atividade significativa contra o *Staphylococcus aureus*. Essas plantas foram: *Esenbeckia grandiflora* Mart., *Esenbeckia grandiflora* Mart., *Galipea simplicifolia* (Nees & Mart.) Engl., *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia pyramidalis* Tul. e *Acacia riparia* Kunth.

Em estudo etnofarmacológico realizado no município de Porto de Folha no semi-árido sergipano foram mencionadas 93 espécies vegetais. A maioria delas é empregada com fins terapêuticos. Entre essas plantas foram selecionadas e testadas *in vivo*, em ratos, quatro espécies que segundo os entrevistados, apresentavam atividade depressora do sistema nervoso central (SNC). A ação depressora do SNC foi observada nas espécies *Amburana cearensis* Fr. All., *Astronium urudueva* Engl. e *Lippia Mycrophylla* Cham (OMENA, 2007).

Almeida et al. (2007) avaliaram a eficácia das plantas, *in natura*, melão de São Caetano (*Momordica charantia*), batata de purga (*Operculina hamiltonii*) e sementes de Jerimum (*Curcubita pepo*L), plantas nativas do semi-árido paraibano, sobre infecções helmínticas em caprinos naturalmente infectados. Após 30 e 60 dias do tratamento, houve uma redução média de 63,06% e 2,70% para o grupo tratado com melão de São Caetano, 63,9% e 72,32% para o grupo tratado com batata de purga e 87,31% e 24% para o grupo tratado com a semente de jerimum, respectivamente.

Em estudo etnofarmacológico realizado por SOUZA (2009) em Campina Grande, uma cidade do semi-árido paraibano, verificou-se que as plantas: ameixa (*Ximenia americana* L.), alfavaca-de-caboclo (*Hyptis mutabilis* Briq.), araticum (*Annona coriacea* L.), braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) e carrapicho de cigano (*Acanthospermum hispidum* DC.) foram mencionadas pelos entrevistados como sendo eficazes no tratamento de infecções.

As Diretrizes para Plantas Medicinais e Fitoterapia afirmam que deve haver uma elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, sendo essa lista de espécies com informações sobre seus usos por comunidades locais uma das grandes contribuições desses estudos, devendo ocorrer também um provimento do acesso a plantas medicinais e fitoterápicos aos usuários do SUS (BRASIL, 2006).

Contudo, a validação da eficácia das plantas medicinais, a padronização de matérias-primas vegetais e o desenvolvimento de metodologias analíticas para obtenção e análises desses novos medicamentos se constitui no fator limitante na busca do produto fitoterápico com qualidade, segurança e eficácia cientificamente comprovada. Para tanto se faz necessário enfrentar o desafio da construção de um modelo específico e simples que possa atender o mais rapidamente possível as necessidades do mercado e dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS).

Na área da odontologia algumas pesquisas já foram desenvolvidas, as quais indicam plantas medicinais que possivelmente possam ser utilizadas para produção de um medicamento fitoterápico de uso odontológico. Assim, Macedo-Costa et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato da folha de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus casei*. Os resultados obtidos mostraram que o extrato de jabuticabeira produziu uma significativa atividade bacteriostática *in vitro* sobre as bactérias do biofilme dental, o que sugere a utilização dessa planta como meio alternativo e economicamente viável para o controle de afecções em Odontologia.

Alves et al. (2009) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana e antiaderente das cascas da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* All), das folhas da malva (*Malva Sylvestris*) e das folhas da goiabeira (*Psidium guajava* Linn) sobre microrganismos do biofilme dental e candidose oral. Os extratos mostraram-se eficazes, inibindo o crescimento das bactérias do biofilme dental e fungos da candidose oral, sugerindo a utilização dessas plantas como meio alternativo na terapêutica odontológica.

Neste contexto pesquisas que objetivem realizar ensaios de atividade antimicrobiana e ensaios pré-clínicos com plantas do semi-árido nordestino, com a finalidade de que possivelmente sejam utilizadas com matéria-prima farmacêutica para produção de medicamentos de uso odontológico são de suma importância, pois contribuirão com elaboração de uma possível relação regional de plantas medicinais, que poderá ser utilizada pelo sistema de saúde local.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas medicinais do semi-árido do Nordeste sobre microrganismos da cavidade bucal, bem como verificar *in vivo* a toxicidade aguda e a presença de ação mutagênica das plantas medicinais estudadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos das plantas selecionadas, em diferentes proporções de misturas hidroalcoólicas.
- Realizar um *screening* microbiológico dos extratos produzidos, com a finalidade de se obter, o que possui melhor atividade contra os patógenos testados;
- Obter extratos nebulizados, a partir dos extratos hidroalcoólicos que possuem melhor atividade contra os patógenos testados;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos nebulizados produzidos frente aos diferentes microrganismos;
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos vegetais nebulizados em ratos e em *Artemia salina*;
- Avaliar a mutagenicidade dos extratos vegetais nebulizados em camundongos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Etnofarmacologia

A Etnofarmacologia é o ramo da etnobiologia constituído com base na atuação conjunta dos conhecimentos provenientes das ciências médicas, natural e social (ETKIN; ELISABETSKY, 2005). Ela funciona como atalho para a descoberta de novos medicamentos, uma vez que o uso tradicional pode ser visto como uma pré-triagem de plantas com alguma atividade terapêutica em humanos (SIMÕES, 2007; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Em um levantamento etnofarmacológico realizado por Coelho et al. (2005), na comunidade mumbuca localizada no Jalapão – TO, foram coletadas 26 espécies pertencentes a 23 famílias. Os dados coletados revelam o uso das plantas medicinais para o tratamento de febre, gripe, dores no estômago e rins, inflamações, diarreia, cólicas, ferimentos na pele, doenças cardíacas e hepáticas.

Em outro levantamento mais recente foram indicadas 66 espécies de plantas medicinais, distribuídas em 33 famílias sendo a Asteraceae a que apresentou o maior número de espécies (OLIVEIRA; KFFURI; CASALI, 2010).

Melo et al. (2011) analisaram artigos envolvendo plantas medicinais do Brasil, com ação anti-câncer, publicados entre 1980 e 2008 e verificaram que 84 espécies de plantas medicinais foram mencionadas como úteis na prevenção ou tratamento de tumores benignos e malignos. As plantas mais frequentemente citadas foram: *Aloe vera*, *Euphorbia tirucalli*, e *Tabebuia impetiginosa*. A maioria dos estudos selecionados foi realizada em comunidades rurais e em área urbanas que tinham curandeiros tradicionais.

3.2 Plantas Medicinais

Antes consideradas práticas associadas às populações menos favorecidas, a comercialização e utilização de plantas medicinais como opção de tratamento e cura, tem aumentado em todas as classes sociais. Estudos mostram que, no Brasil, 80% da população utilizam plantas medicinais como a principal fonte de recurso terapêutico (MACIEL et al., 2002).

O Brasil possui em torno de 15 a 20% da biodiversidade mundial. Ele possui ainda, 24% das plantas superiores e detém uma rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Para aproveitar toda essa biodiversidade do Brasil, foi aprovada e publicada, por meio de Portaria GM nº 971, de 03 de maio de 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, na qual está inserida a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos cujo um dos objetivos é disponibilizar plantas medicinais e /ou fitoterápicos nas unidades de saúde do serviço público (BRASIL, 2006).

Em 2009 foi divulgada uma lista com 71 espécies de plantas medicinais de interesse para o SUS, a RENISUS. Dentre estas constam a *Cynara scolymus* (alcachofra), *Schinus terebenthifolius* (aroeira da praia) e a *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), usadas pela sabedoria popular e confirmadas cientificamente, para distúrbios de digestão, inflamação vaginal e dores articulares, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

3.2.1 Plantas Mediciniais com Atividade Antimicrobiana

Existe uma vasta quantidade de plantas medicinais com potencial terapêutico. Algumas delas sintetizam metabólitos secundários como substâncias de defesa, quando são agredidas por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou outros agentes. Esses metabólitos possuem composição química variada, mas já se sabe que compostos como: terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonóides), compostos nitrogenados (alcalóides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos), cumarina e cânfora, possuem atividade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2003; RESCHKE et al., 2007).

Um levantamento bibliográfico etnobotânico sobre plantas utilizadas, pela população brasileira, no tratamento de sinais e sintomas relacionados às infecções fúngicas, revelou 409 espécies, distribuídas em 98 famílias, com maior concentração nas famílias Fabaceae e Asteraceae. Entre as dez espécies mais utilizadas, seis eram espécies nativas, são elas: *Anacardium occidentale* L., *Cecropia peltata* L., *Schinus molle* L.,

Schinus terebinthinifolius Raddi, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Tabebuia heptaphylla* (Vell.). Ainda nesse estudo, para as dez espécies mais citadas, foi realizada uma busca por estudos da sua atividade antifúngica, na base de dados MEDLINE-PubMed. Entretanto, só foram encontrados estudos para *Phytolacca americana* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Mirabilis jalapa* L. e *Schinus molle* L. (FENNER et al., 2006).

A composição farmacognóstica e a atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos de: *Rosmarinus officinalis*, *Plantago major*, *Tabebuia impetiginosa*, *Achillea millefolium*, *Nasturtium officinale*, e de uma formulação de enxaguatório bucal contendo estas plantas, foram avaliadas frente a: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Através do teste de difusão em disco, observou-se que os maiores halos de inibição foram produzidos para *E. faecalis*, *S. aureus* e *B. subtilis*, quando submetidos ao enxaguatório bucal contendo todos os extratos mencionados (CORDEIRO et al., 2006).

Em estudo que avaliou, *in vitro*, a suscetibilidade das bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* aos extratos das plantas: *R. officinalis*, *Origanum majorana*, *Salvia officinalis*, *Bidens pilosa*, *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon citratus*, *Sida rhombifolia* e *Leonotis nepetaefolia* pelo método de difusão em discos, os resultados mostraram que o extrato de *R. officinalis* inibiram o crescimento do *S. aureus*. Os extratos de *B. pilosa* e *O. majorana* inibiram o crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo esta última bactéria também susceptível ao extrato da *S. officinalis* (HAIDA et al., 2007).

Novais et al. (2003) avaliaram o potencial antimicrobiano de espécies vegetais nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro. Os ensaios foram realizados com cepas padrão de *S. aureus* e *E. coli*, pelo método de difusão em disco. Foram avaliados 137 extratos de vegetais, entre eles, somente os extratos de: *Esenbeckia grandiflora* Mart., *Galipea simplicifolia* (Nees & Mart.) Engl., *Hymenaea stigonocarpa* Leguminosae Mart. Ex., *Caesalpinia pyramidalis* Tul. e *Acacia riparia* Kunth, apresentaram atividade significativa contra o *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana de 11 substâncias, entre elas o extrato de própolis verde e este mesmo extrato em associação com Rifocort[®], Iodofórmio e Hidróxido de cálcio foi avaliada sobre cepas de *E. faecalis*. Analisando os resultados, os autores verificaram que o *E. faecalis* teve seu crescimento inibido pelas pastas constituídas por misturas de: Rifocort[®] com extrato de própolis verde, iodofórmio com PMCC e Rifocort[®] e extrato de própolis verde com Rifocort[®] e iodofórmio (COSTA et al., 2008).

Avaliando a atividade antimicrobiana de um extrato de *Uncaria tomentosa*, nas concentrações de 0,25 a 5,00%, pelo método de difusão em ágar, sobre as cepas de *S. mutans*, *Staphylococcus* spp., *Candida albicans*, *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*, foi verificado que o referido extrato até a concentração de 3,00% inibiu o crescimento de *Enterobacteriaceae*, *S. mutans* e *Staphylococcus* spp., não apresentando qualquer efeito inibitório sobre *P. aeruginosa* e *C. albicans* (CCAHUANA-VASQUEZ et al., 2007).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais obtidos de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela) puros e adicionados a formulações de um dentifrício foi avaliada sobre o *S. mutans* e o *L. casei*. Foi utilizado o método de difusão em ágar e através desse estudo verificou-se que tanto os óleos essenciais quanto os dentifrícios contendo esses óleos inibiram o crescimento bacteriano. Os halos de inibição variaram de 6,0 mm para o gel dentifrício contendo óleo de capim-limão, a 29,5 mm para o óleo de canela puro, superando os halos produzidos pela clorexidina a 1,00% (OLIVEIRA, LORSCHIEDER; NOGUEIRA, 2008).

Um estudo que avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., sobre cepas de: *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Shigella* sp., *Shigella flexneri*, *Salmonella* sp. e *Salmonella choleraesuis*, obteve resultados positivos contra todas as cepas. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) variaram, respectivamente, entre 0,5 - 2,0 mg/mL e 1,0 – 4,0 mg/mL (SILVA et al., 2010).

Um estudo com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica de extratos glicólicos a base de calêndula (*Calendula officinalis*), sálvia (*Salvia divinorum*), mamona (*Ricinus communis*) e própolis, sobre 20 cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal, mostrou que o extrato glicólico de própolis teve ação fungicida para todas as cepas de *C. albicans*. O extrato glicólico de sálvia apresentou capacidade fungicida para 80% das cepas. Já o extrato glicólico de calêndula demonstrou atividade fungicida apenas para 10% das cepas testadas (MOLINA et al., 2008).

Outro estudo que avaliou a atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* (hortelã) sobre cepas de *C. albicans* mostrou que o extrato mencionado apresentou atividade inibitória e fungicida sobre as amostras avaliadas (MATOS et al., 2009).

E ao avaliar a atividade antifúngica do extrato aquoso de folhas de *Arctium minus* (Hill) Bernh., sobre: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *C. dubliniensis*

e *C. krusei*, verificou-se que o referido extrato possuem efeito antifúngico e principalmente fungistático, contra todas as espécies de *Cândida* testadas (LUBIAN et al., 2010).

3.2.2 Utilização de Plantas Medicinais na Odontologia

As principais patologias bucais com etiologia associada a microorganismos, que acometem o homem são a cárie e a doença periodontal. A cárie dentária é a doença bucal de maior prevalência, com caráter multifatorial cujo início e progressão, dependem de três fatores primários e fundamentais, a saber: o hospedeiro suscetível que é o dente, um substrato local que é a sacarose e uma microflora cariogênica composta por bactérias acidófilas e acidegênicas, cujo principal patógeno é o *Streptococcus mutans* (KRIGER et al. 2003). *O lactobacillus casei* também é um relevante patógeno associado à cárie dental (LORENZO, 2004).

Pesquisas revelam que algumas delas estão diretamente relacionadas aos casos de insucessos no tratamento endodôntico. (RICUCCI; SIQUEIRA, 2008). Estudos mostram um aumento nos níveis de resistência bacteriana aos antimicrobianos. Tal resistência tem sido identificada na espécie *E. faecalis*, capaz de sobreviver nos túbulos dentinários e de reinfectar um canal obturado (LOVE, 2001). De acordo com Pinheiro et al. (2003), há uma maior prevalência dessa espécie em dentes com tratamento endodôntico falho, inclusive nos casos em que o retratamento foi realizado.

O *Staphylococcus aureus* também podem ser isolados da cavidade bucal. Essa bactéria é capaz de formar biofilmes que possuem uma matriz de polímeros extracelulares, composta principalmente de polissacarídeos de adesão intercelular que atuam diminuindo a penetração de agentes antimicrobianos (LOBERTO et al., 2004).

Já a candidose, cujo agente etiológico é o fungo da espécie *C. albicans* é a infecção fúngica bucal mais comum em humanos. O tratamento da candidose é feito com medicamentos como: nistatina, clotrimazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Entretanto, estes fármacos podem produzir reações adversas como náusea, vômito e diarreia além de efeitos colaterais (NEVILLE et al., 2004). Diante disso, muitos estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de descobrir substâncias que substituam esses fármacos.

No que concerne ao uso de plantas medicinais na Odontologia, os estudos revelam que doenças bucais como gengivite, abscesso e inflamações, vêm sendo tratadas com cravo

da Índia (*Syzygium aromaticum*), romã (*Punica granatum*) e uva (*Vitis* sp.) (BARRETO et al., 2005). Revelam ainda, que as plantas mais indicadas para afecções odontológicas são: *P. granatum* L., *Althaea officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Calendula officinalis* L., *Malva sylvestris* L., *Plantago major* L. (OLIVEIRA et al., 2007).

Em um levantamento de estudos envolvendo fitoterápicos, apresentado nas reuniões da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO), no período de 2000 a 2004, se verificou que as plantas mais estudadas foram: *Mikania laevigata* (guaco), *Mikania glomerata*, *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Mikania* sp (guaco), *Cymbopogon citratus* (capim-santo), *Arctium lappa* L. (bardana), *Solidago microglossa* DC (arnica brasileira), *Aloe vera* (Babosa), *Curcuma zedoaria* Roscoe (Açafrão), *Camomila recutita* (camomila), *Punica granatum* L. (romã), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira), *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Copaifera* sp e (copaíba), *Stryphnodendron barbatimam* (barbatimão), *Passiflora alata* (maracujá), *Melissa officinalis* L. (erva cidreira), *Matricaria chamomilla* L. (camomila), *Zingiber officinale* (gengibre), *Arnica montana* (arnica), *Casearia sylvestris* (guaçatonga), *Valeriana officinalis* L. (valeriana) e *Psidium guajava* L. (goiabeira) (PINHEIRO; ANDRADE, 2008).

Na pesquisa realizada por Santos et al., (2009) foi relatado que as plantas mais comercializadas para o tratamento de doenças bucais foram: *Pithecelobium avaremotemo* (barbatenon), *S. terebinthifolius* Raddi, *A. occidentale* L. e *Bumelia sartorum* Mart. (quixaba). Nesse estudo, também foram entrevistados os usuários do serviço de saúde pública e as plantas mais citadas pelos mesmos foram: *P. granatum* L. (romã), *A. occidentale* L., *Zizyphus joazeiro* Mart. (juá), e *Plectractus amboinicus* Lour (hortelã de folha graúda).

As tinturas de *S. terebinthifolius* e *Solidago microglossa* (Arnica) foram avaliadas quanto às suas propriedades antibacteriana e antiaderente, frente a *S. mutans* e *L. casei*. A atividade antibacteriana foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) do crescimento bacteriano e a atividade antiaderente foi estabelecida pela Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria a tubos de vidro, na presença de sacarose a 5%. Os resultados mostraram que as linhagens bacterianas testadas foram susceptíveis à ação das tinturas avaliadas. Com relação à CIM, os melhores resultados foram observados sobre a *L. casei*, apresentando a aroeira a menor CIM (1,562 mg / mL). Quanto a CIMA, a aroeira apresentou resultados mais satisfatórios frente a *S. mutans*, pois

foi capaz de inibir a aderência bacteriana ao vidro, até a concentração de 0,892 mg/mL (FREIRES et al., 2010).

Em estudo comparativo do uso de um dentifrício a base do extrato hidroalcoólico do fruto maduro da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) com o creme dental Colgate Total 12[®] frente aos índices de acúmulo de biofilme (IHO-S), doença gengival (ISG) e contagem de *S. mutans* salivar, foi verificado que os produtos testados apresentaram resultados semelhantes (JOVITO et al., 2009).

Em outro estudo, realizado no mesmo ano, o óleo essencial da *E. uniflora* L., na forma de spray, mostrou-se eficaz na descontaminação de escovas dentais contendo *S. mutans*, quando comparado com o controle positivo que foi a clorexidina a 2% (OLIVEIRA et al., 2009).

Os extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas da *E. uniflora* L., da casca do caule da *Persea americana* Miil. (Abacateiro), e das cascas dos frutos do *Citrus limon* L. (Limoeiro) e *Sicana odorifera* L. (Crua) foram avaliados quanto a sua atividade antibacteriana em *L. casei*. Nesse estudo verificou-se que não houve formação de halos de inibição de crescimento para os extratos de *Citrus limon* L. e *Sicana odorifera* L.. O extrato da *P. americana* L. apresentou CIM de 25 mg/mL. Já, o extrato da *E. uniflora* L., apresentou os melhores resultados, com uma CIM de 6,25 mg/mL (CASTRO et al., 2010).

Em recente estudo, os óleos essenciais de *E. uniflora* L. *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto) e *Menta piperita* (hortelã-pimenta) foram associados aos antibióticos: amoxicilina, azitromicina e eritromicina para verificar, *in vitro*, a sua atividade antimicrobiana sobre *S. mutans* e *Streptococcus mitis*. Os antibióticos foram avaliados isoladamente e associados às emulsões dos referidos óleos essenciais, na concentração de 320 µL/mL. Os resultados mostraram que o óleo de *E. uniflora* L. exerceu efeito antagônico sobre a eritromicina frente a *S. mutans* e efeito indiferente sobre azitromicina em *S. mitis*. Houve antagonismo quando esse óleo foi associado à amoxicilina. Os óleos das outras plantas produziram antagonismo quando associados à amoxicilina e sinergismo quando em associação com azitromicina e eritromicina (ALVES et al., 2011).

A ação de um gel fitoterápico de *P. granatum* Linn. foi comparada com a do agente antifúngico miconazol (Daktarin[®] gel oral) sobre *S. mutans*, *Streptococcus sanguis*, *S. mitis* e *Streptococcus mutans* isolado clinicamente e de cepas de *C. albicans*, separadamente ou associadas. Nesse estudo o referido gel apresentou uma eficácia maior do que a do miconazol (VASCONCELOS et al., 2006).

Em outro estudo, o objetivo foi avaliar a ação antimicrobiana do chá das folhas de *P. granatum* frente a microrganismos da saliva presentes em ligaduras ortodônticas elásticas. Para isso, as referidas ligaduras foram submersas em saliva e incubadas a 37°C por 1h. Após isso, 10 ligaduras foram submersas em chá de *P. granatum*, 10 em clorexidina e 10 não receberam nenhum tratamento, por um período de 5 minutos. Posteriormente, essas ligaduras foram postas em tubos contendo solução fisiológica e submetidos à intensa homogeneização. Feito isso, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em ágar BHI. Depois, os tubos de ensaio, contendo as ligaduras, foram incubados a 37°C por 24h. Passado esse tempo, verificou-se o número de UFC/mL de microrganismos recuperados de cada ligadura. Com o uso do chá de romã, a média de UFC/mL recuperada foi inferior ao controle negativo, mas significativamente superior à da clorexidina. (SCHREINER et al. 2009).

Ao avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto do *S. adstringens* contra microrganismos da cárie dentária, Soares et al. (2008) constataram que esse extrato foi ativo frente aos microrganismos *S. mitis* e *L. casei*.

Em outro estudo, a atividade antibacteriana e antiaderente do *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. (barbatenon) foram avaliadas frente a: *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. oralis* e *L. casei*. Verificou-se que o extrato da referida planta apresentou atividade antibacteriana similar ao digluconato de clorexidina a 0,12% frente a todas as linhagens ensaiadas. A CIM foi verificada na diluição 1:512 frente a *S. sanguinis*, *S. oralis* e *L. casei*. Já a CIMA foi observada na diluição de 1:512 para *S. sanguinis*, *S. mitis* e *S. oralis* (JESUS et al., 2010).

Em estudo *in vitro* o efeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) puro e incorporado a um enxaguatório bucal, foi avaliado frente a *S. mutans*. Nesse estudo, foram analisadas a CIM e o efeito na formação da placa bacteriana. A CIM obtida para o referido óleo essencial, foi de 100 µg/mL. Diante disso, procedeu-se o desenvolvimento do enxaguatório bucal. As análises da formação da placa bacteriana (ensaios microbiológicos, análise macroscópica de aderência e análises por microscopia eletrônica de varredura) confirmaram a eficácia desta nova formulação de enxaguatório bucal (SANTOS et al., 2010).

Avaliando a atividade antiaderente do extrato de *Matricaria Recutita* L. sobre *S. mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *L. casei*, observou-se que o referido extrato inibiu a

aderência do *S. sanguinis*, até a diluição 1:8, e das bactérias *S. mutans* e *L. casei*, até a diluição 1:4 (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Em estudo que avaliou a atividade antimicrobiana do extrato das folhas e caule de *Myrciaria cauliflora* berg. (jaboticabeira) sobre *C. albicans*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, Diniz et al. (2007), verificaram que o extrato da folha de *M. cauliflora* produziu atividade antifúngica sobre *C. albicans* até a diluição 1:2 e frente a *C. krusei* quando o extrato estava na concentração inicial 1:1. O extrato do caule da referida planta apresentou atividade sobre *C. albicans* até a diluição 1:2 e sobre *C. guilliermondii* e *C. krusei* até a diluição 1:8, indicando, portanto, que os extratos dessa planta possuem algum potencial antifúngico.

3.2.3 Plantas Medicinais Utilizadas neste Estudo

As plantas utilizadas neste estudo foram selecionadas com base em um estudo etnofarmacológico realizado por Souza (2009) em cinco Centros de Saúde do município de Campina Grande, Paraíba, Brasil.

3.2. 3.1 *Acanthospermum hispidum* DC (Carrapicho-de-cigano)

A. hispidum DC pertence à família Asteraceae que é representante da maior família dentre as Angiospermas com 25.000 espécies distribuídas em 1.100 gêneros. No Brasil, é relatada a ocorrência de cerca de 180 gêneros. Conhecida como “a família das margaridas”, é encontrada em todas as partes do mundo, com exceção da Antártica (MARTINS et al., 2006).

Uma revisão de literatura realizada entre 1926-2006, sobre a *A. hispidum* DC nas áreas de etnobotânica, fitoquímica e farmacologia, revelou que esta espécie é facilmente identificável e cresce em abundância durante a estação chuvosa no nordeste do Brasil. Observou-se ainda que esta planta pode ser cultivada sem perda de seu perfil fitoquímico e os estudos toxicológicos apontam para sua segurança como medicamento (ARAÚJO et al., 2008).

A espécie *A. hispidum* DC apresenta em todas as partes da planta, alcalóide, tanino catéquico, mucilagem e glicosídeo antraquinônico (DUKE apud DANTAS, 2007).

Um levantamento sobre plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará, revelou que as folhas da espécie *A. hispidum* DC. são utilizadas no tratamento de doenças

infecciosas (MORAIS et al., 2005). Tal uso foi sugerido por outro estudo que investigou e caracterizou uma possível atividade antiviral da espécie *A. hispidum* DC, especialmente contra alphaherpesvíruses pseudorabiesvírus (PRV) e herpesvírus bovino tipo 1 (SUMMERFIELD et al., 1997).

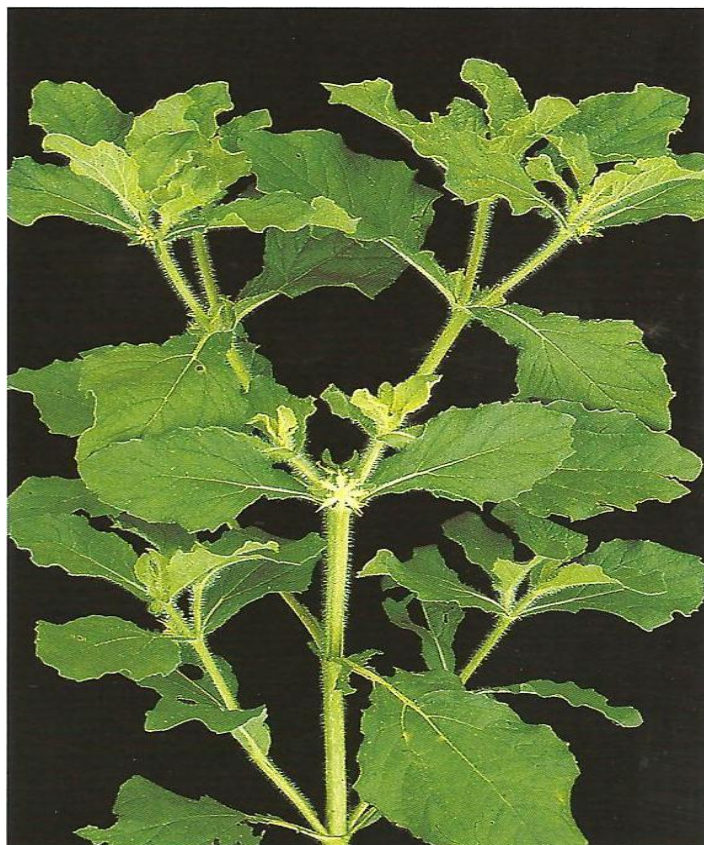


Figura 1 - *Acanthospermum hispidum* DC

Fonte: LORENZI, 2008

A atividade antitumoral do extrato de *A. hispidum* DC sobre linfoma em ratos também foi investigada e os resultados indicaram que o extrato possui a referida atividade (DEEPA; RAJENDRAN, 2007). Em outro estudo Deepa; Rajendran (2007) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidroalcoólicos a 50%, benzênico e clorofórmico de todas as partes do *A. hispidum* DC sobre vários microrganismos e verificaram que todos os extratos apresentaram potencial antibacteriano e antifúngico. A atividade antifúngica dos extratos estudados foi semelhante ao do clotrimazol. De forma semelhante, em estudo para avaliar *in vitro*, as atividades anticâncer, antimicrobiana e antioxidante de 52 extratos provenientes de 26 plantas observou-se que o extrato

metanólico da *A. hispidum* possui potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e *Micrococuss flavus* (MOTHANA et al., 2009).

3.2.3.2 *Ximenia Americana* (Ameixa)



Figura 2 – *Ximenia americana* L.

Fonte: SAMPAIO et al., 2005

A *X. americana* é uma planta comumente encontrada na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (SACANDE; VAUTIER, 2006). Segundo Matos (2007) é uma espécie tropical com ocorrência silvestre, inclusive nos tabuleiros litorâneos do nordeste do Brasil.

A *X. americana* pertence à família Olacaceae que possui distribuição pantropical, compreendendo 27 gêneros com aproximadamente 200 espécies sendo seus representantes plantas lenhosas, árvores ou arbustos. No Brasil encontram-se, aproximadamente, 13

gêneros e cerca de 60 espécies, sendo as de maior número de espécies, os gêneros *Heisteria*, *Ximenia*, *Liriosma* e *Schoepfia* (BRASILEIRO et al., 2008).

As sementes da *X americana* possuem óleo, glicosídeo cianogénico e benzaldeído (MATOS, 1987). A casca possui alcalóides, taninos pirogálico, fenóis, flavonóides, flavona, flavonóis, xantona, albumina, antocianina, antocianidina, chalcona, aurona, saponina, resina, amido e glicose (DANTAS, 2002).

Existem relatos do uso terapêutico de todas as partes da *X. americana* na medicina popular. As raízes da referida planta são utilizadas como anti-séptico, para doenças mentais, febre, icterícia e dor de cabeça. As folhas são usadas no tratamento de sarampo, dor de dente e também como laxante. As cascas são usadas no tratamento de úlceras e a infusão do fruto é empregada para **diarréia sanguinolenta**. A *X. americana* também possui ação contra reumatismo, câncer e infecções bucais (MEVY et al., 2006).

Através de entrevista com 418 curandeiros sobre as espécies vegetais utilizadas pelos moradores da costa oeste da Guiné (África) para tratar doenças infecciosas, 218 plantas foram registradas e a *X. americana* estava entre as plantas mais utilizadas (MAGASSOUBA, 2007).

Os constituintes químicos dos extratos aquosos e metanólicos das folhas, da casca do caule e da raiz da *X. americana*, foram analisados e verificou-se que os referidos extratos possuem carboidratos, na forma de açúcares, e amido solúvel, exceto para o extrato aquoso das folhas. Saponinas, glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas foram observados em todos os extratos, exceto nos extratos das folhas, onde não foram encontradas antraquinonas. Flavonóides e taninos foram observados em todas as partes da planta já mencionadas enquanto que os alcalóides estiveram sempre ausentes (JAMES et al., 2007).

Ao avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos da casca do caule, das folhas e das raízes de *X. americana*, verificou-se que os extratos mostraram atividade, mas o extrato metanólico foi o mais ativo. O *S. aureus* foi à bactéria mais susceptível, enquanto que *C. albicans* foi à espécie fungica de maior resistência aos extratos testados (OMER; ELNIMA, 2003). No entanto, ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana mostraram que o extrato das folhas é ativo contra *C. albicans* (MATOS, 2007).

A ação de 67 extratos etanólicos brutos de 50 espécies de plantas entre elas a *Ximenia americana* L., foi avaliada contra: *Escherichia. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E.*

faecalis, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis*. Dos extratos testados, 31 mostraram atividade antibacteriana apenas para bactérias Gram. positivas. A *X. americana* apresentou atividade antibacteriana com uma concentração inibitória de 94mg/ml apenas contra *E. faecalis* e *S. pyogenes* (KONÉ et al., 2004).

3.2.3.3 *Annona coriácea* (Araticum)



Figura 3 - *Annona coriácea* Mart.

Fonte: LORENZI, 2008

A família Annonaceae é composta por 112 gêneros com aproximadamente 2.150 espécies tropicais e subtropicais, espalhadas por todo o planeta. A espécie *Annona*

coriácea Mart., popularmente conhecida como araticum, é encontrada nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste do Brasil, especialmente no Ceará (SOUSA, 2003).

As folhas da espécie *A. coriácea* Mart. contêm tanino catéquico, fenóis, flavonóides, flavona, flavonóis, xantona, alcalóide, clorofila, saponina, resina e aldeído (DANTAS, 2002).

Na medicina popular as folhas da *A. coriácea* possuem propriedades carminativa, anti-reumática e anti-helmíntica por via oral. São utilizadas externamente, em compressas e bochechos, no tratamento de estomatite, nevralgias e cefaléias e, ainda, sob a forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir a supuração (LORENZI, 2002).

A propriedade analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico das folhas de *A. coriácea* foram avaliadas através dos testes de contorções abdominais, formalina, placa quente, edema de pata e pleurisia em camundongos Swiss machos e ratos Wistar machos. Os resultados sugeriram que o extrato metanólico de *A. coriácea* tem propriedade analgésica e antiinflamatória (SOUSA; DEL-VECHIO-VIEIRA; KAPLAN, 2007).

A migração de leucócitos e mediadores inflamatórios induzida por lectinas extraídas de sementes de *A. coriácea* foi investigada em camundongos. Através desse estudo verificou-se que a referida lectina induziu um acúmulo de neutrófilos dose-dependente, atingindo as máximas respostas às 16h, depois de injetada intraperitonealmente. Ademais, ocorreu um grande acúmulo de células mononucleares em 72 h (aumento de 2,7 vezes). Tais resultados mostram que as lectinas extraídas de sementes de *A. coriácea* foram capazes de atrair neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos (COELHO et al., 2006).

A atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais extraídos de plantas da região Amazônica dentre elas uma espécie de araticum, a *Annona glabra* L. (araticum-do-brejo) foi avaliada frente à cepa padrão de *C. albicans* e verificou-se que o óleo dessa planta não apresentou efeito antifúngico sobre a referida cepa (MENEZES et al., 2009).

3.2.3.4 *Hyptis mutabilis* (rich.) Briq. (Alfavaca)

O gênero *Hyptis*, ao qual pertence à alfavaca, é composto por ervas, sub-arbustos, arbustos ou raramente árvores pequenas. Os caules geralmente são quadrangulares, as folhas opostas, simples ou mais raramente partidas, pecioladas ou sésseis ou curtamente pedunculadas, contendo substâncias aromáticas. Esse gênero é composto por

aproximadamente 400 espécies distribuídas desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (BORDIGNON, 1990). Esse gênero pertence à família Lamiaceae, uma vasta família com cerca de 250 gêneros e 6970 espécies, de distribuição mais centrada na região mediterrânea, onde constitui parte integrante da vegetação (JUDD et al., 1999).



Figura 4 - *Hyptis mutabilis* (rich.) Briq.

Fonte: LORENZI (2008)

Na espécie *H. mutabilis* (rich.) Briq. foram encontrados a-cubebeno, a-coapeno, cariofileno, b-cubebeno, sabineno, podogilotoxina, beta-peltatina, lactonas, lactonas insaturadas e quinonas e triterpenóide pentacíclico (CRAVEIRO 1981; ESTRELLA, 2004 apud DANTAS, 2007).

Em revisão bibliográfica sobre as espécies do gênero *Hyptis*, verificou-se que 25 delas foram estudadas sob os aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos. Na etnofarmacologia verificou-se que a espécie *H. mutabilis* é empregada em distúrbios gastrointestinais e malária. No Brasil o chá de folhas frescas é usado no reparo de doenças

da mucosa uterina cervical, gastrite, úlcera gástrica, úlceras de pele infectadas e conjuntivite. A atividade farmacológica da *H. mutabilis* está no óleo essencial que possui atividade anti-ulcerogênica (FALCÃO; MENEZES, 2003).

3.2.3.5 *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Braúna)

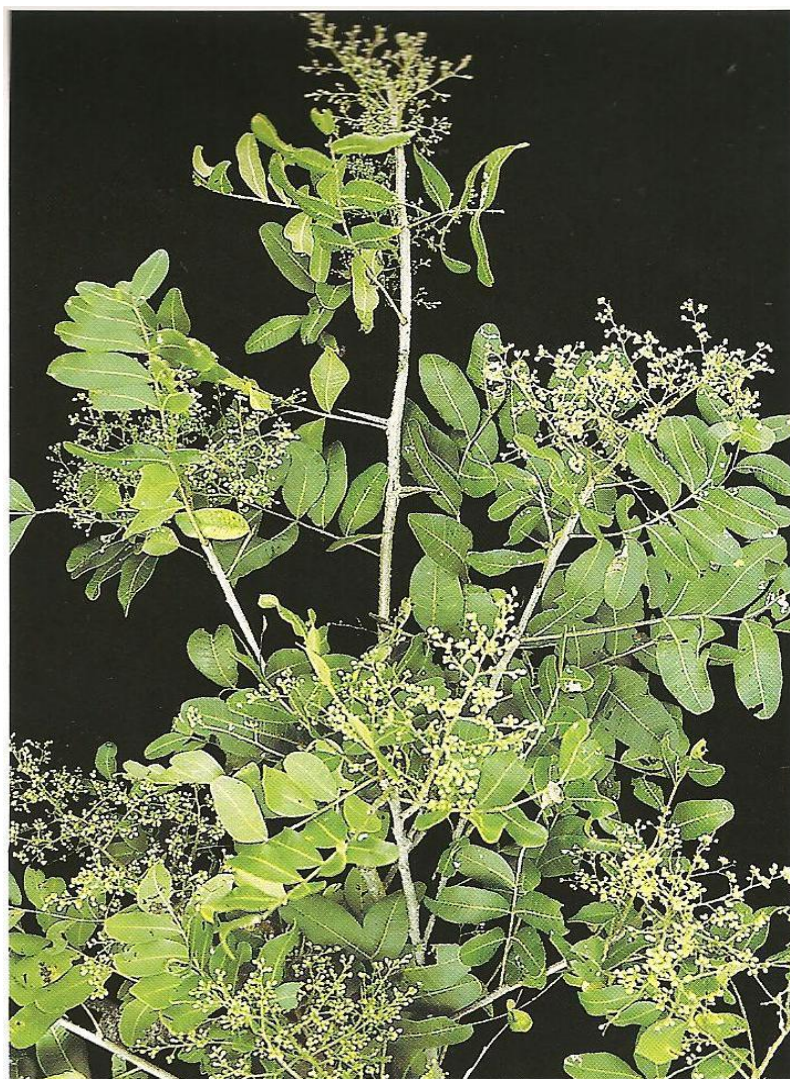


Figura 5 - *Schinopsis brasiliensis* Engl.

Fonte: LORENZI, H. 2002

A *S. brasiliensis* Engl. é uma planta da família das Anacardiáceas. Tem grande importância na flora do semi-árido do Nordeste brasileiro, tanto pela sua exuberância e beleza, quanto pelas suas inúmeras aplicações, pois possui propriedades anti-histéricas e nevrostêmicas (GONZAGA et al., 2003).

O uso de plantas nativas foi avaliado em três comunidades rurais do semi-árido do estado de Pernambuco, no nordeste do Brasil. A partir desse estudo, um total de 61 espécies arbóreas foram catalogadas e verificou-se que seus principais usos foram para a construção civil ou como combustível. As espécies que se destacaram pela importância local e multiplicidade de usos foram: *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. (aroeira do campo), *S. brasiliensis* Engl., e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico). (MONTEIRO et al., 2006).

A *S. brasiliensis* Engl. apresenta como principais compostos do metabolismo secundário: tanino pirogálico, resina, fenóis, flavonóides, leucocianidina, flavona, alcalóide, albumina e aldeído (DANTAS, 2002).

Em estudo sobre o conhecimento botânico tradicional em uma comunidade rural situada no agreste do estado de Pernambuco, foram identificadas mais de 108 espécies de plantas distribuídas em 10 categorias. Dentre essas espécies, a *S. brasiliensis* foi mencionada como de uso medicinal e comestível (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002).

Em outro estudo cujo objetivo foi analisar, a partir de uma perspectiva etnobotânica, a importância relativa das espécies arbóreas medicinais da caatinga pernambucana, foram selecionados trabalhos florísticos e fitossociológicos realizados em seis áreas também do Estado de Pernambuco. Das 57 espécies arbóreas, 22 possui indicação terapêutica, sendo *Anacardium occidentale* L. (cajueiro), *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC) Standley (ipê-roxo), *S. brasiliensis* Engl. e *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. (aroeira do campo), as espécies com os maiores valores de importância relativa. (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005).

O efeito antimicrobiano do extrato seco de todas as partes de algumas plantas, entre elas a *S. brasiliensis* Engl., foi testado sobre várias espécies de bactérias Gram negativas e Gram positivas. Foram realizados ensaios com 20 cepas de *S. aureus* e verificou-se que a *S. brasiliensis* Engl. apresentou a melhor atividade sobre todas as cepas de *S. aureus* sendo o extrato seco por extração metanólico, o mais ativo (SARAIVA, 2007).

3.3 Avaliação da Toxicidade Aguda de Plantas Medicinais

Os ensaios de toxicidade são realizados para determinar o potencial que novas substâncias e produtos possuem em causar danos à saúde humana. Através dos testes de toxicidade sistêmica aguda é possível classificar as substâncias de acordo com o seu

potencial de letalidade ou toxicidade, como estabelecido pela legislação vigente. Nesses testes, também são identificados o potencial tóxico em órgãos específicos, a toxicocinética e a relação-dose resposta. Podem ser verificado, entre outros, dados indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas, estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade e informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe (COECKE et al.; 2005; PRIETO et al., 2006).

A toxicidade aguda pode ser avaliada pelos seguintes testes: Teste da DL₅₀, Teste da Dose Fixa (TDF), Teste “*Up and Down*”, Toxicidade Aguda de Classe. Entretanto, mais recentemente os ensaios de citotoxicidade basal *in vitro* tem sido propostos, validados e empregados como uma alternativa para a redução do número de animais numa avaliação de toxicidade aguda sistêmica. A citotoxicidade basal é definida como “os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo” (EKWALL, 1995 apud VALADARES, 2006). A avaliação da citotoxicidade basal é de suma relevância, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como CI₅₀ (concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada a partir da curva de concentração-efeito (VALADARES, 2006).

No Brasil existe um guia para ensaios toxicológicos pré-clínicos específico para fitoterápicos, a RE no. 90/04, que estabelece os critérios mínimos aceitáveis para o estudo toxicológico agudo, sub-crônico e crônico, os testes para medicamentos de uso tópico e o estudo especial de genotoxicidade. Ele indica métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica: deve ser conduzido com amostras padronizadas do medicamento e seguir orientação sobre espécie animal, sexo, quantidade de animais, idade, via de administração, doses, sinais de toxicidade e período de observação (ANVISA, 2009).

A toxicidade aguda do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. foi avaliada em ratos. Os animais receberam por via oral, doses únicas do extrato e foram observados por 14 dias. Em alguns animais, foram observados sinais tóxicos como: ptose palpebral, perda de peso e paralisia do trem posterior. Os ratos machos que receberam uma dose de 5 g/kg apresentaram: aumento dos níveis sanguíneos de creatinina, sódio e potássio; diminuição dos níveis de uréia e albumina; leucopenia, além de discretas

alterações na coloração e consistência de vísceras. A dose letal mediana (DL₅₀) foi superior a 4,0 g/kg para machos e maiores do que 5,0 g/kg para fêmeas, indicando uma toxicidade aguda oral relativamente baixa (MARIZ et al., 2006).

Em um ensaio toxicológico pré-clínico para investigar a toxicidade do extrato liofilizado da *Cissus sicyoides* L. em camundongos foram avaliadas características anatomopatológicas, hematológicas e bioquímicas. Foram detectadas alterações nas transaminases (aspartate aminotransferase e alanina aminotransferase) e na fosfatase alcalina, caracterizando as alterações hepáticas demonstradas no estudo histopatológico. O fígado de camundongos, apresentou hepatite reacional com portite linfocitária crônica e lobular multifocal, hiperplasia kupferiana, colapsos focais da trama reticular, ausência de fibrose portal e lobular. Contudo, essas alterações foram verificadas em valores relativamente altos das doses administradas. Os valores de DL₅₀ foram superiores a 5,0 g/kg v.o. e 2,0 g/kg i.p.o. Assim, o extrato avaliado apresentou toxicidade aguda relativamente baixa (VSCONCELOS et al. 2007).

A *Piper aduncum* é uma planta utilizada na medicina popular da região amazônica em diversas doenças e no seu óleo essencial o constituinte majoritário é o fenilpropanóide dilapiol, com propriedades inseticida, fungicida, bactericida, larvicida e moluscicida. A toxicidade aguda e subaguda do óleo essencial dessa planta foi avaliada em camundongos e a análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos. A DL₅₀ foi de 2,400 ± 191,7 mg/kg. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos não apresentaram alteração em relação ao controle no tratamento subagudo, exceto a redução da creatinina. Esses resultados sugerem que o óleo essencial apresenta toxicidade baixa (SOUZA, 2008).

A toxicidade aguda do extrato de folhas de *Erythrina velutina* foi avaliada em ratos Wistar. Esses animais receberam por via oral, uma dose de 5 g/kg do extrato e foram observados por 14 dias consecutivos. Durante esse período, não foram observadas mortes ou sinal de toxicidade. Logo, o referido extrato apresentou baixa toxicidade aguda (CRAVEIRO et al. 2008).

Pucci et al. (2010) investigaram a toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das folhas da *R. viburnoides*. Foi empregado o teste de Classe, nas doses de 2000 e 5000 mg/kg, dose única, por gavagem, em camundongos *Swiss* e ratos *Wistar* (ambos os sexos). Nos resultados foi verificado que não houve letalidade ou sinais de intoxicação, indicando baixa toxicidade desse extrato.

Avaliando o perfil fitoquímico e a toxicidade preliminar sobre larvas de *Artemia salina*, do extrato etanólico de frutos de *Solanum lycocarpum*, Araújo; Cunha; Veneziani (2010) verificaram, nesse extrato, a presença de fenóis, taninos, saponinas, alcalóides e esteróides livres. Para a avaliação da toxicidade frente à *A. salina*, o extrato foi fracionado em diferentes solventes. A maior citotoxicidade foi observada na fração hidroalcoólica (CL50% = 285, 546 µg/mL).

Trevisan (2010) avaliou, entre outros, a toxicidade do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* e verificou que a toxicidade frente à *Artemia salina* apresentou uma LC₅₀ superior a 1000 µg/mL⁻¹. Com base nesse resultado, o extrato não apresentou toxicidade.

Em estudo da toxicidade do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., foram obtidos valores de CL₅₀ de 233,8 µg/mL para o óleo essencial e 186,1 µg/mL para o eugenol, utilizado como controle positivo, frente à *Artemia salina* L. Nesses resultados, as referidas substâncias não apresentaram resultados estatisticamente significativos entre si. Logo, esse óleo essencial foi tóxico para as larvas de *A. salina* (SILVA et al., 2010).

3.4 Avaliação da Atividade Mutagênica de Plantas Medicinais

Muitos extratos e princípios ativos provenientes dos vegetais têm sido utilizados como agentes terapêuticos. Com isso, há um interesse considerável em determinar os riscos que estes podem causar à saúde dos seres humanos. Nesse âmbito, a avaliação do potencial citotóxico e mutagênico das plantas medicinais é indiscutivelmente necessária, pois contribui para o uso relativamente seguro destas, pelo homem (SURH; FERGUSON, 2003; ELGORASHI et al., 2003; ARORA et al., 2005). No Brasil a avaliação da genotoxicidade de fitoterápicos é estabelecida pela RDC 90/04 (ANVISA, 2009).

De acordo Moreira et al. (2002), as principais hipóteses sobre os mecanismos de ação de substâncias que provocam câncer estão baseadas na indução de mutações em células somáticas. Ainda segundo eles praticamente, todos os agentes mutagênicos químicos e físicos, capazes de provocar câncer e induzir danos no DNA celular, resultam na geração de mutações de diferentes tipos. Nesse contexto é essencial avaliar a atividade mutagênica de uma substância através de testes confiáveis e um deles é o teste do micronúcleo.

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores faz parte do grupo de testes recomendados para a avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos. Assim como outros testes de mutagenicidade, é utilizado para detectar agentes químicos e físicos que tem a capacidade de induzir mutações (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2002). Através dele é possível verificar danos na estrutura celular ou genética em pouco tempo e após uma única exposição ao provável agente mutagênico (OECD, 2001; BRASIL, 2008).

Em artigo de revisão de literatura, Flores e Yamaguchi (2008) verificaram que o teste do micronúcleo tem sido amplamente aplicado em testes de genotoxicidade de produtos químicos porque os micronúcleos são facilmente observados nos eritrócitos e são um forte indicativo de aberrações cromossômicas. Além disso, é um teste fácil, rápido, confiável e que requer menos treinamento e perícia.

Em um estudo que avaliou a atividade mutagênica do óleo de *Copaifera langsdorffii* Desfon (copaíba), através do teste do micronúcleo em camundongos, os resultados revelaram a presença de atividade mutagênica, bem como citotoxicidade, observada em todas as doses administradas (CHEN-CHEN; SENA, 2002).

Avaliando a atividade clastogênica e/ou aneugênica do extrato das folhas de *Ginkgo biloba* L. pelo teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (EPCMN) da medula óssea de camundongos, Leite et al. (2003) verificaram que o referido extrato não provocou aumento significativo na frequência de EPCMN e nem citotoxicidade em relação ao grupo do controle negativo.

Magalhães et al. (2010) avaliaram o efeito genotóxico de extratos de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) em camundongos utilizando os testes de micronúcleo e o de aberração cromossômica. Nesse estudo, o grupo controle negativo (CN) recebeu água e o grupo controle positivo (CP) recebeu Ciclofosfamida[®] (CF) por *v.i.* Nos resultados, as frequências de EPCMN foram significativamente inferiores quando comparadas com as dos controles. A frequência de cromossomos aberrantes não teve diferença significativa quando comparada com o CN, mas foi estatisticamente menor que a do CP. Assim, a *P.venusta* não apresentou atividade genotóxica.

Valadares et al. (2010) avaliaram o extrato etanólico das folhas da *P. granatum* (PGFO) e do extrato etanólico dos frutos da *P. granatum* (PGFR) quanto ao seu potencial de induzir mutagenicidade ou de proteger contra efeitos genotóxicos induzidos pela CF. O estudo foi realizado com camundongos que foram tratados por via oral, com PGFO ou

PGFR (12,5, 25, 50 e 75 mg/kg/dia), por 10 dias. Para a avaliação da antimutagenicidade, os animais receberam CF (i.p. 200 mg/kg) 24 horas antes do término do tratamento. Os resultados mostraram que os animais tratados com ambos os extratos demonstraram a frequência de EPCMN similar ao grupo controle. Também foi verificado que independentemente da dose ou do extrato usado, a administração oral por 10 dias, previamente à exposição, reduziu, de forma dose-dependente, a frequência de EPCMN induzidos pela CF, em todos os grupos testados. Logo, os extratos da *P. granatum* demonstraram ausência de efeitos mutagênicos e efeitos protetores contra os danos oxidativos ao DNA induzidos pela CF.

O potencial mutagênico e antimutagênico do extrato obtido das flores da *Tabebuia impetiginosa* (ipê-roxo) foi avaliado pelo teste do micronúcleo. Para esse teste, o extrato foi utilizado em três diferentes concentrações (100, 300 e 500 mg kg⁻¹ p.c.). A doxorubicina (DXR, 90 mg kg⁻¹ p.c.) foi utilizada como indutor de danos ao DNA. Para o teste de antimutagenicidade, os tratamentos com o extrato foram realizados simultaneamente com DXR. Nos resultados, não foram observadas diferenças significativas quanto às frequências de micronúcleos em EPCMNs, entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de extrato e o controle negativo. Todos os grupos que receberam os tratamentos simultâneos do extrato com a DXR apresentaram valores de EPCMN muito próximos, quando comparados com os dados observados no grupo de animais que recebeu somente a DXR. Logo, o referido extrato não apresentou efeito mutagênico e antimutagênico (LOURENÇO et al., 2010)

Em outro estudo os efeitos mutagênicos, antimutagênico e citotóxico do látex da *Synadenium umbellatum* Pax. foram investigados através da mensuração da frequência de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos. Os resultados mostraram que o látex dessa planta apresentou forte atividade mutagênica e citotóxica, exceto na dose de 10 mg/kg e moderado efeito antimutagênico nas doses mais baixas (MELO-REIS et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram analisadas 05 (cinco) plantas medicinais com atividade antimicrobiana, selecionadas com base em estudo etnofarmacológico desenvolvido por Souza (2009). São elas: ameixa (*Ximenia americana* L.), alfavaca-de-caboclo (*Hyptis mutabilis* Briq.), araticum (*Annona coriacea* L.), braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) e carrapicho de cigano (*Acanthospermum hispidum* DC.).

As amostras vegetais selecionadas foram coletadas na região do compartimento da Borborema-PB, a partir de plantas adultas selecionadas, respeitando-se a época e o horário ideal de coleta. Além disso, foram realizadas as exsiccatas para identificação etnobotânica e as análises de verificação da autenticidade das plantas medicinais estudadas.

As exsiccatas foram depositadas no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, no município de Areia-PB, com os seguintes números de registro: EAN-10957 (*A. hispidum* DC.), EAN-10699 (*H. mutabilis* Briq.), EAN-14049 (*S. brasiliensis* Engl.) e EAN-100493 (*X. americana* L.). A exsicata referente à *A. coriacea* L., sob número de registro IPA21443 encontra-se disponível no herbário Dárdamo de Andrade Lima, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco, situado no município de Recife-PE.

4.2 Obtenção dos Extratos

4.2.1 Extratos Hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos das plantas selecionadas foram obtidos pelo método de maceração (a frio), nas concentrações de 10:90, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30 (água:etanol). Assim, de cada planta estudada foram obtidos cinco extratos em gradientes de concentrações diferentes.

Para a produção dos extratos foram utilizadas as cascas da *X. americana*, as folhas da *H. mutabilis*, as folhas do *A. coriacea*, as cascas da *S. brasiliensis* e raiz, caule, folha e fruto do *A. hispidum*.

No processo de secagem, as plantas foram acondicionadas em sacos de papel tipo Kraft e submetidas à secagem, em estufa com renovação e circulação de ar, à temperatura de 40 °C, até estabilização da umidade.

4.2.2 Extratos Nebulizados

Os extratos que produziram os maiores halos de inibição contra o crescimento dos patógenos testados foram submetidos à secagem por nebulização em um aparelho *Spray Dryer*, da marca LabPlant.

Os extratos secos foram obtidos por nebulização com o estabilizante farmacotécnico Aerosil 200[®], o qual foi calculado em relação à massa teórica final do nebulizado. No aparelho, os sistemas de alimentação e atomização são constituídos por uma bomba peristáltica, um atomizador com agulha injetora (0,5 mm d.i.) sob pressão. Os extratos nebulizados foram separados por sedimentação na base de um ciclone e a circulação do fluido aquecido nas temperaturas de entrada a 140 °C assegurada por um sistema de aspiração, co-corrente. Com temperatura de saída variando de 90 – 95 °C, sob um fluxo de alimentação de 3,0 mL.min⁻¹ (FARMACOPÉIA, 1988).

4.3 Screening Microbiológico

4.3.1. Cepas Microbianas

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos, a partir das espécies vegetais coletadas, foram utilizadas cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC18804), *Candida tropicalis* (ATCC13803), *Candida krusei* (ATCC 34135), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). As cepas liofilizadas foram reativadas, em câmara asséptica, seguindo as recomendações da referida Fundação.

4.3.2. Meios de Cultura

Foram empregados meios de cultura desidratados, disponíveis no comércio, os quais foram reconstituídos com água destilada, conforme as especificações do fabricante.

Para realização dos testes de sensibilidade dos microrganismos aos extratos vegetais produzidos foram utilizados os meios ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA[®]), Ágar Sangue e caldo BHI (HIMEDIA[®]) para as bactérias. Para os fungos utilizou-se Agar Sabouraud Dextrose (OXOID[®]).

4.3.3 Controles utilizados

No estudo *in vitro* foi utilizado o digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard[®]) como controle positivo para os testes de susceptibilidade com bactérias e a nistatina para os testes de susceptibilidade com fungos. Como controle negativo foi utilizada a solução hidroalcoólica nas mesmas concentrações do extrato testado.

4.3.4 Preparação da Suspensão Microbiana

O microorganismo reativado foi mantido em tubos, contendo 10 mL de caldo BHI e incubado entre 32 – 37 °C, por 24 horas.

A suspensão de cada microrganismo foi elaborada a partir do crescimento deste em BHI, onde alíquotas do caldo foram transferidas com uma alça de platina para uma placa de Petri contendo o respectivo meio de cultura e incubadas entre 32 – 37 °C, por 24 horas. Após crescerem na placa, parte das colônias foi utilizada para fazer o inóculo.

O inóculo microbiano foi padronizado antes do uso, conforme descrito na Farmacopéia Brasileira IV edição (1988). Assim, foi diluída a suspensão preparada com solução salina estéril, de modo a obter a transmitância de 85%, no comprimento de onda de 625 nm, em espectrofotômetro, marca Biospectro, modelo SP22, a fim de obter-se uma preparação microbiana com uma concentração final entre 10⁶ UFC/mL. Foi determinado experimentalmente que a quantidade de suspensão a ser adicionada a cada 100 mL do meio de cultura utilizado, seria de 1mL.

4.3.5. Ensaio Microbiológico por Difusão em Agar

Para esse ensaio foi utilizada a técnica dos cilindros ou *template*, recomendada pela Farmacopéia Brasileira (1988), para avaliação da atividade antimicrobiana de antibióticos. Nessa técnica é necessária a preparação de uma camada base e uma camada de superfície de meio de cultura sobre a qual são colocados os cilindros.

A camada base foi preparada através da adição de 20 mL de meio de cultura específico para a bactéria em teste, colocado nas placas de Petri. Esse meio foi distribuído uniformemente nas placas, que foram colocadas em superfície niveladas para assegurar que a camada base tivesse uma profundidade uniforme. Após o endurecimento do ágar, as placas foram tampadas.

Para preparar a camada de superfície foi adicionado 1ml do inóculo em 100 mL do meio de cultura indicado estando este a uma temperatura entre 48 a 50 °C. Feito isso, um erlenmeyer contendo a mistura foi agitado por rotação, para obter uma suspensão homogênea, em seguida foram adicionados 5 mL do meio inoculado, em cada placa de Petri, contendo a camada base não inoculada. A camada de superfície foi espalhada uniformemente e as placas foram tampadas permanecendo em descanso para permitir seu endurecimento sobre uma superfície plana. Após o endurecimento do meio, foram colocados seis cilindros de aço inoxidável, com diâmetro externo de $8 \pm 0,1$ mm, diâmetro interno de $6 \pm 0,1$ mm e comprimento de $10 \pm 0,1$ mm, sobre a superfície do ágar inoculado, por placa de 100 x 20 mm de diâmetro.

O ensaio foi realizado em câmara de fluxo laminar, com interpolação em curva de 5 x 1, no qual em cinco cilindros foram adicionados 100 µL de cada extrato produzido, na mesma concentração, e no último a solução de digluconato de clorexidina a 0,12% ou nistatina como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada uma placa de Petri com 5 cilindros nos quais foram colocados os solventes utilizados para a produção dos extratos. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36 °C, durante um período de 24 a 48 horas nas análises com bactérias, e a 30 °C durante 24 horas nas análises com fungos.

Após o período de incubação, a leitura dos testes foi realizada medindo o diâmetro dos halos de inibição ao redor do cilindro com o auxílio de um paquímetro digital. Foi considerada como possuidora de atividade antimicrobiana, aquela concentração do extrato

que quando aplicada sobre o meio de cultura, contendo a suspensão do microrganismo, apresentou um halo de inibição do crescimento microbiano, caracterizado por uma zona de clareamento, igual ou superior a 10 mm de diâmetro (CARMO, 2008).

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi realizada a CIM dos extratos nebulizados de *S. brasiliensis* Engl. e *X. Americana* L., por apresentarem melhor atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados.

De cada extrato nebulizado que apresentou atividade antimicrobiana foram realizadas diluições sucessivas em dimetilsulfóxido (DMSO), partindo da concentração de 1,0 mg/mL nas seguintes concentrações: 0,1; 0,085; 0,065; 0,050; 0,030; 0,020; 0,025; 0,010; 0,005 e 0,001 (mg/ml). Na determinação da menor concentração capaz de promover inibição visual do crescimento do microrganismo ou CIM foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, técnica de difusão em ágar.

4.5 Determinação da Quantidade Mínima Eficaz (QME)

Para os extratos hidroalcoólicos que não apresentaram atividade antimicrobiana após nebulizados, não foi possível determinar a CIM. Então foi determinada a QME, avaliada nas quantidades de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 µl. O ensaio foi realizado em quintuplicata com o mesmo procedimento descrito acima, técnica de difusão em ágar.

4.6 Teste de Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda foi realizado com os extratos nebulizados de *S. Brasiliensis* Engl. e *X. Americana* L, em quintuplicata com *Artemia salina* e com ratos.

4.6.1 Ensaio de Toxicidade Aguda com *Artemia salina*

Para o ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* foi utilizada a metodologia descrita por Fontenele (1988), com algumas modificações. Foram utilizados 50g de

material comercial (Miramar[®]), contendo cistos de *Artemia salina* que foram colocados numa solução de água do mar sintética contendo: NaCl 26,3 g/l; MgSO₄.7H₂O 6,20 g/l; MgCl₂.6H₂O 5,10 g/l; CaCl₂.2H₂O 1,47 g/l; KCl 0,75 g/l e NaHCO₃ 0,21 g/l. Os cistos foram mantidos em pH 8,0, em temperatura ambiente e iluminação lateral constante, durante o período de eclosão (48 e 72 h). As larvas de *A. salina* recém eclodidas foram distribuídas em tubos de ensaio (10 larvas por tubo). Em cada tubo foi colocado 10 mL de solução dos extratos nebulizados nas concentrações 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL, dissolvidos inicialmente em etanol a 90% (1ml) e posteriormente em 10ml de água do mar sintética. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

Foi preparado ainda um grupo controle, o qual foi preparado nas mesmas condições, mas sem a presença dos extratos. As culturas de *A. salina* foram incubadas a 28°C, e a leitura do número de sobreviventes e mortos foi realizada após 24 horas, sendo calculado ainda o percentual de mortalidade para cada uma das concentrações testadas e para o grupo controle. Foram consideradas larvas mortas todas que não apresentaram qualquer movimento ativo em cerca de vinte segundos de observação.

4.6.2 Ensaio de Toxicidade Aguda com Ratos

O ensaio de toxicidade foi realizado com Wistar albinos (*Rattus norvegicus*) adultos (80 dias de vida), com peso entre 131 e 258 g. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério da faculdade de Medicina da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Os animais foram mantidos em ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, com temperatura de 22 ± 3 °C e umidade relativa do ar de 50% ± 20%, em grupos de cinco por gaiola. Os animais foram alimentados com ração e água potável *ad libitum* e observados por três dias.

Para a realização do ensaio os animais foram submetidos a jejum de 12 horas. Após esse período foi administrado por via oral (gavage) a concentração de 2000 mg dos extratos selecionados para cada 1kg de peso corpóreo do animal. Após a administração dos extratos os animais foram colocados em caixas individuais de polipropileno, com tampas sobre as quais foram colocados água e alimento *ad libitum*.

No período de 30 min., 1, 2 e 4 horas após a administração dos extratos, os animais foram mantidos em vigilância constante, com a finalidade de se observar o surgimento de sinais tóxicos como: atividade geral, frênto vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto da cauda, contorção, posição trem posterior, reflexo endireitamento, tônus

do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, morte; realizadas a intervalos variados logo após a administração da droga com base na metodologia preconizada por Almeida et al. (1999). Segundo a metodologia aplicada, às 24, 48 e 72 horas da administração do extrato deveriam ser contabilizadas as mortes, mensurados o consumo de água e ração e o peso dos animais. O referido consumo foi avaliado diariamente e contabilizado por grupo, registrando-se os valores médios de cada grupo.

Um grupo controle foi tratado com solução salina, a mesma solução utilizada para diluir o extrato.

Após o período de observação, os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical, procedendo-se a ressecção e pesagem das vísceras (fígado, rins, coração, baço e pulmões) que também foram analisadas macroscopicamente.

4.7 Ensaio de Mutagenicidade dos Extratos

Este ensaio foi realizado com os extratos de *S. Brasiliensis* Engl. e *X. Americana* L., com a finalidade de determinar o potencial mutagênico dessas plantas.

4.7.1 Teste do Micronúcleo

No teste do micronúcleo, os micronúcleos aparecem nas células filhas de eritrócitos policromáticos anucleados, em decorrência de danos induzidos nas células parenterais. Após sofrerem quebra ou segregação anormal por um agente genotóxico os fragmentos cromossômicos podem não ser incorporados ao núcleo principal das células filhas após a mitose. Então uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento e este será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula.

Para realizar o teste do micronúcleo utilizamos a metodologia descrita por Ribeiro; Salvadori; Marques, (2002), com algumas modificações. Assim, foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino), com aproximadamente 30g de peso corpóreo. Durante o período de tratamento os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, com tampa-grade sobre as quais foram colocados água e

alimento *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, com temperatura de 22 ± 3 °C e umidade relativa do ar de $50\% \pm 20\%$.

4.7.2 Tratamento dos Animais e Coleta do Sangue Periférico

Grupos de 6 camundongos, 3 fêmeas e 3 machos, foram submetidos à ingestão do extrato por via oral (gavage). Para cada extrato foram utilizados 3 grupos de 6 camundongos. Um grupo recebeu o extrato numa concentração de 2000 mg/kg/dia e os outros receberam 50% e 25% dessa concentração, cada um. Para a diluição dos extratos foi utilizada água destilada. O grupo do controle positivo recebeu 50 mg de ciclofosfamida para cada kg de peso do corpo corpóreo e o controle negativo recebeu água destilada.

O esquema de tratamento utilizado foi o de dose única. Assim, administraram-se aos camundongos as substâncias teste nas concentrações mencionadas. Após 48 horas da administração, o sangue desses animais foi coletado.

Para coletar o sangue foi feito um corte da extremidade da cauda dos animais e posteriormente foi colocada uma gota do sangue em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e seca e, com auxílio de uma lamínula encostada em ângulo de 45°, o sangue foi espalhado uniformemente, formando uma camada delgada. Para cada animal foram confeccionadas duas lâminas, que foram secas em temperatura ambiente. Após 24 horas essas lâminas foram fixadas em metanol absoluto, por 10 minutos. Depois, foram coradas com Giemsa 10% diluído em tampão fosfato pH 6,8, por 25 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada e novamente secas em temperatura ambiente para que, posteriormente, fossem preparadas com Entellan para uso permanente. A análise citológica foi realizada em microscopia óptica com aumento de 1000x. Para cada animal foram analisados 2000 eritrócitos, anotando-se as frequências de micronúcleos para posterior análise estatística.

4.8 Análise Estatística dos Dados

Para a análise estatística dos dados do estudo *in vitro* foi adotado o teste-t Student para comparação entre duas médias. O limite de confiança considerado foi de 95%. Sendo os dados analisados no *Microsoft Office Excel*® 2007.

No teste de letalidade com *A. salina*, para o cálculo da concentração letal média (CL₅₀) dos extratos, foi utilizado o método PROBIT. O programa estatístico utilizado foi o *StatPlus® Portable* e o nível de significância foi de 0,05.

Para o ensaio de toxicidade aguda com ratos os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (d.p.) e foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Dunnett (para comparação dos grupos tratados com o grupo controle negativo) ou teste de Tukey-Kramer (para comparação entre os grupos tratados). O limite de confiança considerado foi 95% (p < 0,05). O programa estatístico utilizado foi o *GraphPad-Prism 5®*, versão 2007.

Na análise da atividade mutagênica em camundongos, a frequência de micronúcleos induzidos com diferentes doses dos extratos testados foi comparada com a do grupo controle negativo (água destilada) e a do grupo controle positivo (ciclofosfamida), pelo teste t-Student, tendo sido considerados significativos valores de p < 0,05. Sendo os dados analisados no *Microsoft Office Excel®* 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade Antimicrobiana dos Extratos Testados

5.1.1 Screening Microbiológico

Estudos envolvendo ação antimicrobiana da plantas avaliadas neste estudo, ainda são escassos.

Dos microrganismos testados neste estudo, apenas a *S. oralis* teve o seu crescimento inibido pelos extratos produzidos a partir da raiz e de todas as partes da *A. hispidum* (Tabelas 01 e 02). O extrato 03 produzido a partir de todas as partes da referida planta, apresentou a maior média de halo de inibição. Essa média foi equivalente a 11,91 mm (Tabela 01). Já na tabela 02, a maior média de halo de inibição foi observada para o extrato 02, produzido a partir das raízes do *A. hispidum* que apresentou uma média de halo de inibição equivalente a 11,40 mm.

Ao compararem-se os dados obtidos com a clorexidina e com os dois extratos produzidos a partir da *A. hispidum*, sendo um com a raiz e o outro com todas as partes de *A. hispidum*, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

Tabela 01 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico obtido a partir de todas as partes do *A. hispidum* para as cepas analisadas.

Extrato hidroalcoólico	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. casei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kruzei</i>
Extrato 01 (10:90)	0,00	0,00	0,00	0,00	11,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 02 (20:80)	0,00	0,00	0,00	0,00	11,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 03 (30:70)	0,00	0,00	0,00	0,00	11,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 04 (50:50)	0,00	0,00	0,00	0,00	11,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 05 (70:30)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clorexidina	19,65	13,45	16,00	12,95	12,63	12,51	12,25	-	-	-
Nistatina	-	-	-	-	-	-	-	23,23	22,00	23,00

P: Pseudomonas, E: Entorococcus, S: Streptococcus, L: Lactobacillus, C: Candida, 10:90, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30 = Proporção de água:etanol

Tabela 02 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico obtido a partir da raiz do *A. hispidum* para as cepas microbianas analisadas.

Extrato hidroalcoólico	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. Salivarius</i>	<i>L. casei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kruszei</i>
Extrato 01 (10:90)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 02 (20:80)	0,00	0,00	0,00	0,00	11,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 03 (30:70)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 04 (50:50)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 05 (70:30)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clorexidina	19,65	13,45	16,00	12,95	12,63	12,51	12,25	-	-	-
Nistatina	-	-	-	-	-	-	-	23,23	22,00	23,00

P: Pseudomonas, E: Entorococcus, S: Streptococcus, L: Lactobacillus casei, C: Candida, 10:90, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30 = Proporção de água:etanol

Pesquisas relacionadas com a atividade antimicrobiana do *A. hispidum*, sobre bactérias específicas da cavidade oral, não foram encontrados na literatura pesquisada. Entretanto, alguns estudos verificaram a presença de atividade antimicrobiana proveniente da referida planta contra várias bactérias patogênicas (FLEISCHER; AMEADE; SAWER., 2003).

A atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólico a 50%, benzênico e clorofórmico de todas as partes da *A. hispidum*, também foram avaliadas por Deepa; Rajendran (2007), para vários microorganismos. No referido estudo, todos os extratos apresentaram potencial antibacteriano e antifúngico. Porém, neste estudo não se observou atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos produzidos com todas as partes ou com a raiz da *A. hispidum*.

Em avaliação do efeito de seis lactonas sequiterpênicas isoladas de *A. hispidum*, sobre a produção do biofilme composto por *P. aeruginosa*, verificou-se que todas essas lactonas inibiram a formação desse biofilme quando incorporadas à cultura bacteriana (CARTAGENA et al., 2007). Entretanto, neste estudo, o extrato hidroalcoólico da referida planta não produziu inibição do crescimento das cepas de *P. aeruginosa* testadas.

Em estudo que avaliou a ação do extrato metanólico e do decocto das folhas da *A. hispidum* sobre várias linhagens bacterianas e uma espécie de fungo, a *Candida maltosa*, observou-se que o extrato metanólico da referida planta foi mais eficaz e produziu halos

de inibição frente à *S. aureus*, *Micrococcus flavus*, e a cepas multirresistentes de *Staphylococcus epidermidis* 847, *Staphylococcus haemolyticus* 535, *Staphylococcus aureus* North German Epidemic Strain (MOTHANA et al., 2009). Esse resultado, assim como a presença de atividade antimicrobiana contra *S. oralis* observada neste estudo, mostra que a *A. hispidum* apresentou algum potencial antibacteriano.

Em estudo etnobotânico realizado numa comunidade rural, os entrevistados relataram que o chá das folhas da *H. mutabilis* é usado como anti-séptico (GUERRA et al., 2010). Contudo, neste estudo não foi observada qualquer propriedade anti-séptica proveniente dessa planta. O mesmo ocorreu com os extratos da *A. coriácea* que não apresentaram halos de inibição do crescimento contra as cepas microbianas testadas.

A tabela 03 mostra as análises realizadas com os extratos hidroalcoólicos de *X. americana*, os quais foram testados contra os patógenos listados. Neste estudo foi observada atividade antibacteriana desses extratos, contra as cepas de *E. faecalis* no extrato 03 o que está de acordo com outros estudos que mostraram que o extrato da *X. americana*, apresentou atividade contra *E. faecalis* (KONÉ et al., 2004; COSTA et al., 2011). Entretanto, houve diferença estatística significativa entre o extrato 03 da *X. americana* e a clorexidina, que foi mais eficaz.

Nos resultados da análise com a bactéria *S. aureus*, houve diferença estatística significativa entre os extratos 01, 02, 04 e 05 da *X. americana* e a clorexidina, que obteve os melhores resultados (Tabela03). Já, entre o extrato 03 dessa planta e a clorexidina, não foi observada diferença estatística significativa, indicando que a atividade antimicrobiana de ambos foi equivalente.

Ao avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos das cascas do caule, das folhas e das raízes de *X. americana*, verificou-se que o extrato metanólico das cascas dessa planta foi o mais ativo e que as cepas de *S. aureus* foram as mais susceptíveis. Enquanto que, *C. albicans* foi o fungo de maior resistência aos extratos testados (OMER; ELNIMA, 2003). Neste estudo, o extrato produzido com as cascas da *X. americana* L. também inibiu o crescimento de *S. aureus* e não apresentou qualquer eficácia contra as cepas fúngicas testadas. No entanto, ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana, mostraram que o extrato das folhas desta planta é ativo contra *C. albicans* (OGUNLEYE, IBITOYE, 2003; MATOS, 2007).

Tabela 03 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico obtido a partir da cascas da *X. americana* contra as cepas analisadas.

Extrato hidroalcoólico	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. casei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kruzei</i>
Extrato 01 (10:90)	0,00	0,00	13,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 02 (20:80)	0,00	0,00	13,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 03 (30:70)	0,00	14,13	14,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 04 (50:50)	0,00	0,00	13,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 05 (70:30)	0,00	0,00	12,60	0,00	11,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clorexidina	19,65	13,45	16,00	12,95	12,63	12,51	12,25	-	-	-
Nistatina	-	-	-	-	-	-	-	23,23	22,00	23,00

P: Pseudomonas, E: Entorococcus, S: Streptococcus, L: Lactobacillus casei, C: Candida, 10:90, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30 = Proporção de água:etanol

O extrato 05 da *X. americana* também inibiu o crescimento da *S. oralis*. A média dos halos de inibição foi de 11,21 mm, sendo que não houve diferença estatística significativa entre esse extrato e a clorexidina. Logo, a atividade antimicrobiana de ambos foi similar (Tabela 03).

Como é possível observar na tabela 4, os extratos hidroalcoólicos da *S. brasiliensis*, em todas as concentrações, gerou halos de inibição contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. oralis* e os maiores halos foram observados nos extratos 03 (33, 20 mm), 05 (18,14 mm) e 02 (14,84 mm), respectivamente.

Com relação à *P. aeruginosa* foi observado que houve diferença estatística entre os extratos 01, 02, 03, e 04 da *S. brasiliensis* e a clorexidina, que apresentou os maiores halos de inibição. Entre o extrato 05 da referida planta e a clorexidina não foi observada diferença estatística, indicando que o efeito de ambos foi equivalente.

Para *E. faecalis* foram observados halos de inibição apenas nos extratos 03 e 04 e para ambos houve diferença estatística significativa, quando comparados com a clorexidina, sendo essa mais eficaz.

O efeito antimicrobiano de todas as partes de plantas medicinais, entre elas a *S. brasiliensis* foi testado sobre cepas de *S. aureus* e verificou-se que essa planta apresentou melhor atividade sobre todas as cepas dessa bactéria sendo o extrato seco por extração

metanólica mais ativo (SARAIVA, 2007). Neste estudo a *S. brasiliensis* também apresentou atividade antimicrobiana frente a essa bactéria.

Comparando a ação dos extratos 01, 02, 03 e 04 da *S. brasiliensis* com a clorexidina, em *S. aureus*, foi observado que houve diferença estatística significativa entre eles, sendo que todos os extratos foram mais eficazes do que a clorexidina. Para o extrato 05 também houve diferença estatística significativa, mas o seu efeito foi inferior ao efeito da clorexidina.

Tabela 04 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico da *S. brasiliensis* para cepas analisadas.

Extrato hidroalcoólico	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. casei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kruszei</i>
Extrato 01 (10:90)	17,30	0,00	25,1	0,00	14,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 02 (20:80)	16,62	0,00	27,9	0,00	14,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 03 (30:70)	16,85	10,80	33,2	0,00	14,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 04 (50:50)	16,98	10,27	30,4	0,00	10,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Extrato 05 (70:30)	18,14	0,00	12,4	0,00	11,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clorexidina	19,65	13,45	16,00	12,95	12,63	12,51	12,25	-	-	-
Nistatina	-	-	-	-	-	-	-	23,23	22,00	23,00

P: Pseudomonas, E: Entorococcus, S: Streptococcus, L: Lactobacillus casei, C: Candida, 10:90, 20:80, 30:70, 50:50, 70:30 = Proporção de água:etanol

Conforme a tabela 04, os extratos 01, 02 e 03 da *S. brasiliensis* apresentaram uma média de halo de inibição superior àquela obtida pela clorexidina, em *S. oralis*. Entretanto, quando comparados, estatisticamente, com a clorexidina, houve diferença significativa apenas para os extratos 01 e 02 que apresentaram maior eficácia. Para o extrato 03 não houve diferença estatística significativa, indicando que a sua eficácia é semelhante à eficácia da clorexidina. Para o extrato 04 foi observada diferença estatística significativa, sendo a clorexidina mais eficaz.

Com relação ao controle positivo utilizado para as cepas bacterianas, foi escolhido o digluconato de clorexidina a 0,12%. Essa substância é utilizada na prevenção e redução do biofilme dental, em indivíduos com alguma deficiência motora ou mental e em portadores de aparelhos ortodônticos. Seu uso também é viável quando se requer a redução

de infecções cruzadas, de bactérias viáveis em aerossóis gerados em procedimentos profiláticos, na diminuição de bacteremias pós-cirúrgicas antes de procedimentos cirúrgicos ou periodontais, na desinfecção de escovas de dente e de superfícies (HORTENSE et al., 2010). Neste estudo o digluconato de clorexidina a 0,12% teve um desempenho superior sobre a maioria das cepas bacterianas estudadas. Da mesma forma, outros estudos envolvendo a ação desse antimicrobiano sobre a microbiota bucal também obtiveram resultados positivos (MOREIRA et al., 2008; SEMENOFF; SEMENOFF-SEGUNDO; BIAZOLI, 2008; MOREIRA et al., 2009; MAEKAWA et al., 2010).

Todos os extratos foram testados nas cepas de *Candida* listadas, não sendo observada nenhuma atividade antifúngica. Como observado nas tabelas apresentadas, a nistatina utilizada como controle positivo apresentou atividade antifúngica para todas as *Cândidas* testadas. Esse controle foi escolhido como parâmetro para as cepas fúngicas porque é um fármaco com eficiência comprovada e amplamente utilizado na clínica médica.

5.1.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram selecionados apenas os extratos 02 e 03 de *S. brasiliensis* e 03 da *X. americana* para serem submetidos ao processo de nebulização em *spray dryer* por apresentarem os maiores halos de inibição do crescimento dos microrganismos testados. Após esse processo foi realizada a determinação da CIM desses extratos.

Neste estudo, o extrato nebulizado das cascas da *X. americana*, não apresentou CIM para nenhuma das cepas testadas. É possível que compostos voláteis presentes na *X. americana*, como o benzaldeído, constituinte presente em maior quantidade na planta *X. americana* (MEVY et al., 2006), tenham evaporado durante a secagem por nebulização. Já que a técnica funciona a altas temperaturas.

Observou-se que apenas os extratos nebulizados de *S. brasiliensis* apresentaram CIM frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, conforme descrito na tabela 05. Por conseguinte, é possível sugerir que após o processo de nebulização, os compostos químicos ativos da *X. americana* e da *S. brasiliensis* que nos extratos hidroalcoólicos apresentaram ação antimicrobiana contra os patógenos da cavidade bucal testados foram evaporados durante o processo de nebulização. E que não apresentaram ação nas bactérias da cavidade

bucal, porque provavelmente os princípios ativos que possuem atividades são diferentes, para as diferentes cepas testadas.

Tabela 05 – Distribuição das médias da CIM dos extratos nebulizados de *S. brasiliensis* em diferentes concentrações, para as cepas analisadas.

Concentração (mg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1,000	11,2	11,0
0,100	9,4	10,3
0,085	9,9	10,8
0,065	0,0	10,5
0,050	0,0	0,0
0,030	0,0	0,0
0,020	0,0	0,0
0,015	0,0	0,0
0,010	0,0	0,0
0,005	0,0	0,0
0,001	0,0	0,0

Conforme a tabela 05, a CIM do extrato de *S. brasiliensis* foi equivalente a 0,085mg/ml para *S. aureus* e 0,065 mg/ml para *P. aeruginosa*. Assim, para inibir o crescimento da *P. aeruginosa* é necessário uma quantidade de extrato menor do que aquela que inibe o crescimento de *S. aureus*. Estatisticamente, houve diferença significativa entre os extratos na concentração de 1mg/ml e a clorexidina, que obteve o melhor resultado em ambas as cepas testadas.

5.1.3 Quantidade Mínima Eficaz (QME)

Para os extratos nebulizados que não apresentaram CIM frente às cepas testadas, foi determinada a QME a partir dos extratos hidroalcoólicos, com a finalidade de se verificar a menor quantidade do extrato que inibe o crescimento microbiano.

Na tabela 06, verifica-se que a QME do extrato produzido com a raiz de *A. hispidum* foi de 90 µL e na tabela 07, a QME do extrato produzido com todas as partes de *A. hispidum* foi de 70 µL, para *S. oralis*. Não foi observada diferença estatística significativa ao comparar ambos os extratos com a clorexidina, portanto, a eficácia dessas substâncias foram equivalentes.

Tabela 06 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos da raiz do *A. hispidum* em diferentes quantidades, nas cepas testadas.

Quantidade do extrato (μL)	<i>S. oralis</i>
100	12,49
90	11,13
80	0,00
70	0,00
60	0,00
50	0,00
40	0,00
30	0,00
20	0,00
10	0,00

Tabela 07 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos de todas as partes do *A. hispidum* em diferentes quantidades, nas cepas testadas.

Quantidade do extrato (μL)	<i>S. oralis</i>
100	13,29
90	12,62
80	12,18
70	12,62
60	0,00
50	0,00
40	0,00
30	0,00
20	0,00
10	0,00

A tabela 08 mostra a QME da *X. americana* que inibiu cepas que apresentaram atividade nos extratos hidroalcoólicos testados. Foi observado que a planta inibiu o crescimento da *E. faecalis*, da *S. aureus* e da *S. oralis* até as quantidades de 50, 40 e 80 μL , respectivamente.

Para *E. faecalis* não houve diferença estatística significativa entre o extrato da *X. americana* e a clorexidina. Assim, até 50 μL , esse extrato produziu um efeito semelhante ao efeito produzido por 100 μL de clorexidina.

Para *S. aureus* o extrato da *X. americana* nas quantidades 100, 90 e 80 μL não apresentou diferença estatística significativa quando comparado com a clorexidina, indicando que nessas quantidades a eficácia é semelhante à eficácia da clorexidina. Portanto, até 80 μL , o extrato da *X. americana* teve um efeito semelhante ao efeito da clorexidina na quantidade de 100 μL . Ao comparar as quantidades 70, 60, 50 e 40 μL desse extrato com a clorexidina, verificou-se que houve diferença estatística significativa, sendo a clorexidina mais eficaz.

Com relação à bactéria *S. oralis*, não houve diferença estatística significativa entre o extrato da referida planta e a clorexidina. A QME, na qual o extrato produz um efeito semelhante ao efeito da clorexidina foi de 80 μL .

Tabela 08 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) dos extratos hidroalcoólicos da *X. americana*, em diferentes quantidades, nas cepas testadas.

Quantidade do extrato 03 (μL)	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. oralis</i>
100	12,95	16,40	13,75
90	12,72	15,80	13,39
80	11,78	14,80	12,18
70	11,78	11,90	0,00
60	11,46	10,40	0,00
50	11,42	9,80	0,00
40	0,00	9,10	0,00
30	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00

Na tabela 09 é observada a QME do extrato hidroalcoólico de *S. brasiliensis*. A QME desse extrato foi de 60 μL , para *S. oralis*. O extrato nas quantidades de 100, 90, 80 e 70 μL apresentou diferença estatística significativa quando comparado com a clorexidina, sendo que o extrato foi mais eficaz. Quando utilizado na quantidade de 60 μL , não houve diferença estatística significativa em relação à clorexidina.

Tabela 09 - Distribuição das médias dos halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico *S. brasiliensis* em diferentes quantidades, na cepa testada.

Quantidade do extrato (µL)	<i>S. oralis</i>
100	15,62
90	14,87
80	14,58
70	14,55
60	12,95
50	0,00
40	0,00
30	0,00
20	0,00
10	0,00

5.2 Ensaio de Toxicidade Aguda com *Artemia Salina*

Os ensaios de toxicidade são realizados com o objetivo de determinar os possíveis danos que novas substâncias e produtos podem causar à saúde humana. No que concerne ao teste da toxicidade sistêmica aguda, pode-se dizer que ele é utilizado para classificar substâncias segundo o seu potencial de letalidade ou toxicidade (BLAAUBOER, 2003).

O teste de toxicidade aguda com *Artemia salina* é considerado pouco sensível para determinados produtos e alguns tipos de efluentes (CETESB, 1991). Entretanto, vantagens como simplicidade de manuseio, rapidez e baixo custo, contribuem para a sua adoção em muitos estudos. Ademais, esse teste é bastante utilizado em análises preliminares de toxicidade geral, uma vez que através dele é possível determinar a concentração média letal (CL₅₀), concentração que causa 50% de mortalidade na população estudada (LUNA, et al., 2005).

Existe uma relação entre a CL₅₀ e o grau de toxicidade dos extratos de plantas sobre as larvas de *A. salina*. Segundo essa relação, os extratos que obtiverem uma CL₅₀ acima de 1000 µg/mL⁻¹, não são tóxicos (MEYER et al., 1982). Neste estudo, nenhuma das concentrações dos extratos utilizados, provocou 50% de mortalidade nas larvas de *A. salina*.

A CL₅₀ calculada foi equivalente a 308,49 µg/mL para o extrato de *X. americana* e de 699,62 µg/mL para o extrato da *S. brasiliensis*. Essas concentrações estão abaixo de

1000 µg/mL. Assim, nas concentrações em que foram testados, os extratos apresentaram toxicidade contra *A. salina* (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 – Distribuição do percentual das larvas de *A. salina* mortas, imersas em soluções com diferentes concentrações do extrato nebulizado da *X. americana*.

Concentração do extrato 03 de <i>X. americana</i> (µg/ml)	Percentual de larvas mortas
100,00	10
50,00	6
25,00	4
12,50	0
6,25	0
Controle	0

Tabela 11- Distribuição do percentual das larvas de *A. salina* mortas, imersas em soluções com diferentes concentrações do extrato nebulizado da *S. brasiliensis*.

Concentração do extrato 03 de <i>S. brasiliensis</i> (µg/ml)	Percentual de larvas mortas
100,00	8
50,00	8
25,00	8
12,50	2
6,25	0
Controle	0

5.3 Ensaio de Toxicidade Aguda com Ratos

No ensaio de toxicidade aguda, os ratos utilizados neste estudo não apresentaram alterações de comportamento após a administração do extrato de *X. americana* e de *S. brasiliensis*, na dose de 2000 mg/kg v.o. No entanto, durante o período de observação preconizado, ocorreram: respiração forçada, duas horas após a administração do extrato de *X. americana*; e sinal de analgesia aos 30 minutos, uma, duas, três e quatro horas após a administração do referido extrato. Também foi observado analgesia em duas e quatro horas após a administração do extrato da *S. brasiliensis*. Entretanto, essa analgesia foi verificada pressionando a cauda dos animais com o auxílio de uma pinça. No entanto, outros estudos

deverão ser realizados para comprovar se o extrato da referida planta possui ação analgésica.

O efeito bioquímico do extrato aquoso das cascas da *X. americana* foi avaliado sobre o fígado e os rins de ratos. Nessa pesquisa, conforme observado no estudo realizado por Wurochekke, Anthony, Obidah (2008), não ocorreu diferença significativa nos níveis de uréia e creatinina em relação ao grupo controle, contudo, houve uma significativa redução dos níveis de proteínas séricas (albumina e globulina), cujo órgão responsável pela formação da maior parte delas é o fígado.

Nesse estudo foi verificado apenas o peso dos rins e do fígado. Macroscopicamente tanto esses órgãos como o coração e o pulmão não apresentaram alterações. Os animais tratados com o extrato da *X. americana* não apresentaram alteração no peso dos rins, mas o peso do fígado, apresentou uma redução estatisticamente significativa quando comparados com os animais do grupo controle. Já no grupo dos animais tratados com o extrato da *S. brasiliensis* observou-se uma redução significativa do peso dos rins quando comparado com o grupo controle e com o grupo que recebeu o extrato da *X. americana*. A redução no peso do fígado do grupo que recebeu o extrato da *S. brasiliensis* foi semelhante ao que se observou no grupo que recebeu o extrato da *X. americana* e estatisticamente significativa em relação ao peso do fígado dos animais do grupo controle (Figuras 06 e 07). Esses resultados sugerem que os extratos dessas plantas produzem alterações hepáticas e renais em ratos.

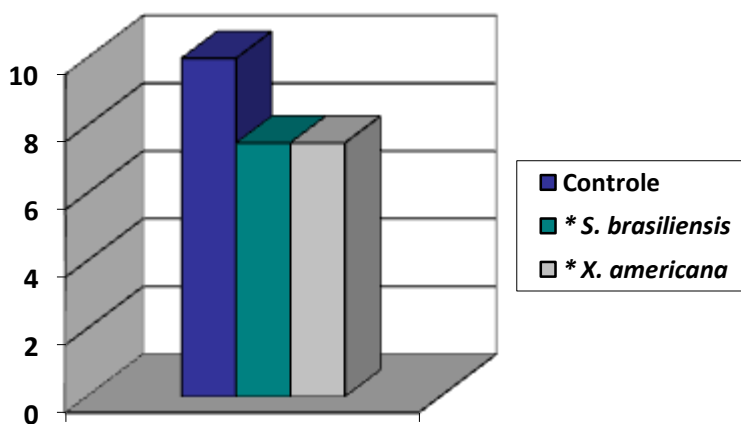


Figura 06- Peso, em gramas, do fígado dos animais tratados.

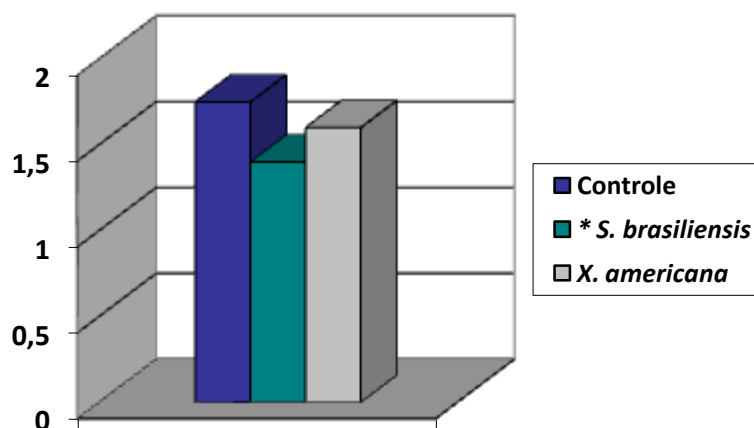


Figura 07- Peso, em gramas, dos rins dos animais tratados.
* $P < 0,05$

Os resultados da toxicidade aguda do extrato da *S. brasiliensis* apontam para uma possível ação tóxica nos rins dos ratos testados, uma vez que esses órgãos sofreram uma redução significativa. Sugerem ainda que os extratos nebulizados da *X. americana* e da *S. brasiliensis*, na quantidade que foram administrados, possuem algum potencial hepatotóxico em ratos, pois o peso do fígado em ambos os grupos, também sofreu uma redução significativa. Contudo, essas hipóteses só podem ser comprovadas através de exames histopatológicos.

Entre os grupos que receberam os referidos extratos e o grupo controle, não houve variação significativa no peso do coração (Figura 08) e no peso do pulmão (Figura 09).

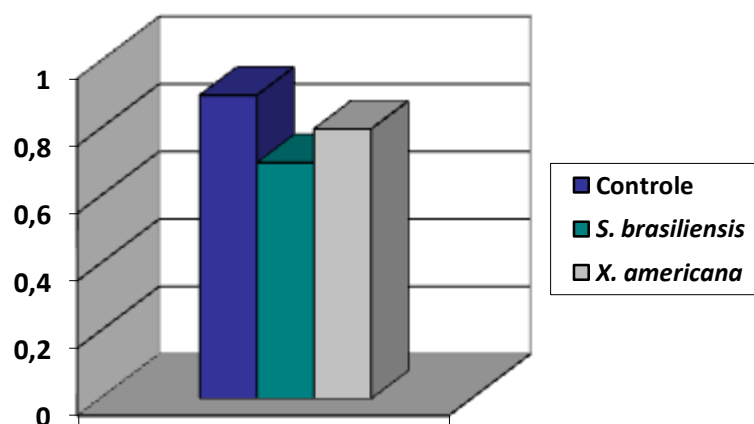


Figura 08 – Peso, em gramas, do coração dos animais tratados.

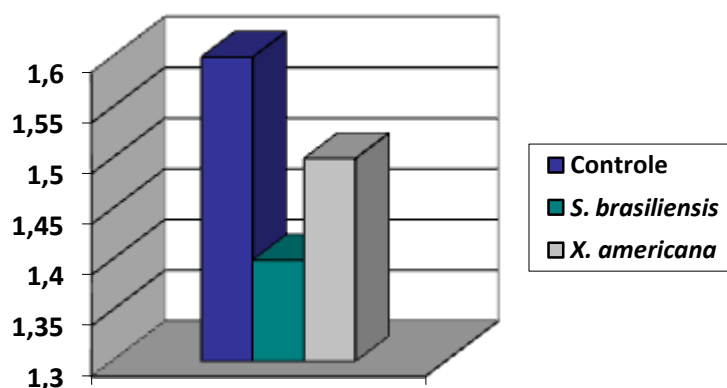


Figura 09 – Peso, em gramas, do pulmão dos animais tratados.

Na figura 10 é possível observar que não houve diferença significativa do peso corporal entre os períodos de 24, 48 e 72 horas após tratamento em nenhum dos grupos.

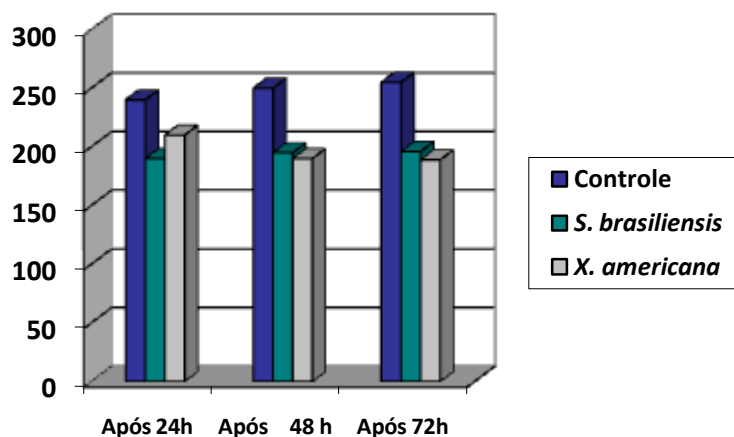


Figura 10 – Peso, em gramas, dos animais tratados durante o estudo.

O consumo de ração (Figura 11) e água (Figura 12) se manteve estável no grupo controle e no grupo tratado com o extrato da *S. brasiliensis*. Já, no grupo tratado com o extrato da *X. americana*, esse consumo apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação aos outros grupos. Esses achados sugerem que o extrato da *X. americana* pode estimular a sensação de fome e sede em ratos.

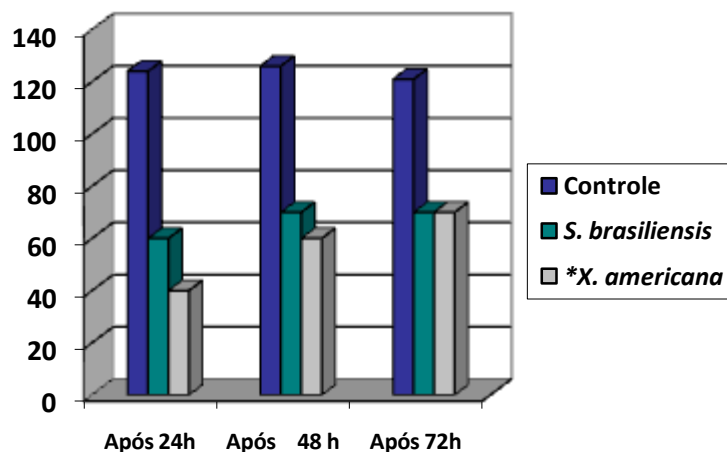


Figura 11 - Consumo de ração, em gramas, dos animais tratados durante o estudo

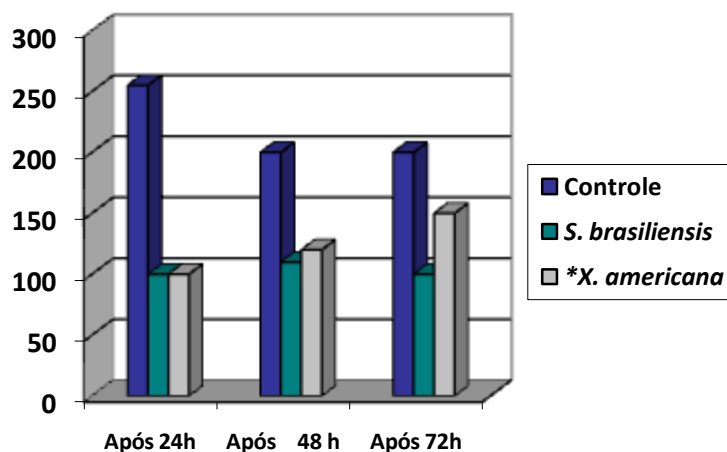


Figura 12 - Consumo de água, em mililitros, dos animais tratados durante o estudo.

*P<0,05

Durante as 72 horas após a administração dos dois extratos, não ocorreram mortes entre os animais testados, não sendo possível a determinação da dose letal média (DL₅₀). De acordo com os dados obtidos sugere-se que, os extratos de *S. brasiliensis* e *X. americana* apresentaram baixa toxicidade, nas condições avaliadas.

5.4 Ensaio de Mutagenicidade

Neste estudo os resultados do teste do micronúcleo mostram que as plantas analisadas apresentam potencial mutagênico em eritrócitos de camundongos. Entretanto,

apenas o extrato da *S. brasiliensis* administrado na concentração de 1000 mg/kg apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (Tabela 12).

Nos animais que receberam os extratos, a quantidade de micronúcleos observados foi, em média, nove vezes menor do que o observado para o controle positivo e bem mais próxima do controle negativo (Tabelas 12 e 13), indicando, portanto, que os extratos de *X. americana* e *S. brasiliensis*, quando comparados com a ciclofosfamida, um quimioterápico que tem ação mutagênica comprovada (KRISHNA *et al.*, 1993), não apresentam a capacidade de induzir mutações em eritrócitos policromáticos de camundongos.

Na literatura consultada não foram encontrados estudos envolvendo testes de mutagenicidade para as plantas já mencionadas. Assim, este é, possivelmente, o primeiro estudo dessa natureza que avalia as referidas plantas.

Tabela 12 - Distribuição da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongos tratados com o extrato da *S. brasiliensis*.

Amostras	Animais/ Número de micronúcleos para 2000 Células						Média ± SD
	F1	F2	F3	M1	M2	M3	
Tratamento/concentração							
Controle positivo	31	32	26	28	21	29	27,83±3,97
Controle negativo	1	1	1	0	0	0	0,5±0,54
<i>S. brasiliensis</i> 500mg/Kg	1	0	2	5	6	1	2,5±2,42
<i>S. brasiliensis</i> 1000mg/Kg	3	6	4	6	6	2	4,5±1,76
<i>S. brasiliensis</i> 2000mg/Kg	1	3	6	1	4	6	3,5±2,25

Controle negativo= água; Controle Positivo= Ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.;SD= desvio padrão;*= P≤0,05. M= machos, F = Fêmeas.

Tabela 13 - Distribuição da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongos tratados com extrato da *X. americana*.

Amostras	Animais/ Número de micronúcleos para 2000 Células						Média ± SD
	F1	F2	F3	M1	M2	M3	
Tratamento/concentração							
Controle positivo	31	32	26	28	21	29	27,83±3,97
Controle negativo	1	1	1	0	0	0	0,5 ± 0,54
<i>X. Americana</i> 500mg/Kg	4	2	3	3	3	4	3,1 ± 0,75
<i>X. Americana</i> 1000mg/Kg	3	5	2	5	0	3	3,0 ± 1,89
<i>X. Americana</i> 2000mg/Kg	5	3	5	4	4	2	3,8 ± 1,16

Controle negativo= água; Controle Positivo= Ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.;SD= desvio padrão;*= P≤0,05. M= machos, F = Fêmeas.

7 CONCLUSÕES

- No screening microbiológico os extratos hidroalcóolicos que apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra os patógenos testados foram aqueles obtidos a partir das cascas do caule da *S. brasiliensis* Engl. (braúna), das cascas do caule da *X. americana* L. (ameixa) e de todas as partes da *A. hispidum* DC. (carrapicho-de-cigano);
- Os extratos obtidos da *S. brasiliensis* produziram os maiores halos de inibição contra *S. oralis*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*;
- Os extratos obtidos da *S. brasiliensis* constituídos pelas respectivas proporções de água:etanol de 10:90, 20:80 e 30:70, apresentaram uma eficácia superior àquela obtida pelo digluconato de clorexidina a 0,12% frente à *S. oralis*;
- Os extratos nebulizados da *S. brasiliensis* produziram halos de inibição de crescimento microbiano. Somente frente à *S. aureus* e *P. aeruginosa*;
- Os extratos de *X. americana*, que não apresentaram nenhuma CIM contra as cepas testadas;
- Os extratos de *S. brasiliensis* e *X. americana*, apresentam baixa toxicidade, visto que nenhum dos animais testados veio a óbito ou apresentou sinais de toxicidade;
- Na concentração em que foram utilizados, os extratos nebulizados de *S. brasiliensis* e *X. americana* apresentaram toxicidade aguda frente ao microcústáceo *A. salina*;
- Foi observada atividade mutagênica dos extratos nebulizados de *S. brasiliensis* e *X. americana*, em camundongos.

REFÊRENCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002.

ALBUQUERQUE, A. C. et al. Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. Sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 1, p. 21-25, 2010.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, suplemento 16, p. 678-689, 2006.

ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p.72-76, 1999.

ALMEIDA, W. V. F. et al. Avaliação de plantas medicinais em caprinos da região do semi-árido paraibano naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais, **Revista Caatinga**. v.20, n.3, p.01-07, 2007.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.

ALVES, P. M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n.2, p.222-224, 2009.

ALVES, L. A. et al. Interferência de óleos essenciais sobre antibióticos usados no tratamento de infecções da cavidade oral. **International Journal Dental**, v. 10, n. 1, p. 26-31, 2011.

ANIBAL, P. C. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Consolidado de normas da COFID. 2009. Acesso em 01 julho 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/pdf/051109_normas.pdf>.

ARAÚJO, E. L. et al. *Acanthospermum hispidum* DC (*Asteraceae*): perspectives for a phytotherapeutic product. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, Suplemento, 2008.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (*Solanaceae*). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 205-209, 2010.

ARORA, S. et al. Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. **Journal Environ. Pathol. Toxicol. Oncol**, v. 24, p. 193-200, 2005.

BARRETO, V. L. et al. Acción antimicrobiana in vitro de dentífricos conteniendo fitoterápicos. **Avances en Odontoestomatologia**, v. 21, n. 4, p. 195-201, 2005.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**, v. 31, n. 3, p. 277-281, 2003.

BORDIGNON, S. A. L. **O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul**. Tese de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 11 agosto 2011.

BRASIL. Portaria Nº 917, de 3 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS, Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 92 p.

BRASIL. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 01 de março de 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: abril 2008.

BRASIL, Ministerio da Saúde. Plantas de interesse ao SUS. 2009. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1> Acesso em: 13 maio 2011.

BRASILEIRO, M. T. et al. *Ximenia americana* L.: botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2008.

CARMO, E. S. **Susceptibilidade de fungos do gênero *Aspergillus* a óleos essenciais**. 2008. 113 f. (Dissertação de mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

CARTEGENA, E.; MONTANARO, S.; BARDÓN, A. Improvement of the antibacterial activity of sesquiterpene lactones. **Revista Latinoamericana de Química**. v.36, n.2, p. 43-51, 2008.

CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p.26-32, 2007.

CASTRO R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 3, p. 179-184, maio/jun, 2010.

CCAHUANA-VASQUEZ, R. A. et al. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 46-50, 2007.

CHEN-CHEN, L.; SENA, A. M. Atividade Tóxica e Mutagênica do óleo de copaíba (*Copaífera langsdorfii* Desfon) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, n. 1, p. 37-40, 2002.

COECKE, S. et al. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals** suplemento 1, p. 147-175, 2005.

COELHO, F. B. R. et al. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, suplemento, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COELHO, M. B. et al. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 529-35, 2006.

CORDEIRO, C. H. G. et al. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n.3, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151693322006000300008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 18 abril 2010.

COSTA, E. M. M. B. et al. Avaliação da Ação Antimicrobiana da Própolis e de Substâncias Utilizadas em Endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 8, n.1, p. 21-25, 2008.

COSTA, E. M. M. B. et al. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.46, n.3, p. 175-180, 2011.

CRAVEIRO, A. C. S. et al. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, suplemento 18, p. 739-743, 2008.

CUNHA, A. P.; SILVA A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

DANTAS, I. C. **O raizeiro**. Campina Grande: EDUEP, 2007. 156p

DANTAS, I. C. **O raizeiro e suas raízes: um novo olhar sobre o saber popular**. Campina Grande, Universidade estadual da Paraíba, Dissertação de Mestrado em Saúde Coletiva, 2002. 134 f.

DEEPA, N.; RAJENDRAN, N. N. Anti-tumor activity of *Acanthospermum hispidum* DC on dalton ascites lymphoma in mice. **Natural Product Sciences**, v. 13, n, 3, p. 234-240, 2007.

DEEPA, N.; RAJENDRAN, N. N. Anti-bacterial and anti-fungal activities of various extracts of *Acanthospermum hispidum* DC. **Journal of Natural Remedies**. v.7, n. 2, p. 225-228, 2007.

DINIZ, D. N. et al. Efeito antifúngico *in vitro* do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 3, p. 151-156, 2010.

ELGORASHI, E. E. et al. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letter**, v. 143, p.195-207, 2003.

ETKIN, N. L.; ELISABETSKY, E. Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: The future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 23–26, 2005.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. 1988.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000300007&lng=pt&nrm=iso> Acesso em: 23 janeiro 2011.

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum*. **Fitoterapia** v. 74, p. 130-132. 2003.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**. v.1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FONTENELE, A. F. et al. A. Avaliação da Toxicidade de Extratos de Plantas Medicinais através de Bioensaios com *Artemia salina*. *Leach*. **Ciência e Cultura**, v. 40, n.11, p. 09-11, 1988.

FREIRES, I. A. et al. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário, **Odontologia Clínico-Científica**, v. 9, n. 2, 2010.

Disponível em: < http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-38882010000200010&lng=pt&nrm=iso&tlng=p> Acesso em: 23 janeiro 2010.

GONZAGA, T. W. C. et al. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.) e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.2, p.145-154, 2003.

GUERRA, N. M. et al.. Utilização de plantas medicinais pela comunidade rural moacir lucena, apodi-rn. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, p. 442-450, 2010.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar.**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HORTENSE, S. R. et al., Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n.2, p. 178-84, 2010.

JAMES, D. B. et al. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. Paquistão, **Journal of Medical Science**. v.7, n. 2, p. 284-8. 2007.

JESUS, R. P. F. S. et al. Ação antibacteriana e antiaderente de pithecellobium Cochliocarpum (gomez) macbr sobre microrganismos orais. **Odontologia Clínica-Científica**, v, 9, n. 4, 2010. Disponível em: < http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167738882010000400011&lng=pt&nrm=iso> Acesso em: 15 abril 2011.

JOVITO, V. C. et al. Avaliação in vivo de Dentifrício Contendo Extrato da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre Indicadores de Saúde Bucal. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 9, n. 1, p. 81-86, jan./abr. 2009.

JUDD, W. S. et al. **Plant Systematics. A phylogenetic approach**. Inglaterra: Sinauer Associates Inc., p.383-5. 1999.

KONÉ, W. M. et al. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Cagliari, v. 93, p. 43–49. 2004.

KRIGER, L. **Promoção de Saúde bucal: Paradigma, Ciência, Humanização**. 3 ed. Paraná: Artes médicas, 2003.

KRISHNA, G. et al. Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v.335, p.331-337, 1993.

LEITE, K. R. L. L. S. et al. Avaliação da atividade Mutagênica e Genotóxica de *Ginkgo biloba* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos. **Revista de Biologia Neotropical**. v. 3, n. 2, p. 157-162, 2003.

LOBERTO, J. C. S., et al. *Staphylococcus* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. [Brazilian journal of microbiology](#), São Paulo, v.35, n.1, p. 64-8, 2004.

LORENZO, J. L. Placa (biofilme) dental. In: _____ **Microbiologia para o estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 73-85.

LORENZI, Harri. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas e tóxicas**. 4 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, p. 22. 2002.

LOURENÇO, J. A. et al. Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.]. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p. 414-420, 2010.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. **International Endoditic Journal**, v. 34, n.5, p. 399-405, 2001.

LUBIAN, C.T. et al. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000200006> Acesso em: 17 maio 2011.

LUNA, J. S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, n. 2 p. 199 – 206, 2005.

MACEDO-COSTA, M. R. et al. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n.2B, p.565-571, 2009.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-38. 2002.

MAEKAWA, L. E. et al. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool a base de clorexidina sobre *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 39, n.1, p.15-19, jan./fev., 2010.

MAGALHÃES, E. A. et al. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 2, n. 1, p. 65-69, 2010.

MAGASSOUBA, F. B. et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 44-53, 2007.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

MARTINS, L. R. R. et al. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de ¹H e ¹³C do acetato de acantoaustralida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 4, p. 490-496. , 2006.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007. p. 122-124.

MATOS, B. M. et al. Atividade Antifúngica do Extrato Alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 38, n. 4, 2009.

MATOS, J. M. D. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Fortaleza: [s. n.], 1987.

MELO, J. G. et al. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2011, p. 1-14. Disponível em: <http://downloads.hindawi.com/journals/ecam/2011/365359.pdf>. Acesso em: 11 maio 2011.

MELO-REIS, P. R. et al. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica do látex de *Synadenium umbellatum* Pax pelo teste do micronúcleo em camundongos, **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-69842011000100024&script=sci_arttext> Acesso em: 21 dezembro 2010.

MENEZES, T. O. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. v. 38, n.3, p.184-91, 2009.

MEVY, J. P. et al. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 34, p. 549-553, 2006.

MEYER, B. N. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, p. 31-4, 1982.

MOLINA, F. P. et al. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*, **Ciencia Odontológica Brasileira**, v.11, n.2, p.86-93, 2008.

MONTEIRO, J. M. et al., Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region **Journal of Ethnopharmacology** , v. 105, n. 21, p. 173-186, 2006.

MORAIS, S. M. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.15, n.2, p.169-177, 2005.

MOREIRA, R.R.D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.

MOREIRA, A. C. A. et al. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.7, n.3, p. 266-272, 2008.

MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.8, n.2, p.153-161, 2009.

MOTHANA, R. A. et al. Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. **[BMC Complementary and Alternative Medicine](#)**, v. 9, n.7, p. 1-11, 2009.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Rio de Janeiro: 2 ed. Guanabara Koogan, 2004.

NOVAIS, T. S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 13, suplemento 2, p. 05-08, 2003.

OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Norma 474, 1997. Disponível em: < <http://www.oecd.org/dataoecd/18/34/1948442.pdf>>. Acesso em 23 maio 2011.

OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia Americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, S. M. M.; LORSCHIEDER J. A.; NOGUEIRA, M. A. Avaliação da ação *in vitro* de Gel Dentifrício Contendo Óleos Essenciais sobre Bactérias Cariogênicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 266-9, 2008.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n. 3, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, C. B. et al. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora l.* (Pitanga). **Ciencia Odontologica Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 29-34, 2009.

OLIVEIRA, H. B.; KFFURI, C. W.; CASALI, V. W. C. Estudo Etnofarmacológico de Plantas Medicinais utilizadas em Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 2, 2010.

OMENA, M. L. R. A. Ensaio etnofarmacológico de espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originárias do bioma caatinga. **Saúde e Ambiente em Revista**. v. 2, n. 2, p. 92-107. 2007.

OMER, M. E. F. A.; ELNIMA, E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia**. v. 74, p.122-6, 2003.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontics Journal**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PINHEIRO, M. L. P.; ANDRADE, E. D. Fitoterápicos como alternativa ao uso de medicamentos convencionais em odontologia. **Revista ABO Nacional**. v.16, n.2, p.107-110, 2008.

PRIETO, P. et al. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. **Alternatives to laboratory animals**, v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PUCCI, L. C. C. et al. Avaliação da Toxicidade Aguda Oral e da Atividade Diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (congonha-de-bugre), **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n.1, p. 30-7, 2010.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1. Ed. Canoas/RS: ULBRA, 2003.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA J. R. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. **Journal of Endodontics**., Baltimore, v. 34, p. 1249-54, 2008.

SACANDE, M.; VAUTIER, H. *Ximenia americana* L. **Forest & Landse Denm**. v. 112, p. 1-2, 2006.

SAMPAIO, D.; SOUZA, V. C.; OLIVEIRA, A. A.; PAULA-SOUZA, J.; RODRIGUES, R. R. **Árvores da Restinga: guia de identificação**. São Paulo: Neotrópica. 2005.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n.1B, p. 321-32, 2009.

SANTOS, R. I. et al. óleo essencial de *Thymus vulgaris*: Elaboração de Enxaguatório Bucal e Avaliação do efeito *in vitro* na formação da placa bacteriana **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 6, p. 941-7, 2010.

SARAYVA, A. M. **Estudo farmacognóstico e determinação da atividade biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes.** Recife: Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2007. Disponível em: < <http://en.scientificcommons.org/22060249>> Acesso em: 13 de junho de 2011.

SCHREINER, F. et al. Uso do chá de *Punica granatum* (romã) no controle da aderência de bactérias orais em ligaduras ortodônticas, **Robrac**, v. 18, n. 45, p. 56-61, 2009

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional** – Um guia de fitoterapia para ciências da saúde. São Paulo: 4 ed. Manole, 2002.

SEMENOFF, T. A. D. V.; SEMENOFF-SEGUNDO, A.; BIASOLI, E. R. Efetividade antimicrobiana *in vitro* de enxaguatórios bucais frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, n. 4, p. 351-354, 2008.

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Plantas medicinais arbóreas da caatinga no Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Acta Botanica Brasileira**, v.19, n.1, 2005.

Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062005000100003> Acesso em: 23 maio 2010.

SILVA, L. L. et al. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n. 5, p. 700-705, 2010.

SIMÕES, O. M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. p. 14-15.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. EDUFSC. 2007. 1102 p.

SOARES, S. P. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. **Revista Odontologia**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 141-144, 2008.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VEIRA, G.; KAPLAN, M. A. C. Propriedades Analgésica e Antiinflamatória do Extrato Metanólico de Folhas de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Latin American Journal Pharmacy**, v. 26, n.6, p. 872-7, 2007.

SOUSA, P. J. C. et al. **Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum*** Brazilian Journal of Pharmacognosy 18(2): 217-221, Abr./Jun. 2008.

SOUZA, C. M. P. **Obtenção e padronização de extratos de plantas medicinais com atividade antimicrobiana**. Campina Grande: manuscrito. Universidade Estadual da Paraíba, 2009. p. 40

SURH, Y.; FERGUSON, L.R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. **Mutation Research**, v. 1-8, p. 523-4, 2003.

SUMMERFIELD, A. et al. Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. **Antiviral Resesarch**, v. 36, n.1, p. 55-62, 1997.

TREVISAN, R. R. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent ULMACEAE.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em:<<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/24059>> Acesso em: 20 junho 2010.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50“, **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 3, n. 2, p.93-98, 2006.

VALADARES, M. C. Assessment of mutagenic and antimutagenic effects of *Punica granatum* in mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 46, n.1, 2010.

VASCONCELOS, L. C. S. et al.. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *s. mutans*, *s. mitis* and *c. albicans*. **Brazilian Dental Journal.** v. 17, n. 3, p. 223-7, 2006.

WUROCHEKKE A. U.; ANTHONY, A. E.; OBIDAH, W. Biochemical effects on the liver and kidney of rats administered aqueous stem bark extract of *Xemenia americana* **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n.16, p. 2777-2780, Aug. 2008.

_____Água - teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea. Norma Técnica L5 018. São Paulo: CETESB, 33 p. 1991.